

Ryszard Maleszka, Iren Munoz and M Alice Pinto. 2013. Standart methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 52(4):152–154.

7. Maniatis, T., E. Fritch, and Dzh. Sembruk. 1984. *Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie*. Moskow, Mir, 478.

8. Ernesto Guzman-Novoa, Greg J. Hunt, Jose L. Uribe, Christine Smith, and Miguel E. Arechavaleta. 2002. Velasco Confirmation of QTL Effects and Evidence of Genetic Dominance of Honey Bee Defensive Behavior: Results of Colony and Individual Behavioral Assays. *Behavior Genetics*. 32(2):95–102.

9. Gregory, P. G., and T. E. Rinderer. 2004. Non – destructive sources of DNA used to genotype honey bee (*Apis mellifera*) queens. The Netherlands Entomological Society. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 3:173–177.

10. Songkun Su, Stefan Albert, Shaowu Zhang, Sven Maier, Shenglu Chen, Honghu Du, and Jurgen Tautz. 2007. Non – destructive genotyping and genetic variation of fanning in a honey bee colony. *Journal of Insect Physiology*. 53:411–417.

УДК 636.082:575

ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦІЙНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ДОЦІЛЬНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ *LEPR* (с.232Т>А) У ВІТЧИЗНЯНІЙ МАРКЕРНІЙ СЕЛЕКЦІЇ ВЕЛИКОЇ БІЛОЇ І МИРГОРОДСЬКОЇ ПОРІД СВИНЕЙ

Н. К. САРАНЦЕВА, В. М. БАЛАЦЬКИЙ, В. Ю. НОР, Є. К. ОЛІЙНИЧЕНКО
Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН (Полтава, Україна)
maestropoltava@rambler.ru

*Проведено дослідження поліморфізму гена рецептора лептину (*LEPR* 232Т>А), що асоційований з рядом господарськи корисних ознак, зокрема показниками якості м'яса свиней. Молекулярно-генетичний аналіз проведено на вибірці тварин великої білої (українська велика біла тип 1) та миргородської порід. Встановлені основні генетико-популяційні параметри свиней досліджуваних порід за однонуклеотидною заміною *LEPR* (с.232Т>А) для кожної мікропопуляції.*

Розподіл частот алелів показав переважання потенційно небажаного алелю А серед досліджуваних популяцій свиней.

Ключові слова: маркерна селекція, свині, популяція, поліморфізм, ДНК-маркер, ген рецептора лептину

GENETICS AND POPULATION PRACTICABILITY OF USING SNP (C. 232T>A) OF *LEPR* GENE AS A MARKER FOR FURTHER SELECTION FOR LARGE WHITE AND MYRGOROD PIG BREEDS

N. K. Sarantseva, V. M. Balatsky, V. Y. Nor, Ye. K. Oliinychenko
Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production of NAAS (Poltava, Ukraine)

*The study of polymorphism in *LEPR* gene (c. 232T>A) was conducted; it associates with several productive traits, especially it influences on meat traits. Molecular-genetic analysis was carried out on the Large White population (bred in Ukraine) and Myrgorodska breeds. The basic genetic-population parameters with *LEPR* polymorphism (c.232T>A) in studied pig populations were studied for each micro population.*

Keywords: marker assisted selection, pigs, population, polymorphism, DNA marker, leptin gene receptor

© Н. К. САРАНЦЕВА, В. М. БАЛАЦЬКИЙ, В. Ю. НОР,
Є. К. ОЛІЙНИЧЕНКО, 2016

ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦІЙНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ДОЦІЛЬНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ *LEPR* (С. 232Т>А) У МАРКЕРНІЙ СЕЛЕКЦІЇ ВЕЛИКОЇ БІЛОЇ І МИРГОРОДСЬКОЇ ПОРІД СВИНЕЙ

Н. К. Саранцева, В. Н. Балацкий, В. Ю. Нор, Е. К. Олейниченко

Институт свиноводства и агропромышленного производства НААН (Полтава, Украина)

*Проведено исследование полиморфизма гена рецептора лептина (*LEPR* 232Т>А), ассоциированного с рядом хозяйственно-полезных признаков, в частности показателем качества мяса свиней. Молекулярно - генетический анализ проведен на выборке животных крупной белой (украинская крупная белая тип 1) и миргородской пород. Установлены основные генетико-популяционные параметры свиней исследуемых пород по однонуклеотидной замене *LEPR* (с.232Т> А) для каждой микропопуляции.*

Распределение частот аллелей показало преобладание потенциально нежелательного аллеля А среди исследуемых популяций свиней.

Ключевые слова: маркерная селекция, свиньи, популяция, полиморфизм, ДНК-маркер, ген рецептора лептина

Вступ. Останнім часом племінна робота у свинарстві все частіше ґрунтується на застосуванні технології маркер-асоційованої селекції, яка передбачає генотипування особин за локусами, що контролюють господарські ознаки і використання отриманої молекулярної інформації для оцінки генотипів, добору і підбору тварин. Встановлена велика кількість генів-кандидатів, що належать до таких локусів (локуси кількісних ознак, QTL), які впливають на репродуктивні, відгодівельні і м'ясні ознаки свиней. Але серед них відомо не так багато генів і відповідних ДНК маркерів, які можна ефективно, з точки зору сили їх асоціації з ознаками, використовувати у практиці селекційної роботи.

Одними із найважливіших ознак у свинарстві є ті, що пов'язані з ростом та розвитком тварин. Їх прояв контролюють цілі генні комплекси, серед яких виділяють окремі гени, що мають найбільш суттєвий вплив на їх прояв. До останніх відносяться гени лептину та його рецептора (*LEPR*). Рецептор лептину є одним з компонентів системи регулювання енергетичного гомеостазу організму. Він модулює ефекти лептину, що беруть участь у контролі інтенсивності поглинання їжі, регуляції ваги тіла тварин і накопиченні жиру. У свиней ген рецептора лептину (*LEPR*) локалізований в 6-ій хромосомі в ділянці, для якої встановлена асоціація з вмістом внутрішньом'язового жиру, товщиною шпику, інтенсивністю росту і параметрами структури туші [6], на підставі чого *LEPR* відносять до кандидатних генів кількісних ознак.

Ген рецептора лептину містить 20 екзонів. У його структурі для різних порід свиней виявлено не менше 25 однонуклеотидних поліморфізмів (SNP), які знаходяться в різних частинах гена (екзонах, інтронах, 5' і 3' ділянках) [7]. Необхідною передумовою розробки генетичних маркерів на основі аналізу *LEPR*, насамперед, є отримання інформації щодо рівня поліморфізму окремих SNP в різних породах і популяціях свиней з наступною оцінкою сили їх асоціації з ознаками продуктивності. Для деяких SNP's в гені *LEPR* встановлені популяційні параметри (частоти алелів, рівень поліморфізму та ін.), оцінена їх асоціація з ознаками продуктивності. Але зроблено це для окремих порід або комерційних гібридних ліній свиней, причому отримані дані не завжди узгоджуються. Перспективним SNP щодо розробки генетичного маркеру інтенсивності росту і структури туші, є мутація с.232Т>А у четвертому екзоні гену *LEPR*. Ця мутація відноситься до місенс-мутацій і є причиною амінокислотної заміни Met>Ser у структурі білка рецептору лептину. Зміни у первинній структурі білка, у свою чергу, можуть привести до зміни його функції і, отже, суттєво вплинути на прояв відповідної ознаки. Однак, інформація щодо рівня поліморфізму цього SNP в популяціях свиней вітчизняних генотипів, яка необхідна для розробки генетичного маркеру, відсутня. Іншими авторами показана достовірна асоціація алелю А зі збільшеними показниками товщину шпику у свиней польської великої білої породи, що робить альтернативний алель Т бажаним у селекції тварин на м'ясність [8].

Метою роботи було дослідити генетичну структуру свиней великої білої породи української селекції і миргородської породи за с.232Т>А поліморфізмом гену рецептора лептину.

Матеріали та методи досліджень. Для проведення генетико-популяційного аналізу були використані зразки ДНК свиней великої білої породи, внутрішньопородного типу 1 (УВБ-1, ДП ДГ «Степне», Полтавська обл.) та миргородської породи (ДП ДГ ПЗ імені Декабристів, Полтавська обл.) у кількості 50 голів від кожної групи тварин. Вибір тварин для дослідження зумовлювався тим, що вони характеризуються універсальним напрямком продуктивності, але суттєво відрізняються за походженням. Виділення ДНК зі зразків біологічного матеріалу, яким слугувала щетина тварин з волосяними цибулинами, проводили за допомогою іонообмінної смоли «Chelex-100» [9]. Генотипування здійснювали методом ПЛР-ПДРФ згідно методики [8] з власними модифікаціями з підбору термодинамічних характеристик ПЛР, оптимальної концентрації та довжини гелю для розділення фрагментів рестрикції, а також часу протікання електрофорезу та напруги електричного поля.

Для полімеразної ланцюгової реакції використовували олігонуклеотидні послідовності наступної структури:

LEPR Forward: 5'-TGCCTGCTGGAATCTCAAAG-3'

LEPR Reverse: 5'-GCAGACAACATTGCAGGGAA-3'

Синтезований у результаті ПЛР ДНК-продукт обробляли рестриктазою *Tsp509I* // *TasI* (*Fermentas*, Литва), що зумовлювало появу фрагментів, які відповідають наступним генотипам локусу *LEPR* (с. 232Т>А): ТТ – 184 п.н., АТ – 184, 113, 71 п.н., АА – 113, 71 п.н.

Для діалельної маркерної системи *LEPR* (с. 232Т>А) відхилення від генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом у досліджених популяціях було виражено критерієм Хі-квадрат. Частоти алелів, оцінка генних частот, визначення гетерозиготності обраховували за допомогою програми GenAlex 6.0 [10].

Результати досліджень. За результатами ДНК-аналізу свиней миргородської породи та УВБ-1 за локусом *LEPR* (с.232Т>А) визначена їх генетична структура, для обох популяцій показаний рівень поліморфності використаної маркерної системи. Аналіз розподілу генотипів показав насиченість популяцій генотипом АА, що наведено у таблиці 1.

1. Поліморфізм гену *LEPR* (с.232Т>А) у популяціях свиней миргородської породи та УВБ-1

Породи і внутріпородні типи	Частоти генотипів (фактична/очікувана)			Гетерозиготність		F _{is}	χ ²
				Ho	He		
	AA	AT	TT				
УВБ-1	0,680/ 0,578	0,160/ 0,365	0,160/ 0,058	0,160	0,365	0,561	15,759***
Миргородська	0,720/ 0,740	0,280/ 0,241	0,000/ 0,020	0,280	0,241	-0,163	1,325

Примітка. Ho – фактична гетерозиготність; He – очікувана гетерозиготність; F_{is} – індекс фіксації Райта; χ² – значення при оцінці вірогідності відхилення в розподілі генотипів від рівноважного визначеного за законом Гарді-Вайнберга; ***- p ≤ 0,001.

У дослідженій популяції тварин УВБ-1 виявлено статистично значуще відхилення фактичного розподілу генотипів від очікуваного значення за Гарді-Вайнбергом (χ²=15,759, p ≤ 0,001). Відхилення відбувалося в бік збільшення гомозигот (AA=0,680), що може бути як наслідком помірного інбридингу, так і добором тварин за кращими ознаками репродукції чи власної продуктивності, впливом обмеженої кількості плідників, гомозиготних за цим локусом. Виявлена незначна частка особин-гетерозигот (AT=0,160) та альтернативних гомозигот (TT=0,160). Позитивне значення індексу фіксації Райта (0,561) та перевага очікуваної гетерозиготності (0,365) над фактичною (0,160) також вказують на існування селекційного тиску у цьому стаді за досліджуваною маркерною системою *LEPR*.

Дещо зворотна ситуація спостерігалася у популяції тварин миргородської породи. Суттєва частка особин стада, як і у випадку з УВБ-1, виявилася носіями генотипу АА (0,720), за присутності незначної кількості гетерозиготних тварин (АТ=0,280), в той же час особин альтернативного гомозиготного генотипу ТТ виявлено не було. Відхилення фактичного розподілу генотипів від очікуваного значення за Гарді-Вайнбергом виявилася незначним та не носило достовірного характеру ($\chi^2=1,325$), що вказує на генетичну збалансованість дослідженої популяції тварин за локусом *LEPR* (с.232Т>А), а отже і повну відсутність селекційного тиску та добору і підбору тварин за цим маркером. Цей факт також підтверджується і негативним значенням індексу фіксації Райта (-0,163) та перевагою фактичної гетерозиготності (0,280) над очікуваною (0,241).

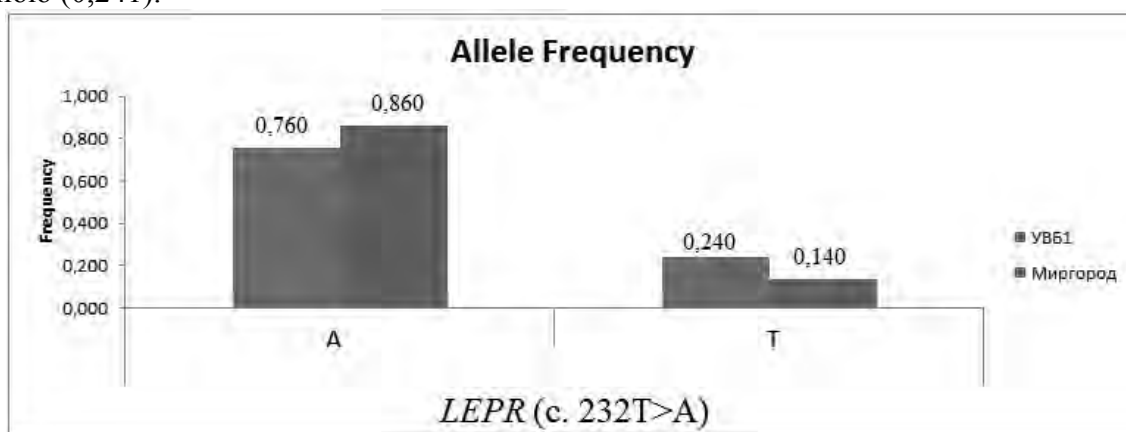


Рис1. Розподіл частот алелів локусу *LEPR* (с. 232Т>А) у досліджених популяціях свиней

Встановлено переважання частоти потенційно небажаного алелю А над селекційно бажаним алелем Т в обох досліджених популяціях свиней. Найвищою частотою алелю А характеризувалися миргородська порода (0,860), в той час як популяція УВБ-1 насичена носіями цього алеля на 0,760. Частота альтернативного алелю Т, навпаки, виявилися дещо вищою у тварин УВБ-1 і склала 0,240, порівняно з 0,140 у досліджених тварин стада миргородської породи.

Висновки. На основі проведеного ДНК-аналізу двох вітчизняних популяцій свиней (миргородської породи та УВБ-1) показаний достатній рівень поліморфізму гену рецептора лептину, що створює сприятливі передумови для проведення асоціативного аналізу з пошуку впливу окремих генотипів локусу *LEPR* (с.232Т>А) на показники м'ясної продуктивності тварин та надалі використання цієї системи як складового елемента маркерної селекції на поліпшення м'ясних якостей у досліджених популяціях.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Дикань, О. С. Генетична структура окремих порід і внутріпородних типів свиней за геном катепсину В / О. С. Дикань // Свинарство. – 2012. – № 61. – С. 138-141.
2. Буслик, Т. В. Поліморфізм гена катепсину L у різних популяціях свиней / Т. В. Буслик, В. М. Балацький, С. М. Корінний // Свинарство. – 2013. – № 62. – С. 48-53.
3. Вплив поліморфізмів гену рецептора меланокортину – 4 (MC4R) на відгодівельні та м'ясні якості помісних, гібридних і чистопорідних свиней великої білої породи / Ю. П. Акнєвський, Т. В. Буслик, Л. П. Гришина, В. М. Балацький // Свинарство. – 2013. – № 63. – С. 28-37.
4. Нор, В. Ю. Поліморфна система периліпінового гену у селекційних програмах по покращенню відгодівельних якостей свиней / В. Ю. Нор, О. І. Метлицька // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2014. – № 3. – С. 5-14. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd_2014_3_3.pdf.
5. Liu, G. A. genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meatquality in a Duroc-Pietrain resource population / G. Liu, D. G. J. Jennen, E. Tholen // Animal Genetics. – N 38. – 2007. – P. 241-252.

6. A QTL for intramuscular fat and backfat thickness is located on porcine chromosome 6 / C. Ovilo, M. Perez-Enciso, C. Barragan, A. Clop, C. Rodriques, C. Oliver, M. Toro, J. Noruera // *Mammalian Genome*. – 2000. – № 11. – P. 344-350.
7. Chen, C. C. Characterization of porcine leptin receptor polymorphisms and their association with reproduction and production traits / C. Chen, T. Chang, H. Su // *Animal Biotechnology*. – N 15. – 2004. – P. 89-102.
8. Missense mutations in exon 4 of the porcine *LEPR* gene encoding extracellular domain and their association with fatness traits / M. Mackowski, K. Szymoniak, M. Szydlowski, M. Kamyczek, R. Eckert, M. Rozycki, M. Switonski // *Animal Genetics*. – N 36. – 2005. – P. 135-137.
9. Корінний, С. М. Шерсть тварин як зручний об'єкт виділення ДНК для аналізу за допомогою ПЛР / С. М. Корінний, К. Ф. Почерняєв, В. М. Балацький // *Ветеринарна технологія*. – 2005. – № 7. – С. 80-83.
10. Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P. Smouse // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – Vol. 6. – P. 288-295.

REFERENCES

1. Dykan', O. S. 2012. Henetychna struktura okremykh porid i vnutriporodnykh typiv svyney za henom katepsynu V – The genetic structure of individual species and types of waste inside the pig gene for cathepsin B. *Svynarstvo – Pig Breeding*. 61:138–141 (in Ukrainian).
2. Buslyk, T. V., V. M. Balats'kyi, and S. M. Korinnyy. 2013. Polimorfizm hena katepsynu L u riznykh populyatsiyakh svyney – Cathepsin D gene polymorphism in different populations of pigs. *Svynarstvo – Pig Breeding*. 62:48–53 (in Ukrainian).
3. Aknyevs'kyi, Yu. P. T. V. Buslyk, L. P. Hryshyna, and V. M. Balats'kyi. 2013. Vplyv polimorfizmiv henu retseptora melanokortynu – 4 (MC4R) na vidhodivel'ni ta m'iasni yakosti pomisnykh, hibrydnykh i chystoporidnykh svyney velykoyi biloyi porody – The impact of gene polymorphisms melanokortynu receptor - 4 (MC4R) on fattening and meat quality local, purebred and hybrid pigs of large white breed. *Svynarstvo – Pig Breeding*. 63:28–37 (in Ukrainian).
4. Nor, V. Yu., and O. I. Metlyts'ka Polimorfna systema perylipinovo henu u selektsiynykh prohramakh po pokrashchennyu vidhodivel'nykh yakostey svyney – Polymorphic gene system perylipin in breeding programs to improve the quality of fattening pigs. *Naukovi dopovidi Natsional'noho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannya Ukrayiny – Scientific reports of National university of life and environmental sciences of Ukraine*. 3:5–14 Rezhym dostupu: http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd_2014_3_3.pdf. (in Ukrainian).
5. Liu G., D. G. J. Jennen, and E. Tholen. A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meatquality in a Duroc-Pietrain resource population. *Animal Genetics*. 38:241–252.
6. Ovilo, C., M. Perez-Enciso, C. Barragan, A. Clop, C. Rodriques, C. Oliver, and M. Toro & J. Noruera A QTL for intramuscular fat and backfat thickness is located on porcine chromosome 6. *Mammalian Genome*. 11:344-350.
7. Chen, C., T. Chang, and H. Su Characterization of porcine leptin receptor polymorphisms and their association with reproduction and production traits. *Animal Biotechnology*. 15:89–102.
8. Mackowski, M., K. Szymoniak, M. Szydlowski, M. Kamyczek, R. Eckert, M. Rozycki and M. Switonski. Missense mutations in exon 4 of the porcine *LEPR* gene encoding extracellular domain and their association with fatness traits. *Animal Genetics*. 36:135-137.
9. Korinnyy, S. M., K. F. Pochernyayev, and V. M. Balats'kyi Sherst' tvaryn yak zruchnyy ob'єkt vydilennya DNK dlya analizu za dopomohoyu PLR - Animal hair as a convenient object selection for DNA analysis by PC. *Veterynarna tekhnolohiya – Veterinary technology*. 7:80–83 (in Ukrainian).
10. Peakall R., and P. Smouse. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6:288–295.