

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ НЕАЛЕЛЬНИХ КАНДИДАТНИХ ГЕНІВ QTL У МІКРОПОПУЛЯЦІЯХ СВИНЕЙ ВЕЛИКОЇ БІЛОЇ ТА МИРГОРОДСЬКОЇ ПОРІД

В. Ю. Нор, здобувач

**Інститут свинарства і агропромислового
виробництва НААН, Полтава**

**О. І. Метлицька, доктор сільськогосподарських наук
Інститут розведення і генетики тварин, с. Чубинське**

Проведено генотипування свиней за локусами OPNin6, ACTN1, FSHв, PLIN1 і PLIN2, показано високий рівень поліморфності всіх використаних маркерних систем. Оцінка асоціацій генів фертильності (OPNin6, ACTN1, FSHв) з локусами периліпіну (PLIN1 і PLIN2) показала існування достовірних асоціацій у двох варіантах поєднань пар локусів у вибірці свиней великої білої породи (PLIN1-ACTN1 ($p < 0,01$) та PLIN2-ACTN1 ($p < 0,01$)), на відміну від популяції свиней миргородської породи, де асоціації між генами досліджуваних локусів були відсутніми.

Гени-кандидати, локуси кількісних ознак, плейотропія, популяція, периліпін, актиніни, остеопонтин, бета-субодиниця фолікулостимулюючого гормону, миргородська порода свиней, велика біла порода свиней.

Згідно із сучасними уявленнями популяційної генетики, одиничною мікроеволюційною подією є не зміна частот алелів окремого гена, а перехід збалансованої системи алелів різних генів із одного стану в інший, що приводить частоти інтегрованих фенотипів у відповідність до умов існування популяції. Відбір сільськогосподарських тварин за комплексом ознак, що мають селективне значення, формує набір інтегрованих фенотипів, характерних для даної штучної популяції. Це, у свою чергу, зумовлює не випадкове поєднання алелів генів, які пов'язані із селективними ознаками, тобто, до виникнення у популяції кореляцій (асоціацій) між ними. Таким чином, взаємодія незчеплених, функціонально не пов'язаних генів, обумовлена відбором за адаптивними та господарсько-корисними ознаками, робить значний внесок у формування загальної структури популяції.

Причинами формування таких асоціацій алелів у популяціях можуть бути нерівновага за зчепленням, не випадкова сегрегація негомологічних хромосом, диференціальна життєздатність гамет або зигот, а також взаємодія вищезазначених причин у процесі відбору інтегральних адаптивних генотипів. Окрім цього, у стадах свійських тварин сільськогосподарського призначення, що умовно можуть розглядатися як відносно замкнені мікропопуляції обмеженої ефективної кількості, косегрегація неалельних генів пов'язана з використанням окремих видатних плідників і

спрямованим підбором батьківських пар [1] для отримання потомків із бажаним рівнем прояву спектра господарських ознак.

Асоціації алелів незалежних генів у популяціях можуть відображувати їх зв'язок із генетичними локусами, що контролюють комплекси ознак, за якими в популяції йде відбір, а також інтенсивність та напрям такого відбору [2].

Асоціації алелів незчеплених функціонально незалежних генетичних систем неодноразово виявлялися у мікропопуляціях свійських свиней. Описані алельні асоціації гена *Hal* (стрес-синдром, обумовлений чутливістю до галотану) з генами *Ada* (аденозиндеаміназа) [3] і алелями системи груп крові *EAG* [4]; алелів *EAG* з геном *Gpi* (глюкозофосфаттізомераза) та *EAH* (система груп крові H) [5]; гена *EAH* з алелями систем груп крові *EAC* і *EAJ* [6].

Вітчизняні дослідники виявили достовірні асоціації окремих генотипів за геном ріанодинового рецептора (*RYR1*) і алелями генів рецептора естрогену (*ESR1*) та гормону росту (*GH*) для порід свиней, що поширені у господарствах України [7].

Використані у нашій роботі локуси, а саме: *OPNin6* (ген остеопонтину), *ACTN1* (ген альфа актиніну 1), *FSHb* (ген бета субодиниці фолікулостимулюючого гормону) та *PLIN* (ген периліпіну), нанесені на генетичну карту свині, для кожного з них показаний зв'язок з окремими адаптивними і господарсько-корисними ознаками [8]. Так, *FSHb*, локалізований у 2-й хромосомі в організмі кнура, регулює окремі стадії сперматогенезу, впливає на статеву поведінку; для свиноматок встановлена асоціація окремих алельних варіантів зі збільшенням багатоплідності [9]. Локус *ACTN1* розташований на 7-й хромосомі та разом з локусами *ACTN2*, *ACTN3*, *ACTN4* формують родину білків актинінів, що впливають на розвиток м'язової системи свині; китайськими вченими на місцевих породах свиней показаний вплив поліморфізму 18 G>A *ACTN1* на відтворювальні якості кнурів, а саме: показники якості сперми [7,10]. Ген остеопонтину знаходиться на 8-й хромосомі, поліморфізм якого пов'язаний з делецією у шостому інтроні (*OPNin6*) та асоційований з функціональними якостями сперми кнура та відсотком імплантації ембріонів у свиноматок азійських порід [7]. *PLIN* – ген, картований на 9-й хромосомі, має дві мутації, асоційовані з господарсько-корисними ознаками: встановлений вірогідний зв'язок генотипу AG за поліморфним сайтом 4119 A>G (*PLIN1*) зі зниженою товщиною шпиків свиней порід ландрас та велика біла, генотипу AA – зі збільшеними середньодобовими приростами тварини; особини генотипу GG характеризуються небажаною осаленістю туш при відгодівлі. За інсерцією 7966 T>C (*PLIN2*) встановлено існування аналогічних асоціацій між генотипом і певною відгодівельною ознакою свиней, причому бажаними генотипами визначені СТ для зменшення товщини шпиків та ТТ для збільшення середньодобового приросту молодняку на відгодівлі [11].

Мета досліджень – пошук міжлокусних асоціацій незчеплених генів локусів окремих QTL свиней великої білої і миргородської порід для

встановлення рівня їх генетичної консолідованості для розробки подальшої селекційної стратегії за допомогою молекулярно-генетичних маркерів.

Матеріали та методи досліджень. У роботі використано дані по 49 племінних тваринах миргородської породи (ДП ДГ ПЗ ім. Декабристів) та 67 свинях великої білої породи (АФ СВК “Оржицька”, ДПДГ “Степне”, ПАФ “Україна”, ТОВ “Маяк”). Від піддослідних тварин відбирали зразки щетини з кореневими цибулинами, з яких в подальшому виділяли геномну ДНК за допомогою реагенту «Chelex 100» [12]. Генотипування за локусами *OPNin6*, *ACTN1*, *FSHb*, *PLIN1* і *PLIN2* проводили згідно з рекомендаціями [8], за використання реактивів фірми «Fermentas» (Литва). Комплекс врахованих селекційно значущих кількісних ознак включає показник середньодобового приросту, товщини шпигу на рівні VI–VII грудних хребців та результатів контрольної відгодівлі. Статистичне опрацювання результатів аналізу здійснено стандартними методами [13]. В якості величини, що показує ступінь асоціації дискретних якісних ознак у популяції, використано коефіцієнт асоціації (тетрахоричний показник зв'язку), достовірність якого оцінювали критерієм χ^2 -квадрат (42) [14]. Весь обсяг робіт було виконано на базі лабораторії генетики Інституту свинарства і АПВ НААН України.

Результати досліджень. ДНК-типування тварин за локусами *OPNin6*, *ACTN1*, *FSHb*, *PLIN1* і *PLIN2* свідчить (табл. 1), що всі досліджувані маркерні системи є високополіморфними (рівень генетичного поліморфізму суттєво варіював залежно від породної належності тварин та певного локусу), що створює можливості для проведення пошуку міжлокусних асоціацій. Для вибірки тварин великої білої породи встановлено статистично достовірне відхилення від збалансованого розподілу генотипів за формулою Гарді-Вайнберга: за локусом остеопонтину зафіксовано суттєвий надлишок гомозиготних генотипів BB ($p < 0.001$), що відбилося на значенні коефіцієнта фіксації. Аналогічна тенденція у великої білої породи спостерігається і за розподілом генотипів за поліморфними сайтами гена периліпіну (*PLIN1*, *PLIN2*), а рівень інбредних тварин із загальної кількості обстежених становив 0,552 і 0,441, відповідно. Привертає увагу переважання рівня фактичної гетерозиготності над очікуваною для вибірки тварин миргородської породи: унаслідок цього, за локусами *OPNin6*, *ACTN1*, *FSHb* і *PLIN2* спостерігалось негативне значення індексу фіксації, а для останньої з перелічених генетичних систем його рівень сягав -0,581. Таке явище можна пояснити лише селекційним підходом, застосованим у стаді свиней миргородської породи племзаводу ім. Декабристів. Це племінне господарство залишилося практично єдиним, де розводять згадану породу свиней, яка знаходиться на межі повного зникнення.

Відомо, що за більшістю відгодівельних якостей (особливо за показниками скороспілості, інтенсивності росту та конверсії корму) миргородська порода поступається спеціалізованим м'ясним генотипам і навіть чистопородним свиням великої білої породи англійської і датської селекції. Тому для зниження рівня інбридингу в стаді, а також підвищення конкурентоспроможності, зниження рівня збитковості утримання чисто-

породних миргородських свиней було прийнято рішення про створення нових генеалогічних ліній за використання свиней ультрам'ясної породи п'єстрен і застосування кнурів саме цієї породи для отримання молодняку для відгодівлі. Таким чином, отримані генетико-популяційні параметри у нашому дослідженні підтверджують наявність серед досліджених тварин відгодівельного поголів'я представників новостворюваної лінії Маркіза (із покращеними відгодівельними якостями), а також, не виключено, помісних свиней різної долі кровності.

1. Генетико-популяційна характеристика свиней за локусами *OPNin6*, *ACTN1*, *FSH α* , *PLIN1* і *PLIN2*

Порода	Частоти					Гетеро-зиготність		Фіксаційний індекс (F)
	Генотипів (фактична/очікувана)			Алелів		Фактична (Ho)	Очікувана (He)	
	AA	AB	BB	A	B			
OPNin6								
Велика біла	0,065 (0,004)	0,000 (0,122)	0,935 (0,874)***	0,065	0,935	0,000	0,122	1,000
Миргородська	0,000 (0,019)	0,273 (0,236)	0,727 (0,746)	0,136	0,864	0,273	0,236	-0,158
ACTN1								
Велика біла	0,391 (0,322)	0,369 (0,488)	0,240 (0,180)	0,576	0,424	0,370	0,488	0,243
Миргородська	0,455 (0,465)	0,455 (0,434)	0,090 (0,101)	0,682	0,318	0,455	0,434	-0,048
FSH α								
Велика біла	0,565 (0,612)	0,435 (0,340)	0,000 (0,047)	0,783	0,217	0,435	0,340	-0,278
Миргородська	0,636 (0,669)	0,364 (0,298)	0,000 (0,033)	0,818	0,182	0,364	0,298	-0,222
PLIN1								
	AA	AG	GG	A	G			
Велика біла	0,304 (0,171)	0,218 (0,485)	0,478 (0,3450)***	0,413	0,587	0,217	0,485	0,552
Миргородська	0,388 (0,338)	0,388 (0,487)	0,224 (0,175)	0,582	0,418	0,388	0,487	0,203
PLIN2								
	CC	CT	TT	C	T			
Велика біла	0,478 (0,384)	0,283 (0,471)	0,239 (0,145)**	0,620	0,380	0,283	0,471	0,401
Миргородська	0,265 (0,400)	0,735 (0,465)*	0,000 (0,135)***	0,633	0,367	0,735	0,465	-0,581

Примітка: *** - $p \leq 0,001$, ** - $p \leq 0,01$, * - $p \leq 0,05$, критерій χ^2

Головна ідея проведення дослідів з пошуку міжлокусних асоціацій між кандидатними генами відгодівельних та репродуктивних якостей полягала у статистичному прогнозуванні ймовірності існування негативних плеiotропних ефектів фізично не зчеплених, функціонально альтернативних генів. Адже, виключення можливих ризиків негативного впливу добору тварин за генотипами периліпінового локусу на рівень їх фертильності й навпаки, створить передумови щодо можливості впровадження розроблених

маркерних систем у практику вітчизняної маркерної селекції. Крім цього, виявлення стійких асоціацій генів може бути додатковим критерієм породоспецифічності та консолідованості досліджуваного масиву тварин.

Аналіз асоціацій генів фертильності (*OPNin6*, *ACTN1*, *FSH β*) з локусами периліпіну (*PLIN1* і *PLIN2*) виявив певні статистично достовірні зв'язки (табл. 2). Згідно з отриманими результатами показано, що достовірні асоціації спостерігаються лише у двох варіантах поєднань пар локусів і тільки у вибірці свиней великої білої породи (*PLIN1-ACTN1* ($p < 0,01$) та *PLIN2-ACTN1* ($p < 0,01$)), на відміну від популяції свиней миргородської породи, де виявити асоціації досліджуваних локусів обраними статистичними методами не вдалося.

2. Міжлокусні асоціації у популяціях великої білої та миргородської порід свиней

Пари локусів	Коефіцієнт асоціації	
	Велика біла порода, n=67	Миргородська порода, n=49
<i>PLIN1-ACTN1</i>	0,246**	-
<i>PLIN1-OPNin6</i>	-	-
<i>PLIN1-FSHβ</i>	-	-
<i>PLIN2-ACTN1</i>	0,249**	-
<i>PLIN2-OPNin6</i>	-	-
<i>PLIN2-FSHβ</i>	-	-

Примітка: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, критерій χ^2

Цей факт, очевидно, зумовлений більшим рівнем генетичної гомогенності, а отже, і генетичної консолідованості свиней великої білої породи досліджуваної мікропопуляції. Встановлений відносно низький рівень поліморфізму може бути зумовлений процесами цілеспрямованого відбору кращих тварин за комплексом селекціонованих господарсько-корисних ознак у господарстві для подальшої їх постановки на контрольну відгодівлю, використанням обмеженої кількості плідників, переважно гомозиготних за дослідженими генами.

Висновки

Отримані нами дані свідчать, що у популяції свиней великої білої породи існують достовірні асоціації між маркерами незалежних менделівських генів (*PLIN1-ACTN1* і *PLIN2-ACTN1*), алелі яких корелюють із селекціонованими кількісними ознаками продуктивності свиней. На жаль, жодної міжгенної асоціації для вибірки тварин миргородської породи не було виявлено. Це свідчить про проходження процесів генетичного дрейфу внаслідок аутбридингу у даній мікропопуляції, що було зазначено вище, а також обмеженою кількістю вибірки, яка була доступна для проведення молекулярно-генетичного, статистичного та популяційного аналізу.

Відносно встановлених генних асоціацій для свиней великої білої породи можна передбачити існування функціонального зв'язку складної фізіологічної природи. Згідно з отриманими даними (табл.1), переважаюча

кількість тварин бажаного *ACTN1* генотипу мала високу концентрацію *PLIN1-G*, *PLIN2-C* алелів, що впливають на швидку осаленість туш. Це є підтвердженням загальновідомого факту кращої якості спермопродуктивності у свиней сального і універсального напрямку продуктивності, порівняно з тваринами ультрам'ясних порід, для яких селекція на підвищення м'ясних та відгодівельних якостей призводить, здебільшого, до зниження окремих параметрів фертильності, а саме: якості сперми та запліднювальної здатності. Встановлення таких небажаних плейотропних ефектів неалельних локусів *PLIN1-ACTN1* може знижувати ефект селекції за одночасного добору тварин із підвищеними відгодівельними та репродуктивними якостями. Задачею селекціонера буде також необхідність порушення небажаних міжгенних асоціацій. У цьому аспекті кращого ефекту від використання маркерної селекції за *PLIN* генотипами можна очікувати у стаді свиней миргородської породи, проте дане припущення потребує додаткових генетико-статистичних досліджень на розширеній вибірці тварин.

Необхідно зазначити, що наявність асоціації *PLIN1-ACTN1* може бути пов'язана із впливом обох генів на інтенсивність росту свиней – перший з них контролює жировий обмін, а другий входить до каскаду генів-актинінів, що обумовлюють ріст м'язової тканини. Таким чином, характер виявлених міжгенних взаємодій можна пояснити наявністю полімерії неалельних генів *PLIN1-ACTN1* та плейотропних ефектів саме для *ACTN1* локусу, оскільки він впливає одночасно на показники відгодівельних і репродуктивних якостей.

Варто зазначити, що асоціації досліджуваних генетичних маркерів поліморфних систем, очевидно, повинні бути представлені і в інших популяціях свиней, що підлягають інтенсивному тиску відбору. Вони є важливою характеристикою популяцій, що відображують невідповідність процесів комбінації алельних варіантів незалежних генів при формуванні морфотипу, що адекватно відповідає умовам відбору. Існування у популяції асоціацій маркерів менделівських генів може також вказувати на зчеплення маркерних генів із генетичними локусами, що детермінують формування комплексу кількісних ознак, за якими проводиться добір.

Список літератури

1. Взаимодействие полиморфных систем семиреченской породы / И. Г. Горелов, С. В. Никитин, Г. В. Орлова [и др.]. // Генетика животных. – 2000. – № 5. – С. 688–692.
2. Ассоциации генетических маркеров в двух родственных породах свиней / С. П. Князев, С. В. Никитин, И. Г. Горелов [и др.] // Генетика животных. – 1999. – № 5. – С. 674–680.
3. Vogeli P. Genfrequenzen wiehtiger polymorpher systeme des veredelten Landschweines bei indexselektion in positive und negative riehtung / Vogeli P., Gerwig C., Schneebeh H. – Schweiz. Landw. Monatshefte. – 1982. – Vol. 60. – P. 234–240.
4. Jorgensen P. F. Polymorphic systems in blood. Associations with porcine halothane sensitivity and meat quality / P. F. Jorgensen. – Acta Agr. Scand. – 1979. – Vol. 21. – P. 389–395.

5. Fries R. Genkartierung bei landwirtschaftlichen nutztieren: gegenwartiger stand, eigene untersuchungen und anwendungsmoglichkeiten / Fries R., Dolf G., Stranzinger G. – Schweiz. Landw. Monatshefte. – 1982. – Vol. 60. – P. 205–221.

6. Тихонов В. И. Использование генофонда европейских среднеазиатских кабанов для изучения связи систем E групп крови с продуктивностью и его хромосомная локализация / Тихонов В. И., Бобович В. Е., Солодуха К. В. // Морфология и генетика гибридных свиней. – 1992. – С. 17–23.

7. Балацький В. М. Асоціації генів у популяції свиней великої білої породи англійської селекції / В. М. Балацький, Т. В. Овсяник, С. М. Корінний // Свинарство. – Полтава, 2008. – № 56. – С. 41–45.

8. Cailu L. Candidate gene analysis for loci affecting sperm quality and fertility of boar: dr. agricultural sci. diss. / Cailu Lin. – Bonn, 2005. – 216 p.

9. Rohrer G. A. Mapping the α subunit of follicle stimulating hormone (FSHB) in the porcine genome / G. A. Rohrer, L. J. Alexander, C. W. Beattie // Mammalian genome. – 1994. – № 5. – P. 315–317.

10. Cheri M. Hampton. Novel structures for β -actinin: F-actin interactions and their implications for actin-membrane attachment and tension sensing in the cytoskeleton / Cheri M. Hampton, Dianne W. Taylor, Kenneth A. Taylor. – NIH Public Access. J Mol Biol. – 2008. – № 368. – P. 92–104.

11. Vykoukalova Z. Porcine perilipin (PLIN) gene: Structure, polymorphism and association study in Large White pigs / Vykoukalova Z., Knoll A., Iepica S. – Czech J. Anim. Sci. – 2009. – № 54. – P. 359–364.

12. 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 біотехнологія. – 2005. – № 7. – С. 80–83.

13. Плохинский Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский. – М. : Колос, 1969. – 255 с.

14. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.

Проведено генотипирование свиней по локусам OPNin6, ACTN1, FSH β , PLIN1 и PLIN2, показан высокий уровень полиморфности всех использованных маркерных систем. Оценка ассоциаций генов фертильности (OPNin6, ACTN1, FSH β) с локусами перилипина (PLIN1 и PLIN2) показала существование достоверных ассоциаций в двух вариантах сочетаний пар локусов в выборке свиней крупной белой породы (PLIN1-ACTN1 ($p < 0,01$) и PLIN2-ACTN1 ($p < 0,01$)) в отличие от популяции свиней мизгородской породы, где ассоциации между генами исследуемых локусов отсутствовали.

Гены-кандидаты, локусы количественных признаков, плейотропия, популяция, перилипин, актинины, остеопонтин, бета-субъединица фолликулостимулирующего гормона, мизгородская порода свиней, крупная белая порода свиней.

It has been carried out the pig genotyping for loci OPNin6, ACTN1, FSH β , PLIN1 and PLIN2. It was showed showed a high level of polymorphism of all used marker systems. Evaluation of associations fertility genes (OPNin6, ACTN1, FSH β) according to perilipin loci (PLIN1 and PLIN2) showed the existence of significant associations in two variants of combinations of pairs of loci in a sample of Large White breed of pigs (PLIN1-ACTN1 ($p < 0.01$) and

PLIN2-ACTN1 ($p < 0.01$)) in contrast to the population of Myrgorod breed of pigs, where the association between the genes of studied loci were absent.

Candidate genes, quantitative trait loci, pleiotropy, population, perilipin, actinins, osteopontin, beta-subunit of follicle-stimulating hormone, myrgorod pig breed, large white pig breed.