

Почерняев К.Ф. Новые возможности багатосайтового способа определения митохондриальных гаплотипов свиней

Приведено описання багатосайтового способу визначення митохондриальних гаплотипів свиней з використанням методу ПЦР-ПДРФ. Нуклеотидні заміни м.15580С> Т, м.15616Т> С, м.15714Т> С, м.15758Т> С і м.15918 +> Т методом ПЦР-ПДРФ визначаються однозначно. Поліморфізм м.15558-15562 визначається як втрата сайту рестрикції Tas I. Характерний для м'ясогородської і створеної з її участю полтавської м'ясної, гаплотип В2 було виявлено у 20% свиноматок червонобілої породи м'ясних свиней. Він утворився за рахунок зникнення сайту визнання ендонуклеази Tas I (↓AATT) в позиції 15558-15562 п.н. митохондриального геному свині. При дослідженні тварин великої білої породи ООО «Козієвське» Харківської області, було визначено гаплотип Е, раніше в наших дослідженнях ДНК порід домашніх і підвидів дикої свині не зустрічалося. Таким чином, за рахунок залучення до власних досліджень більш широкого кола порід свиней і опублікованих даних, можливість даного методичного підходу, збільшилася до 18 митохондриальних гаплотипів.

Ключові слова: гаплотип, митохондриальна ДНК, ПЦР-ПДРФ, свині.

Pochernyaev K.F. New Possibilities of multi-site method for determining mitochondrial haplotypes pigs

The paper describes a multi-site approach for determining mitochondrial haplotypes pigs using PCR-RFLP method. Nucleotide substitutions m.15580C> T, m.15616T> C, m.15714T> C, m.15758T> C and m.15918 +> T by PCR-RFLP are uniquely determined. M.15558-15562 Polymorphism is defined as the loss of a restriction site Tas I. Characteristic of Mirgorod and created with her participation Poltava meat, B2 haplotype was found in 20% of sows the Red White Belted Meaty pig breed. It was formed by the disappearance of the endonuclease recognition site Tas I at position 15558-15562 bp porcine mitochondrial genome. In the study of animals Large White breed of "Kozeivske" Kharkiv region, was determined haplotype E, earlier in our DNA studies and breeds of domesticated subspecies of the wild pigs are not met. Thus, by bringing to their own research over a wide range of breeds of pigs and published data, the possibility of this methodical approach increased to 18 mitochondrial haplotypes.

Key words: haplotype, mitochondrial DNA, PCR-RFLP, pig.

УДК 636.4:636.082:575.827

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ МАРКЕР-АСОЦІЙОВАНОЇ СЕЛЕКЦІЇ У СВИНАРСТВІ

Балацький В. М., кандидат біологічних наук

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

36013 м. Полтава, вул. Шведська Могила, 1

vnbalatsky@gmail.com

У статті розглядається питання щодо молекулярно-генетичних аспектів методології впровадження маркер-асоційованої селекції (MAS) в свинарстві України за використання 12-ти кандидатних генів локусів кількісних ознак: гену гормону росту (GH), інсуліноподібного фактору росту 2 (IGF2), рецептору ріанодину1 (RYR1), рецептору естрогену (ESR1), рецептору пролактину (PRLR),

генів катепсинів *CTSL*, *CTSB*, *CTSS*, *CTSK*, рецептору меланокортину *MC4R*, рилізінг фактору гормону росту (*GHRH*) і рецептору лептину (*LEPR*). Наголошується, що наряду із, загалом, позитивним досвідом впровадження *MAS* у свинарстві мають місце і негативні ефекти. Причиною останніх є недостатньо обґрунтований вибір молекулярно-генетичних маркерів для *MAS*: відсутність аналізу генетичної структури досліджуваних популяцій за маркерними генами та оцінки їх поліморфізму й інформативності маркерів, відмова від проведення асоціативного аналізу в обраних референтних стадах. За результатами популяційних і асоціативних досліджень розроблено і представлено методологію застосування у *MAS* молекулярно-генетичної інформації, отриманої за аналізом зазначених генів в популяціях свиней порід різного напрямку продуктивності: великої білої (велика біла англійської селекції, велика біла української селекції внутрішньопородних типів *УВБ-1*, *УВБ-3*), велика чорна, ландрас, полтавська м'ясна, українська степова біла, миргородська, українська степова ряба, п'єтрен і мейшан. Методологія передбачає реалізацію декількох етапів: 1) визначення панелі молекулярно-генетичних маркерів генів *QTL*; 2) аналіз генетичної структури породи або її субпопуляцій, в яких має проводитися *MAS*, за визначеними молекулярно-генетичними маркерами, оцінка їх поліморфізму і інформативності; 3) створення дослідної групи тварин для асоціативного аналізу; 4) проведення асоціативного аналізу; 5) вибір молекулярно-генетичних маркерів для *MAS* за результатами популяційного і асоціативного аналізу; 6) моніторинг генетичної структури популяцій у процесі проведення *MAS* в ряду генерацій.

Ключові слова: маркер-асоційована селекція, молекулярно-генетичні маркери, *QTL*, популяційний і асоціативний аналіз, методологія

Прогрес у тваринництві залежить від прогресу в методології селекційної роботи, одним із сучасних напрямів у якій є маркер-асоційована селекція (*MAS*, marker assisted selection). *MAS* базується на оцінюванні тварин за використання молекулярно-генетичних маркерів локусів геному, асоційованих з продуктивними ознаками. Залучення таких маркерів підвищує ефективність селекції, особливо у відношенні ознак з низьким коефіцієнтом успадкування [1]. В останні роки виконано багато робіт щодо розробки молекулярно-генетичних маркерів та їх залучення у селекційний процес галузі свинарства. Проте, незважаючи на переважно успішний процес реалізації *MAS* у виробничій практиці, існують свідчення відносно виникнення ряду небажаних побічних чи навіть негативних ефектів [2]. Останнє, на нашу думку, в значній мірі є результатом недостатньо обґрунтованого вибору молекулярно-генетичних маркерів для *MAS*: відсутність аналізу генетичної структури досліджуваних популяцій за маркерними генами та оцінки їх поліморфізму й інформативності маркерів, відмова від проведення асоціативного аналізу в обраних референтних стадах. В Україні дослідження вітчизняних генотипів свиней проводяться [3, 4], але вони носять фрагментарний характер, обмежуються окремими стадами різних порід і лише поодинокими *QTL* що, в цілому, є недостатніми для запровадження маркер-асоційованої селекції. Не завжди наголошується на тому, що встановлені асоціативні зв'язки характерні саме для досліджених груп тварин у референтних стадах.

Впродовж останнього десятиліття нами проведено ряд досліджень генетичної структури популяцій порід свиней вітчизняного і зарубіжного походження за низкою генів *QTL*, виконано асоціативний аналіз у відношенні ряду продуктивних ознак свиней. Отримані результати висвітлені у наших публікаціях [5-9]. Нами продемонстровано, що серед генетичних маркерів 12-ти генів *QTL*, які ми досліджували в породах велика біла (англійської селекції та української селекції внутрішньопородних типів *УВБ-1* та *УВБ-3*), ландрас, велика чорна, миргородська, українська степова біла, українська степова ряба, полтавська м'ясна, п'єтрен і мейшан певна їх кількість не може

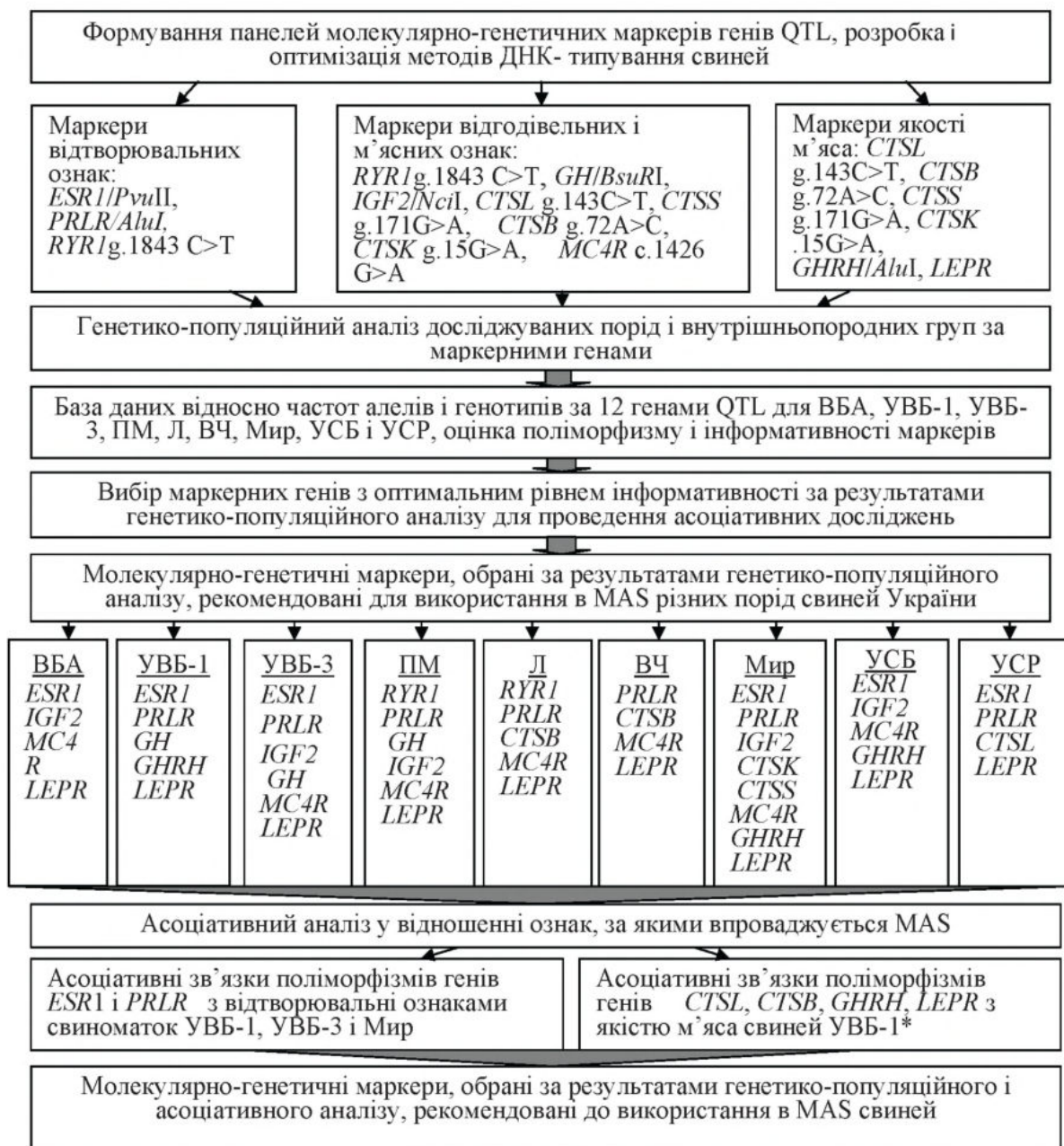
бути використана для MAS в окремих досліджених стадах порід свиней, що розводяться в Україні. З одного боку, занижена інформативність декількох маркерних систем не дозволяє створити референтні групи тварин з певними варіантами генотипів, що в свою чергу унеможливує проведення асоціативних досліджень і прогнозування результату внаслідок застосування масової селекції. З іншого боку, в одних породах або субпопуляціях виявляються суттєві зв'язки певних маркерів з продуктивними ознаками, в інших вони відсутні. Таким чином, неможливо застосовувати в різних породах і породних групах однакові генетичні маркери без попереднього популяційного та асоціативного аналізу із продуктивними ознаками. Зазначене, зокрема, у повній мірі відноситься до дослідженого нами генетичного маркеру багатоплідності свиноматок – *PviII* – поліморфізму гену рецептора естрогену 1. В субпопуляції УВБ-3 доведено його асоціацію із відтворювальними ознаками свиноматок, у виборці тварин УВБ-1 зв'язки були незначними, а у миргородській породі вони були відсутні [5]. Подібна ситуація спостерігалася і у відношенні генетичного маркеру *PRLR/AluI*. Асоціативний аналіз щодо генетичних маркерів катепсинів довів зв'язок деяких з них з окремими показниками якості м'яса свиней великої білої породи. Але рівень поліморфізму цих генів у найпоширенішій в Україні ВБ породі, загалом, низький (частота мінорних алелів = 0,00-0,05). Це спричиняє певні труднощі або унеможливує впровадження MAS у ВБ породі за цими генетичними маркерами. У той же час гени рилізінг фактору гормону росту (*GHRH*) і рецептора лептину (*LEPR*) сегрегували у ВБ породі з високим рівнем поліморфізму; встановлені зв'язки їх SNP з показниками якості м'яса свиней, але це не означає, що в інших породах тенденції відносно зв'язку цих генів з ознаками продуктивності будуть аналогічними.

З іншої точки зору, виникнення асоціацій генетичних маркерів з продуктивними ознаками тварин, що складає основу MAS, можна розглядати як окремих випадок процесу популяційної динаміки, внаслідок чого змінюються частоти алелів у виборці не тільки за кандидатними генами QTL, але і за низкою інших, функціонально пов'язаних чи зчеплених з ними. Останнє є важливим у контексті збереження генетичної структури і мінливості порід, що селекціонуються, для запобігання інбредної депресії і втрати їх породної специфічності, що є особливо актуальним для малочисельних локальних та зникаючих порід.

Методологія використання молекулярно-генетичної інформації за генами QTL у маркер-асоційованій селекції свиней

У контексті наших досліджень 12-ти генів локусів кількісних ознак (гормону росту (*GH*), інсулін-подібного фактора росту 2 (*IGF2*), генів рецепторів: ріанодину 1 (*RYR1*), естрогену 1 (*ESR1*), пролактину (*PRLR*), меланокортину (*MC4R*), лептину (*LEPR*), генів катепсинів (*CTSL*, *CTSB*, *CTSS*, *CTSK*) і гена рилізінг фактора гормону росту (*GHRH*)) та порід свиней, які розводяться в Україні, ми розробили методологію використання молекулярно-генетичної інформації для MAS, яка представлена на схемі (рис. 1).

Методологія використання молекулярно-генетичної інформації для MAS, загалом, передбачає реалізацію декількох етапів: 1) визначення панелі молекулярно-генетичних маркерів генів QTL, асоційованих із ознаками продуктивності, що є об'єктом MAS; 2) аналіз генетичної структури породи або її субпопуляцій, в яких має проводитися MAS, за визначеними молекулярно-генетичними маркерами, оцінка їх поліморфізму і інформативності; 3) створення за результатами генотипування дослідної групи тварин з різними генотипами за вибраними генетичними маркерами для асоціативного аналізу; 4) проведення асоціативного аналізу, визначення зв'язків алелів і генотипів за генетичними маркерами з ознаками продуктивності; 5) вибір молекулярно-генетичних маркерів для MAS за результатами популяційного і асоціативного аналізу; 6) моніторинг генетичної структури популяцій у процесі проведення MAS в ряду генерацій.



*- у зв'язку з низькою інформативністю маркерів генів *CTSL* і *CTSB* в УВБ-1, аналіз проводився лише по двох генотипах за кожним з цих генів.

Рис. Методологія використання молекулярно-генетичної інформації за 12 кандидатними генами QTL для MAS свиней різних порід України.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Эрнст, Л.К., Зиновьева, Н.А. 2008. *Биологические проблемы животноводства в XXI веке*. М.: РАСХН. 501.
2. Dekkers, M. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. C. J. Anim. Sci.* 82(E. Suppl.):E313–E328.
3. Костенко, С.О., Коновал, О.М., Драгулян, М.В., Сидоренко, О.В., и Россоха, Л.В. 2013^b. Моніторинг великої білої породи за генами господарсько-корисних ознак – *Науково-технічний бюлетень ІТ НААН*. 109. 151-159.
4. Копилов, К.В., Жукорський, О.М., Копилова, К.В., Метлицька, О.І., Вдовиченко, Ю.В., Балацький, В.М., Порхун, М.Г., Шельов, А.В., Шевченко, Є.А., та Писа-

ренко, Н.Б. 2014. *Методологія оцінки генотипу тварин за молекулярно-генетичними маркерами у тваринництві України*. За наук. ред. акад. НААН М.В. Гладія. К.: Аграр. Наука. 212 с.

5. Балацький, В.М., Гришина, Л.П., Саєнко, А.М., Вовк, В.О., та Ващенко, П.А. 2016. Асоціація поліморфізму *ESR1* гена з репродуктивними якостями свиноматок великої білої і миргородської порід, розведення і генетика тварин. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник*. 52. 150-158.

6. Баньковская, И.Б., Балацкий, В.Н., и Буслик, Т.В. 2016. Связь полиморфизма генов катепсинов CTSS, CTSL, CTSS, CTSK с показателями качества мяса и сала свиной украинской крупной белой породы. *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сборник научных трудов*. Гл. редактор Н.И. Гавриченко. Горки: БГСХА. 19. 2 ч. Ч. 1. 368. 198-204.

7. V.N. Balatsky, I.B. Bankovska, A.M. Saienko. 2016. Association between leptin receptor gene polymorphism and quality of both meat and back fat in large white pigs of ukrainian breeding. *Agricultural science and practice*. 3(2):42-48.

8. Viktor Balatsky, Irina Bankovska, Ramona N. Pena, Artem Saienko, Tetyana Buslyk, Sergii Korinnyi, Olena Doran. 2016. Polymorphisms of the porcine cathepsins, growth hormone-releasing hormone and leptin receptor genes and their association with meat quality traits in Ukrainian Large White breed. *Mol Biol Rep*, Vol. 43, pp. 517–526.

9. Viktor N. Balatsky, Konstantin F. Pochernyaev, Tatiana V. Buslyk, Olena S. Dykan, Sergii N. Korinnyi, Ramona N. Pena, Olena Doran. 2015. Sequence variation in the cathepsin B (CTSB), L (CTSL), S (CTSS) and K (CTSK) genes in Ukrainian pig breeds. *Global J. Anim. Breed. Genet.* Vol. 3 (3), pp. 117-124.

REFERENCES

1. Jernst, L.K., Zinov'eva, N.A. 2008. Biologicheskie problemy zhivotnovodstva v XXI veke. M.: RASHN. 501 (in Russian).

2. Dekkers, M. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. C. J. Anim. Sci.* 82(E. Suppl.):E313–E328.

3. Kostenko, S.O., Konoval, O.M., Draguljan, M.V., Sidorenko, O.V., i Rossoha, L.V. 2013b. Monitoring velikoi biloi porodi za genami gospodar's'ko-korisnih oznak – Naukovo-tehnichnij bjuletен' IT NAAN. 109. 151-159 (in Ukrainian).

4. Kopilov, K.V., Zhukors'kij, O.M., Kopilova, K.V., Metlic'ka, O.I., Vdovichenko, Ju.V., Balac'kij, V.M., Porhun, M.G., Shel'ov, A.V., Shevchenko, С.А., та Pisarenko, N.B. 2014. Metodologija ocinki genotipu tvarin za molekularno-genetichnimi markerami u tvarinnictvi Ukraini. Za nauk. red. akad. NAAN M.V. Gladija. K.: Agrar. Nauka. 212 s. (in Ukrainian).

5. Balac'kij, V.M., Grishina, L.P., Saenko, A.M., Vovk, V.O., та Vashhenko, P.A. 2016. Asociacija polimorfizmu *ESR1* gena z reproductivnimi jakostjami svinomatok velikoi biloi i mirgorods'koj porid. rozvedennja i genetika tvarin. Mizhvidomchij tematichnij naukovij zbirnik. 52. 150-158 (in Ukrainian).

6. Ban'kovskaja, I.B., Balackij, V.N., i Buslik, T.V. 2016. Svjaz' polimorfizma genov katepsinov CTSS, CTSL, CTSS, CTSK s pokazateljami kachestva mjasa i sala svinej ukrainskoj krupnoj beloju porody. Aktual'nye problemy intensivnogo razvitija zhivotnovodstva: sbornik nauchnyh trudov. Gl. redaktor N. I. Gavrichenko. Gorki: BGSXA. 19. 2 ch. Ch. 1. 368. 198-204 (in Russian).

7. V.N. Balatsky, I.B. Bankovska, A.M. Saienko. 2016. Association between leptin receptor gene polymorphism and quality of both meat and back fat in large white pigs of ukrainian breeding. *Agricultural science and practice*. 3(2):42-48.

8. Viktor Balatsky, Irina Bankovska, Ramona N. Pena, Artem Saienko, Tetyana Buslyk, Sergii Korinnyi, Olena Doran. 2016. Polymorphisms of the porcine cathepsins, growth hormone-releasing hormone and leptin receptor genes and their association with meat quality traits in Ukrainian Large White breed. *Mol Biol Rep*, Vol. 43, pp. 517–526.

9. Viktor N. Balatsky, Konstantin F. Pochernyaev, Tatiana V. Buslyk, Olena S. Dykan, Sergii N. Korinnyi, Ramona N. Pena, Olena Doran. 2015. Sequence variation in the cathepsin B (CTSB), L (CTSL), S (CTSS) and K (CTSK) genes in Ukrainian pig breeds. *Global J. Anim. Breed. Genet.* Vol. 3 (3), pp. 117-124.

Балацкий В.Н. Молекулярно-генетические аспекты внедрения маркер-ассоциированной селекции в свиноводстве

В статье рассматривается вопрос о молекулярно-генетических аспектах методологии внедрения маркер-ассоциированной селекции (MAS) в свиноводстве Украины при использовании 12-ти кандидатных генов локусов количественных признаков: гена гормона роста (GH), инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2), рецептора риадинолу1 (RYR1), рецептора эстрогена (ESR1), рецептора пролактина (PRLR), генов катепсинов CTSL, CTSB, CTSS, CTSK, рецептора меланокортина MC4R, рилизинг фактора гормона роста (GHRH) и рецептора лептина (LEPR). Отмечается, что наряду с, в целом, положительным опытом внедрения MAS в свиноводстве имеют место и негативные эффекты. Причиной последних является недостаточно обоснованный выбор молекулярно-генетических маркеров для MAS: отсутствие анализа генетической структуры исследуемых популяций по маркерным генам и оценки их полиморфизма и информативности маркеров, отказ от проведения ассоциативного анализа с использованием референтных стад. По результатам популяционных и ассоциативных исследований разработана и представлена методология применения в MAS молекулярно-генетической информации, полученной в результате анализа указанных генов в популяциях свиней пород разного направления продуктивности: крупной белой (крупная белая английской селекции, крупная белая украинской селекции внутривидовых типов УКБ-1, УКБ -3), крупная черная, ландрас, полтавская мясная, украинская степная белая, миргородская, украинская степная рябая, пьетрен и мэйшань. Методология предусматривает реализацию нескольких этапов: 1) определение панели молекулярно-генетических маркеров генов QTL; 2) анализ генетической структуры породы или ее субпопуляций, в которых должна проводиться MAS, по выбранным молекулярно-генетическими маркерам, оценка их полиморфизма и информативности; 3) создание опытной группы животных для ассоциативного анализа; 4) проведение ассоциативного анализа; 5) выбор молекулярно-генетических маркеров для MAS по результатам популяционного и ассоциативного анализа; 6) мониторинг генетической структуры популяций в процессе проведения MAS в ряду поколений.

Ключевые слова: маркер-ассоциированная селекция, молекулярно-генетические маркеры, QTL, популяционный и ассоциативный анализ, методология

Balatsky V.M. Molecular-genetic aspects of using marker-assisted selection in pig breeding

The article deals with the issue of molecular genetic aspects of the methodology of using marker-assisted selection in the pig breeding industry of Ukraine using 12 candidate genes of loci of quantitative traits: the growth hormone (GH) gene,

insulin-like growth factor 2 (IGF2), ryanodine receptor1 (RYR1), the estrogen receptor (ESR1), the prolactin receptor (PRLR), the CTSL, CTSB, CTSS, CTSK cathepsins, MC4R melanocortin receptor, GHRH and leptin receptor releasing factor (LEPR) genes. It is observed that along with positive results of introducing MAS in pig production, there are also negative effects. The reasons for the negative effects are mainly caused by the substantiated choice of molecular genetic markers for MAS. This might be done due to the lack of analysis of the genetic structure of the populations under study by marker genes and the evaluation of their polymorphism and informative marker, also because the refusal to perform assisted analysis using reference herds. Based on the results of population and assisted studies, a methodology has been developed and presented for the use in MAS of molecular genetic information obtained as a result of the analysis of these genes in populations of pigs of different breeds of productivity: Large White (English Large White, Ukrainian Large White of intrabreed types ULW-1, ULW-3), Large Black, Landrace, Poltava meat, Ukrainian Steppe White, Mirgorod, Ukrainian steppe spotted, Pietren and Meishan. The methodology provides the realization of several stages: 1) the determination of the panel of molecular-genetic markers of QTL genes; 2) analysis of the genetic structure of the breed or its subpopulations in which MAS should be performed, based on selected molecular genetic markers, an evaluation of their polymorphism and normativity; 3) the creation of an experimental group of animals for assisted analysis; 4) carrying out assisted analysis; 5) the choice of molecular-genetic markers for MAS based on the results of population and assisted analysis; 6) monitoring the genetic structure of populations in the process of conducting MAS in a number of generations.

Key words: marker-assisted selection, molecular-genetic markers, QTL, population and assisted analysis, methodology.

УДК 636.4:636.082:575.827

ПОШИРЕННЯ МУТАНТНОГО АЛЕЛЮ Т ГЕНУ *RYR1* У ПОРОДАХ СВИНЕЙ ВІТЧИЗНЯНОЇ ТА ЗАКОРДОННОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Рудоман Г. С., здобувач

Балацький В. М., кандидат біологічних наук

Саєнко А. М., кандидат сільськогосподарських наук

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

36013 м. Полтава, вул. Шведська Могила, 1

rudoman.halyna@gmail.com

*Здійснено дослідження поліморфізму $g.1843C>T$ гену *RYR1*, асоційованого із синдромом стресу свиней. Проводився аналіз семими порід свиней і внутрішньопородних типів, які розводяться в Україні: велика біла порода української селекції, внутрішньопорідний тип 1, велика біла порода української селекції, внутрішньопорідний тип 3, велика біла порода англійської селекції, полтавська м'ясна, ландрас, миргородська і червона білопояса. Оскільки однонуклеотидна заміна $g.1843C>T$ в *RYR1*-гені асоційована з підвищеною м'ясністю туш а також обумовлює виникнення стрессиндому, проблема відбору свиней, особливо м'ясного напрямку продуктивності, генетично стійких до стресів за допомогою методів молекулярної генетики є актуальною і на сьогодні. Для генотипування був використаний біоматеріал (кров, шерсть із волосяними фолікулами) від свиней із десяти племінних господарств України. Встановлена присутність тварин-носіїв мутантного алелю Т серед порід миргородська, ландрас, червона*