

## **ЗВ'ЯЗОК ГЕНОТИПІВ ЗА ЛОКУСАМИ *RYR 1*, *LEP 3469T>C* ТА *LEPR 2856C>T* З ВІДГОДІВЕЛЬНИМИ І М'ЯСНИМИ ЯКОСТЯМИ СВИНЕЙ**

**Саєнко А.М.**, кандидат сільськогосподарських наук

**Гришина Л.П.**, доктор сільськогосподарських наук

**Олійниченко Є.К.**, аспірант

**Волощук О.В.**, здобувач

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

36013, м. Полтава, вул. Шведська Могила, 1,

pigbreeding@ukr.net

*Проведені пошукові дослідження генетичного та асоціативного аналізу однонуклеотидних поліморфізмів локусів *RYR1*, *LEPR-2856C>T* та *LEP 3469 T>C* у вибірці свиней різних поєднань породи велика біла української селекції (*ВБ х ВБ*, *ВБхЛ* та *ВБхП'єтрен*) встановлено, що обрані локуси виявились поліморфними, однак рівень поліморфізму був достатній лише у *LEPR-2856C>T* та *LEP 3469 T>C* (0,375) для можливості проведення пошуку зв'язку окремих генотипів з показниками продуктивності тварин. Виявлено зв'язок між генотипами гену *LEP 3469 T>C* з товщиною штику на крижах у поєднанні *ВБ х ВБ* і масою кісток у *ВБхЛ* та генотипами гену *LEPR-2856C>T* з площею м'язового вічка у поєднанні *ВБхЛ*.*

*Спостерігається тенденція щодо збільшення товщини штику на рівні 6-7 грудних хребців з генотипом *TT* за локусом *LEP* у поєднанні *ВБ х ВБ*. Також виявлена тенденція зменшення витрат корму і збільшення середньодобового приросту у поєднанні *ВБхЛ*, за генотипом *LEP CC*, відповідно. У поєднанні *ВБхП'єтрен* виявлена тенденція до збільшення ваги м'яса у тварин з генотипом *LEP CT*. Отримані результати свідчать про можливість проведення селекційної роботи в обраних вибірках свиней породи велика біла української селекції та її поєднань за дослідженими генами. Виявлені зв'язки та тенденції генів *LEPR-2856C>T* та *LEP 3469 T>C* з відгодівельними і м'ясними якістьями свиней надають можливість використовувати їх в подальшому як маркери продуктивних ознак.*

*Ключові слова: маркерна селекція свиней, відгодівельні і м'ясні якості свиней, лептин, поліморфізм.*

На даний час, молекулярно-генетичні дослідження у свинарстві України набувають широкого використання. Однак, даних з маркерного ДНК-типуння все ж таки не достатньо для впровадження маркер-асоційованої селекції, тому що для досліджень, зазвичай, використовують обмежену кількість локусів кількісних ознак (QTL – quantitative trait loci) та невелику вибірку тварин. Тому досить актуально проводити подальші дослідження з маркерного ДНК-типуння для накопичення інформації і поповнення існуючих баз даних.

Для досліджень використовують гени із вже встановленими асоціаціями з продуктивними ознаками свиней, наприклад, ген рецептора ріанодіна (*RYR I-gene*), який асоційований із стресчутливістю свиней, негативним проявом якої є розвиток злоякісного гіпертермічного синдрому [1, 2], так і гени-кандидати, що можуть бути асоційовані з репродуктивними, відгодівельними і м'ясними ознаками свиней – ген лептину (*LEP*) та ген рецептора лептину (*LEPR*) свиней. У гені лептину виявлено понад 400 однонуклеотидних поліморфізмів в самому гені і його 3'- і 5'- примикаючих і

промоторних ділянках [3]. У нашій роботі генотипування по гену лептину проводилося за SNP *LEP* g. 3469T>C. Обраний SNP (Single nucleotide polymorphism) розташований в другому екзоні гену. Дослідженнями, що проводилися в Бразилії на двопородних свинях різних генотипів (свиноматки порід ландрас, велика біла і п'єтрен з кнурами місцевих порід), встановлено вплив поліморфізму названого гену на середньодобовий приріст живої маси, апетит та товщину шпика свиней, не залежно від їх статі [4]. Для гену рецептору лептину відомо більше 30 однонуклеотидних поліморфізмів, які використовуються як генетичні маркери гену *LEPR* [5]. Зазначене відноситься і до генетичного маркера гену *LEPR* SNP 2856C>T, розташованому в його 20-му екзоні [6], який асоційований з продуктивними ознаками свиней, включно з відкладанням жиру [7].

Аналіз поліморфізмів *RYR I*, *LEP* g. 3469T>C та *LEPR* g. 2856C>T і встановлення їх зв'язків з продуктивними ознаками свиней надасть можливість оцінити перспективи використання обраних SNP в якості генетичних маркерів для використання у маркер-асоційованій селекції.

**Метою роботи** було провести генетико-популяційний аналіз піддослідних груп свиней поєднань ВБхЛ, ВБхВБ та ВБхП'єтрен за генами *RYR I*, *LEP* g. 3469T>C та *LEPR* g. 2856C>T. Оцінити можливість проведення маркерної селекції за обраними генами та виявити асоціації між алельними різновидами поліморфізму генів з відгодівельними і м'ясними якостями свиней обраних поєднань.

**Матеріали і методи досліджень.** Біоматеріал (кров) було отримано від піддослідних груп свиней поєднань породи велика біла української селекції (ВБ) з ландрасом (ВБхЛ (7 голів)), п'єтреном (ВБхП'єтрен (8 голів)) та ВБ х ВБ (5 голів), що розводяться в племзаводі ДП «ДГ Степне», Полтавської області.

ДНК із зразків крові тварин виділяли із використанням іонообмінної смоли Chelex-100 [8]. Генотипування здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції – поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПЛР – ПДРФ), який передбачав синтез ділянки гену, що аналізується у ПЛР [9]. Параметри ПЛР-ампліфікації та ПЛР-ПДРФ патерни представлені у таблиці 1.

### 1. Параметри ПЛР-ампліфікації та ПЛР-ПДРФ патерни

Гени	Структура праймерів для ПЛР	ПЛР <sup>1</sup>	ПЛР-ПДРФ патерни <sup>2</sup>
<i>RYR1</i>	F:5'-GTGCTGGATGTCCTGTGTTCCCT-3' R:5'-CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG-3'	137/68,5	ПЛР-ПДРФ ( <i>Hha I</i> ): алель N 137 п.н.; алель n 84 + 53 п.н.
<i>LEP</i> 3469	F:5'-AACAGAGGGTCACCGGTTTG-3'	486/63	ПЛР-ПДРФ ( <i>Hinf I</i> ): алель T 486 п.н.; алель C 396+90 п.н.
<i>LEPR</i> E20 2856	F:5'-CCCTCTTCTTTGGAGCCTGA-3' R:5'-GAGAAGCTTCTGGAATGAACCTTAGACG-3'	341/68	ПЛР-ПДРФ ( <i>Ava II</i> ): алель T 795 п.н., алель C – 502 + 293 п.н.

<sup>1</sup>Розмір ПЛР продуктів (п.н.)/температура відпалу (°C).

<sup>2</sup>Сумарний розмір дрібних фрагментів рестрикції

Статистичну обробку даних виконували з використанням алгоритмів програми GenAlex 6.0 [10] та однофакторного дисперсійного аналізу у середовищі Microsoft Office Excel 2010 [11].

**Результати та обговорення.** Генотипування мікропопуляцій свиней поєднань ВБхЛ, ВБ х ВБ та ВБхП'єтрен показало, що локуси *LEPR*-2856C>T, *LEP* 3469 T>C та *RYR1* є поліморфними.

Переважаючим генотипом за геном *RYRI* у досліджених тварин був *RYRI<sup>NN</sup>* з частотою (0,85). Частота алеля *RYRI<sup>N</sup>* була на рівні (0,92). У групі тварин поєднання ВБхП'єтрен виявлено мутантний алель *RYRI<sup>n</sup>* і відповідно гетерозиготний генотип *RYRI<sup>Nn</sup>*. Виявлення мутантного алелю *RYRI<sup>n</sup>* зв'язано з використанням у схрещуванні свиней великої білої породи з тваринами м'ясного напрямку продуктивності породи п'єтрен. Всі протиповані тварини були стресстійкі оскільки генотипи *RYRI<sup>NN</sup>* та *RYRI<sup>Nn</sup>* не зумовлюють виникнення PSS-синдрому (Porcine stress syndrome).

За генами лептину та рецептора лептину ДНК-типування показало, що розподіл частот алелей С та Т знаходиться приблизно на одному рівні (0,50) для *LEPR<sup>C</sup>* та для *LEP<sup>C</sup>* (0,52). За частотою генотипів виявлено переважаючу більшість гетерозигот *LEPR<sup>CT</sup>* (0,55) та *LEP<sup>CT</sup>* (0,70). На збільшену кількість гетерозигот у вибірці вказує і негативне число індексу фіксації Райта для *LEP* (-0,103) та *LEPR* (-0,400).

Не виявлено вірогідної різниці у розподілі фактичних частот генотипів від теоретично можливих за Гарді-Вайнбергом методом хі-квадрат. Спостерігається незначна перевага значення фактичної гетерозиготності (0,700) над очікуваною (0,500) за локусом *LEPR-2856C>T*.

Рівень поліморфізму (0,375) за індексом PIC (Polymorphism Information Content) для локусів *LEPR-2856C>T* та *LEP 3469 T>C*, виявився достатнім для можливості проведення пошуку зв'язку окремих генотипів з показниками продуктивності тварин.

## 2. Розподіл частот алелів та генотипів за геном у породах та типах свиней

з/п	Локус	Частоти алелів	Частоти генотипів			$\chi^2$	Fis	Ho/He	PIC
			NN/CC	Nn/CT	nn/TT				
1	RYR1	N=0,92 n=0,08	0,85 (0,86)	0,15 (0,14)	0,00 (0,01)	0,131	-0,081	0,150/0,139	0,136
2	LEP 3469	C=0,52 T=0,48	0,25 (0,28)	0,55 (0,50)	0,20 (0,22)	0,211	-0,103	0,550/0,499	0,375
3	LEPR E20 2856	C=0,50 T=0,50	0,15 (0,25)	0,70 (0,50)	0,15 (0,25)	3,200	-0,400	0,700/0,500	0,375

Примітка: **Ho** – фактична гетерозиготність; **He** – очікувана гетерозиготність;  $\chi^2$  – відхилення між емпіричними та теоретичними частотами генотипів відносно закону Гарді – Вайнберга; **PIC** (polymorphic information content) – індекс поліморфного інформаційного вмісту локусу; **F<sub>is</sub>** – індекс фіксації Райта.

Результати з дослідження зв'язків генотипів досліджених генів (*LEP 3469 T>C*, *LEPR 2856C>T*) з відгодівельними і м'ясними якостями свиней представлені у таблиці 3. У досліджених вибірках свиней поєднань великої білої породи були встановлені зв'язки з окремими показниками відгодівельних і м'ясних якостей. Так, у вибірці ВБ х ВБ встановлений зв'язок між генотипами гену *LEP* та товщиною шпигу на крижах. Тварини з генотипом *LEP<sup>TT</sup>* мали вдвічі вищу товщину шпигу (33,50, мм) ніж тварини з *LEP<sup>TC</sup>* (15,80, мм). У вибірці свиней поєднання ВБ х Л встановлено зв'язок гену *LEP* із більшим вмістом кісток у туші. Генотипи *LEP<sup>TT</sup>* та *LEP<sup>CC</sup>* мали вищі значення (4,73кг та 5,35кг, відповідно) за вищенаведеним показником відносно *LEP<sup>TC</sup>* (4,2кг). Також за геном рецептора лептину встановлено зв'язок з площею м'язового вічка у свиней поєднання ВБхЛ. Так, тварини з генотипами *LEPR<sup>TT</sup>* і *CT* мали більшу площу м'язового вічка (45,20 і 47,40 см<sup>2</sup>, відповідно) ніж тварини з *LEPR<sup>CC</sup>* (39,73 см<sup>2</sup>).

**3. Зв'язок генотипів за локусами *LEP* 3469 Т>С, *LEPR* 2856С>Т з відгодівельними і м'ясними якостями свиней поєднань ВБ х ВБ, ВБхЛ та ВБхП'єтрен.**

Показники продуктивності	<i>LEP</i> (ВБ х ВБ)			р-значення
	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	
	( <i>LEP</i> ТТ)	( <i>LEP</i> ТС)	( <i>LEP</i> СС)	
Товщина шпику на рівні 6-7 грудного хребця, мм	31,50±0,00	24,55±1,28	-	0,094 <sup>(*)</sup>
Товщина шпику на крижах, мм	33,50±0,00	15,80±2,04	-	0,03*
	<i>LEP</i> (ВБхЛ)			
Середньодобовий приріст, г	652,77±32,48	627,05±6,25	748,10±18,90	0,09 <sup>(*)</sup>
Витрати корму, к.од	3,83±0,13	4,11±0,16	3,49±0,05	0,094 <sup>(*)</sup>
Кістки, кг	4,73±0,24	4,2±0,00	5,35±0,05	0,04*
	<i>LEP</i> (ВБхП'єтрен)			
М'ясо кг	-	22,76±0,45	21,33±0,44	0,08 <sup>(*)</sup>
	<i>LEPR</i> (ВБхЛ)			
	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	
	( <i>LEPR</i> СС)	( <i>LEPR</i> СТ)	( <i>LEPR</i> ТТ)	
Площа м'язового вічка, см <sup>2</sup>	39,73±1,58	47,40±0,50	45,20±0,00	0,024*

Критерій достовірності: \*  $p \leq 0,05$ ,

у дужках <sup>(\*)</sup> зазначена тенденція до достовірної асоціації –  $p \leq 0,09-0,08$ .

Необхідно відмітити, що за окремими показниками була встановлена тенденція до зв'язку. Так тенденція виявлена у вибірці ВБ х ВБ між геном *LEP* та товщиною шпику на рівні 6-7 грудного хребця. Також за геном лептину виявлена тенденція у групах поєднань ВБхЛ та ВБхП'єтрен з середньодобовим приростом, витратами корму і вмістом м'яса у туші, відповідно. Виявлені тенденції дозволяють припустити, що при умові збільшення вибірки дані показники, що мають близькі значення **p** до статистично вірогідних  $p \leq 0,05$ , будуть мати достовірні зміни.

Для ріанодин рецепторного гена зв'язки або тенденції виявлені не були.

**Висновки.** У результаті проведених досліджень генетичного та асоціативного аналізу одонуклеотидних поліморфізмів *RYRI*, *LEPR*-2856С>Т та *LEP* 3469 Т>С встановлено, що обрані локуси виявились поліморфними, однак рівень поліморфізму був достатній лише у *LEPR*-2856С>Т та *LEP* 3469 Т>С (0,375) для можливості проведення пошуку зв'язку окремих генотипів з показниками продуктивності тварин. Виявлено зв'язок між генотипами гену *LEP* 3469 Т>С з товщиною шпику на крижах у поєднанні ВБ х ВБ і масою кісток у ВБхЛ та генотипами гену *LEPR*-2856С>Т з площею м'язового вічка у поєднанні ВБхЛ.

Спостерігається тенденція щодо збільшення товщини шпику на рівні 6-7 грудних хребців з генотипом ТТ за локусом *LEP* у поєднанні ВБ х ВБ. Також виявлена тенденція зменшення витрат корму і збільшення середньодобового приросту у поєднанні ВБхЛ, за генотипом *LEP*<sup>CC</sup>, відповідно. У поєднанні ВБхП'єтрен виявлена тенденція до збільшення ваги м'яса у тварин з генотипом *LEP*<sup>CT</sup>. Отримані результати свідчать про можливість проведення селекційної роботи в обраних вибірках свиней породи велика біла української селекції та її поєднань за дослідженими генами. Виявлені зв'язки та тенденції генів *LEPR*-2856С>Т та *LEP* 3469 Т>С з відгодівельними і м'ясними якостями свиней надають можливість використовувати їх в подальшому як маркери продуктивних ознак.

**Перспективи подальших досліджень.** Проведені пошукові дослідження у вибірці свиней різних поєднань породи велика біла української селекції (ВБ х ВБ, ВБхЛ та ВБхП'єтрен) свідчать, що обрані локуси *LEPR*-2856C>T та *LEP* 3469 T>C, можуть бути використані в якості маркерів окремих продуктивних показників, а за умови збільшення вибірки тварин можуть бути виявлені нові тенденції або достовірні асоціації обраних маркерів з відгодівельними і м'ясними якостями свиней.

#### БІБЛІОГРАФІЯ

1. MacLennan, D.H., Duff, C., Zorzato, F. et al. 1990. Ryanodine receptor gene is candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature*. V. 343. 243-248.
2. Otsu, K., Khanna, V.K., Archibald, A.L., McLennan, D.N. 1991. Cosegregation of porcine malignant hyperthermia and a probable cause mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families. *Genomics*. 11: 744-750.
3. Data base NCBI.
4. de Oliveira Peixoto J, Facioni Guimarães SE, Sávio Lopes P, Menck Soares MA, Vieira Pires A, Gualberto Barbosa MV, de Almeida Torres R, de Almeida E Silva M. 2006. Associations of leptin gene polymorphisms with production traits in pigs. *J Anim Breed Genet*. 123(6):378.
5. Muoz, G. Oviló, L. Silió. 2009. Single – and joint-population analyses of two experimental pig crosses to confirm quantitative trait loci on *Sus scrofa* chromosome 6 and leptin receptor effects on fatness and growth traits. *J. Anim. Sci.* 87(2):459.
6. Xiaoping Li., Kim Sang-Wook, Choi Jung-Suck, et al. 2010. Investigation of porcine FABP3 and LEPR gene polymorphisms and mRNA expression for variation in intramuscular fat content. *Molecular Biology*. 37(8):3931.
7. Zhang, C. Wang, Z., Bruce, H. et al. 2014. Associations between single nucleotide polymorphisms in 33 candidate genes and meat quality traits in commercial pigs. *Anim Genet*. 45(4):508.
8. Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*. 10: 506-509.
9. Glazko, V.I., Shulga, E.V., Dyiman, T.N. 2001. DNK-tehnologii i bioinformatika v reshenii problem biotehnologii mlekopitayuschih.- *DNA technology and bioinformatics in solving problems of mammalian biotechnology*. Belaya Tserkov. 488.
10. Peakall, R., Smouse, P. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288–295.
11. Plohinskiy, N.A. 1969. Rukovodstvo po biometrii dlya zooteknikov.- *Guide for biometrics for livestock*. М.:Kolos. 255.

**Саенко А.М., Гришина Л.П., Олійниченко Е.К., Волощук А.М.** Связь генотипов по локусам *RYR I*, *LEP* 3469 T>C и *LEPR* 2856C>T с откормочными и мясными качествами свиней

*Проведены поисковые исследования генетического и ассоциативного анализа однонуклеотидных полиморфизмов локусов *RYR1*, *LEPR*-2856C> T и *LEP* 3469 T> C в выборке свиней различных сочетаний породы крупная белая украинской селекции (КБ х КБ, КБхЛ и КБхП'єтрен). Установлено, что выбранные локусы являются полиморфными, однако уровень полиморфизма был достаточен лишь в *LEPR*-2856C> T и *LEP* 3469 T> C (0,375) для возможности проведения поиска связи отдельных генотипов с показателями продуктивности животных. Выявлена связь между генотипами гена *LEP* 3469 T> C с толщиной штика на крестце в сочетании КБ х КБ и массой костей в КБхЛ и генотипами гена *LEPR*-2856C> T с площадью мышечного глазка в сочетании КБхЛ.*

*Наблюдается тенденция к увеличению толщины штика на уровне 6-7<sup>го</sup> грудных позвонков у свиней с генотипом TT по локусу *LEP* в сочетании КБ х КБ. Также выявлена тенденция к уменьшению затрат корма и увеличению среднесуточ-*

ного прироста свиней в сочетании КБхЛ, с генотипом LEP CC . В сочетании КБхПьетрен выявлена тенденция к увеличению веса мяса у животных с генотипом LEP CT. Полученные результаты свидетельствуют о возможности проведения селекционной работы в избранных выборках свиней породы крупная белая украинской селекции и ее сочетаний с исследованными генами. Выявленные связи и тенденции генов LEPR-2856C> T и LEP 3469 T> C с откормочными и мясными качествами свиней дают возможность использовать их в дальнейшем как ДНК-маркеры продуктивных признаков.

Ключевые слова: маркерная селекция свиней, полиморфизм гена, лептин, откормочные и мясные качества свиней.

**Saenko A.M., Gryshyna L.P., Oliinychenko Ye.K., Voloshchuk O.V.** The Relationship of the genotypes by RYR I, LEP 3469T> C and LEPR 2856S with fattening and meat qualities of swine

*Nowadays, molecular genetic studies of pig breeding in Ukraine are widely used. However, marker DNA typing data is still not sufficient to implement marker-associated selection, as for studies, a limited number of limited number of quantitative traits (QTL – quantitative trait loci) and a small sample of animals are usually used. Therefore, it is very important to carry out further studies on marker DNA typing for the accumulation of information and replenishment of existing databases.*

*Analysis of polymorphisms RYR I, LEP g. 3469T> C and LEPR g. 2856C> T and establishing their links with the productive features of pigs will provide an opportunity to evaluate the prospects for the use of selected SNPs as genetic markers for use in marker-associated selection.*

*The purpose of the work was to conduct a genetic population analysis of the experimental groups of pigs of the combination of LWxL, LWxP and LWxPietren for the genes RYR I, LEP g. 3469T> C and LEPR g. 2856C> T. To evaluate the possibility of marker selection for selected genes and to identify associations between allelic varieties of polymorphisms of genes with the fattening and meat qualities of pigs of selected combinations.*

*The researches of genetic and associative analysis of single nucleotide polymorphisms of locuses RYRI, LEPR-2856C> T and LEP 3469 T> C in a sample of pigs of various combinations of the Large White breed of Ukrainian selection (LWxLW, LWxL and LWxPietren) were found. It is established that selected locus was polymorphic, but the level of polymorphism was sufficient only in LEPR-2856C> T and LEP 3469 T> C (0,375) for the possibility of conducting a search for a link between the individual genotypes and the performance of animals. The connection between the genotypes of the gene LEP 3469 T> C with the thickness of the lard on the sacrum in combination LW x LW and the bone mass in LWxL and genotypes of the gene LEPR-2856C> T with the area of the muscular cell in combination of LWxL was revealed. There is a tendency to increase the thickness of the lard at 6-7 thoracic vertebrae with the genotype TT by the locus of LEP in combination LW x LW. Also, a tendency was observed in reducing feed costs and increasing the average daily gain in combination with LWxL, according to the genotype LEP CC, respectively. In combination, LWxPietren revealed a tendency to increase the weight of meat in animals with the genotype LEP CT. The obtained results indicate the possibility of selection work in chosen pigs of Large White breeds of Ukrainian selection and its combinations on the investigated genes. The revealed links and trends of genes LEPR-2856C> T and LEP 3469 T> C with the fattening and meat qualities of pigs provide the opportunity to use them later as markers of productive features.*

*Key Words: marker associated selection, polymorphism of the gene, leptin gene, meat quality.*