

М.А. КОВАЛЬЧУК, А.И. ГАНДЖА, Н.В. ЖУРИНА, О.П. КУРАК,
В.П. СИМОНЕНКО, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, И.В. КИРИЛЛОВА

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СВИНЕЙ ПО ГЕНАМ PRKAG3, RYR1 И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ПОЛИМОРФИЗМА

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

Проведено генотипирование свиней по генам PRKAG3 и RYR1 методом ПЦР-ПДРФ. Объектом исследования являлись свиньи пород: белорусской крупной белой (БКБ), белорусской мясной (БМ); ландрас (Л), дюроч (Д), йоркшир (Й), разводимые в селекционно-гибридных центрах республики. При молекулярно-генетическом тестировании был выявлен полиморфизм генов PRKAG3 и RYR1 у животных различных пород и половозрастных групп (хряков-производителей, свиноматок, откормочного молодняка), представленный аллелями PRKAG3^I, PRKAG3^V и RYR1^N, RYR1ⁿ, и идентифицированы генотипы PRKAG3^{VV}, PRKAG3^{VI}, PRKAG3^{II}, RYR1^{NN}, RYR1^{Nn}. Было установлено, что в среднем по всем изучаемым породам наибольшая концентрация предпочтительного генотипа PRKAG3^{II} наблюдалась у животных породы ландрас – 21,05 %, а наименьшая – у животных белорусской крупной белой породы (5,51 %). В целом концентрация желательного аллеля PRKAG3^I у животных исследуемых пород находилась на низком уровне и в среднем составила 0,24-0,50. По гену RYR1 в среднем по породам частота встречаемости животных с генотипом RYR1^{NN}, свободных от мутации, составила 90,23-100 %, носителей мутантного гена RYR1^{Nn} – 5,45-9,77 %.

Ключевые слова: генотипирование, свиньи, породы, селекционно-гибридные центры, полиморфизм, хряки-производители, свиноматки, откормочный молодняк, генотипы, концентрация, частота, аллель, структура, маркеры, селекция.

M.A. KOVALCHUK, A.I. GANDZHA, N.V. ZHURINA, O.P. KURAK, V.P. SIMONENKO,
L.L. LETKEVICH, I.V. KIRILLOVA

PIGS GENOTYPING BY PRKAG3 AND RYR1 GENES AND STUDY OF THEIR POLYMORPHISM

RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus
on Animal Husbandry»

Genotyping of pigs by PRKAG3 and RYR1 genes by PCR-RFLP method. The object of research were pigs of the following breeds: Belarusian Large White (BLW), Belarusian Meat (BM); Landrace (L), Duroc (D), Yorkshire (Y), bred in the breeding and hybrid centers of the republic. At molecular and genetic testing polymorphism of PRKAG3 and RYR1 genes was determined with animals of different breeds and sex and age groups (boars producers, sows and young animals at fattening), represented by alleles PRKAG3^I, PRKAG3^V and RYR1^N, RYR1ⁿ, and genotypes PRKAG3^{VV}, PRKAG3^{VI}, PRKAG3^{II}, RYR1^{NN}, RYR1^{Nn} were identified. It was found that averagely for all the breeds studied the highest concentration of the preferred PRKAG3^{II} genotype was observed in Landrace breed animals – 21,05 %, and the lowest - in animals of Belarusian Large White breed (5,51 %). In general, the concentration of preferred allele PRKAG3^I in the breeds studied was low and averaged 0,24-0,50. By RYR1 gene averagely

by breeds the frequency of occurrence of animals with RYR1^{NN} genotype, free of mutations, was 90,23-100 %, and carriers of the mutant gene RYR1^{Nn} – 5,45-9,77 %.

Key words: genotyping, pigs, breeds, selection and hybrid center, polymorphism, boars producers, sows, young animals at fattening, genotypes, concentration, frequency, allele structure, markers, selection.

Введение. Современное свиноводство, как в нашей республике, так и за рубежом, развивается и совершенствуется на основе достижений науки и техники. Инновационные программы наряду с использованием передовых ресурсосберегающих, энергосберегающих и экологически безопасных технологий предусматривают внедрение эффективных селекционно-генетических и биологических методов совершенствования лучших отечественных пород и линий свиней.

Использование генетических маркеров является перспективным направлением, однако требует дифференцированного подхода в зависимости от породной принадлежности, генетической структуры популяции и конкретной селекционной задачи. В нашей республике потребность селекционной практики в эффективном использовании ДНК-маркирования продуктивных качеств животных возрастает с каждым годом, что обуславливает актуальность научных исследований в данной области. Результаты ряда исследований свидетельствуют, что использование ДНК-маркеров в селекции позволяет повысить продуктивность животных до 20 % [1, 2].

Наиболее важным селекционным признаком свиней является мясная продуктивность. На качество мяса и его технологические свойства оказывает влияние ген PRKAG3, в котором выявлено несколько точковых мутаций. В 2001 г. учёными D. Ciobanu et al. [3] была обнаружена точковая мутация в гене PRKAG3, которая была идентифицирована в 199 кодоне. Данная мутация вызывает замену валина изолейцином (V199I) в аминокислотной последовательности субъединицы γ АМФ-активируемой протеинкиназы. Она детерминирует снижение содержания гликогена, лактата и повышение рН мяса, ассоциирована с более высокими показателями качества мяса. В результате проведённых ранее исследований установлена тенденция положительного влияния аллеля PRKAG3^I и генотипа PRKAG3^{II} на такие показатели мясной продуктивности свиней, как длина туши, масса задней трети полу-туши и площадь «мышечного глазка», а также на показатели качества мяса: уровень рН, потеря мясного сока при нагревании, влагоудерживающая способность, содержание внутримышечного жира и протеина [4].

Считается, что одной из основных причин снижения продуктивности у свиней является рост частоты встречаемости подверженных стрессу животных, вызванный мутацией в гене RYR1.

Мутация в гене RYR1 происходит в результате замены нуклеотида С на Т в позиции 1843 и сопровождается изменением аминокислотной последовательности рианодин-рецепторного белка в положении 615 – аминокислота аргинин заменяется аминокислотой цистеин. Показано, что данная точковая мутация обуславливает развитие у животных злокачественной гипертермии – наследуемого синдрома, проявляющегося как состояние остро го гиперметаболизма скелетной мускулатуры с повышенным потреблением кислорода, накоплением лактата и продукцией большого количества углекислого газа и тепла.

Установлено, что частота встречаемости мутации в гене RYR1 зависит от породной принадлежности, популяции, линии и половозрастной группы.

Результаты проведённых ранее исследований свидетельствуют о закономерности негативного влияния мутации в гене RYR1, выразившегося в понижении показателей откормочной продуктивности на 5-8,4 % ($P < 0,01$), мясной продуктивности – до 10 %, а также ухудшении качества мяса (30 % порок PSE и 10 % DFD) [5].

Цель наших исследований – генотипирование свиней по генам PRKAG3, RYR1 и изучение их полиморфизма.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в 2010-2014 гг. в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Базовыми хозяйствами были: РСУП «СГЦ «Заднепровский» Витебской, РУСП «СГЦ «Западный» Брестской, РУСП «СГЦ «Вихра» Могилевской, РСПУП «СГЦ «Заречье», РУП «СК «Заря» Гомельской, ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Минской областей.

Объектом исследования для проведения молекулярно-генетического тестирования по генам PRKAG3 ($n=438$) и RYR1 ($n=922$) являлись свиньи пород: белорусской крупной белой (БКБ), белорусской мясной (БМ); ландрас (Л), дюрок (Д), йоркшир (Й).

Для изучения полиморфизма генов PRKAG3 и RYR1 у исследуемых животных были взяты биопробы ткани, спермы и крови, из которых выделена ДНК перхлоратным методом [6].

Генотипирование свиней по генам PRKAG3 и RYR1 проводили методом ПЦР-ПДРФ, при этом использовали олигонуклеотидные праймеры следующих последовательностей:

PRKAG3 F: 5' - GGAACGATTACCCCTCAACT - 3' ;

PRKAG3 R: 5' - AGCTCTGCTTCTTGCTGTCC - 3' .

RYR1 F: 5' - GTGCTGGATGTCCTGTGTTCCCT-3' ;

RYR1 R: 5' - CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG-3' .

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь объёмом 25

мкл, включающую: 100 нг ДНК, праймеры в количестве 25 пМ, по 200 мкМ каждого из дНТФ, 1х буфер (10 мМ трис рН 8,6, 50 мМ КСl, 0,1 % tween-20), 1,5 мМ MgCl₂ и 2,5 ед. акт. Таq-полимеразы.

ПЦР проводили в термоциклерах «DNA Engine Tetrad2», «MJ Mini» («Bio-Rad», США) по следующим программам:

- для гена PRKAG3 - «горячий старт» - 94 °С – 5 мин.; 30 циклов: денатурация – 94 °С – 1 мин., отжиг – 64 °С – 1 мин., элонгация – 72 °С – 1 мин.; достройка при 72 °С – 5 мин;

- для гена RYR1 - «горячий старт» - 94 °С – 5 мин.; 30 циклов: денатурация – 94 °С – 30 сек., отжиг – 60 °С – 30 сек., элонгация при 72 °С – 30 сек.; достройка при 72 °С – 5 мин.

Концентрацию и степень чистоты препаратов ДНК оценивали с использованием спектрофотометра GeneQuant 1300 (Healthcare).

Продукты ПЦР амплификации фрагментов генов PRKAG3 и RYR1 расщепляли рестриктазами VsaNI и Hin61, соответственно.

При расщеплении фрагментов гена PRKAG3 идентифицируются следующие генотипы (рисунок 1): PRKAG3^{VV} (гомозиготный генотип), PRKAG3^{VI} (гетерозиготный генотип), PRKAG3^{II} (гомозиготный генотип, детерминирующий повышение откормочной и мясной продуктивности).

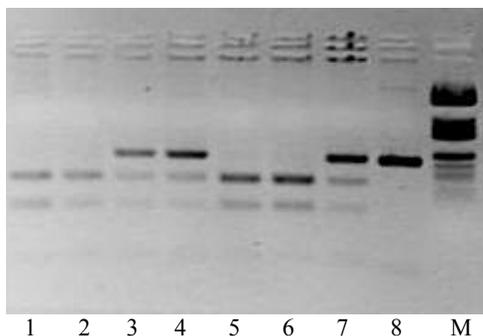


Рисунок 1 – Электрофореграмма фрагментов рестрикции ДНК свиней с генотипами: PRKAG3^{VV} (дорожки 1, 2, 5, 6), PRKAG3^{VI} (дорожки 3, 4, 7) и PRKAG3^{II} (дорожка 8); М - маркерная ДНК pBR322/ BsuRI

Продукты амплификации и рестрикции разделяли электрофоретически в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Фракции нуклеиновых кислот в гелях визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете с использованием компьютерной видеосистемы Infinity-3026 (Vilber Lourmat, Франция).

Полученные результаты обрабатывали по стандартным биометрическим методикам [7].

Результаты эксперимента и их обсуждение. При молекулярно-генетическом тестировании был выявлен полиморфизм гена PRKAG3 у животных различных пород и половозрастных групп (хряки-производители, свиноматки, откормочный молодняк), представленный двумя аллелями PRKAG3^I, PRKAG3^V (таблица 1).

Таблица 1 – Генетическая структура по гену PRKAG3 различных пород и половозрастных групп свиней из СГЦ «Заднепровский»

Порода	Половозрастная группа	n	Частота встречаемости				
			генотипов, %			аллелей	
			VV	VI	II	V	I
БМ	ХП	47	44,68	46,81	8,51	0,681	0,319
	С	116	57,76	38,79	3,45	0,772	0,228
	ОМ	60	20,0	65,0	15,0	0,525	0,475
БКБ	ХП	37	43,24	43,24	13,51	0,649	0,351
	С	69	60,87	39,13	-	0,804	0,196
	ОМ	6	50,0	33,33	16,67	0,667	0,333
Д	ХП	16	62,50	25,0	12,50	0,75	0,25
	С	20	60,0	40,0	-	0,80	0,20
	ОМ	16	37,50	43,75	18,75	0,594	0,406
Л	ХП	13	30,77	53,85	15,38	0,577	0,423
	ОМ	6	-	66,67	33,33	0,333	0,667
Й	ХП	10	50,0	50,0	-	0,75	0,25
	ОМ	5	60,0	20,0	20,0	0,70	0,30
БКБ ¹	С	15	73,33	20,0	6,67	0,833	0,167

Примечание: ¹ – свиноматки, разводимые в СГЦ «Западный», ХП – хряки-производители, С – свиноматки, ОМ - откормочный молодняк

При анализе половозрастных групп в пределах каждой исследуемой породы было установлено, что большей частотой встречаемости желательного генотипа PRKAG3^{II} и аллеля PRKAG3^I характеризовались группы откормочного молодняка, размах частот варьировал от 15,0 % и 0,475 (белорусская мясная порода) до 33,33 % и 0,667 (порода ландрас), соответственно. Анализ популяций хряков-производителей показал, что концентрация генотипов PRKAG3^{II} изменялась от 8,51 % (белорусская мясная порода) до 15,38 % (порода ландрас) и гетерозиготного генотипа PRKAG3^{VI} – от 25,0 % (порода дюрок) до 53,85 % (порода ландрас). Наименьшая встречаемость генотипа PRKAG3^{II} и аллеля PRKAG3^I наблюдалась у свиноматок (от 3,45 % и 0,228 – белорусская мясная порода до 6,67 % и 0,167 – белорусская крупная белая порода из СГЦ «Западный», соответственно). В популяциях свиноматок породы дюрок и белорусской крупной белой животные генотипа

PRKAG3^{II} отсутствовали. Не выявлен генотип PRKAG3^{II} у популяции хряков-производителей породы йоркшир. Также следует отметить, что наибольшая частота встречаемости гетерозиготного генотипа PRKAG3^{VI} наблюдалась в популяциях откормочного молодняка (65,0 % - белорусской мясной породы и 66,67 % - породы ландрас). Концентрация гетерозиготного генотипа PRKAG3^{VI} в популяциях хряков-производителей находилась на уровне: 25,0 % (порода дюрок), 50,0 % (порода йоркшир), 53,85 % (порода ландрас).

Характеризуя генетическую структуру по гену PRKAG3 в среднем по всем изучаемым породам можно отметить, что наибольшая концентрация предпочтительного генотипа PRKAG3^{II} наблюдалась у животных породы ландрас – 21,05 %, а наименьшая у животных белорусской крупной белой породы – 5,51% (таблица 2).

Таблица 2 – Генетическая структура по гену PRKAG3 различных пород

Порода	n	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллелей	
		VV	VI	II	V	I
БМ	223	44,84	47,53	7,62	0,686	0,314
БКБ	127	56,69	37,80	5,51	0,756	0,244
Д	54	51,85	35,19	12,96	0,694	0,306
Л	19	21,05	57,89	21,05	0,50	0,50
Й	15	53,33	40,0	6,67	0,733	0,267

Высокая концентрация гетерозиготного генотипа PRKAG3^{VI} и предпочтительного аллеля PRKAG3^I отмечалась у животных белорусской мясной породы (47,53 % и 0,314) и породы ландрас (57,89 % и 0,50).

Проведённое молекулярно-генетическое тестирование животных различных пород, популяций и половозрастных групп выявило полиморфизм гена RYR1, представленный двумя аллелями: RYR1^N – без мутации, RYR1ⁿ – с точковой мутацией (таблица 3).

Анализ полиморфизма гена RYR1 белорусской мясной породы свиней и породы дюрок выявил изменчивость частот встречаемости генотипов RYR1^{NN} (свободные от стресса) и RYR1^{Nn} (носители мутантного аллеля) в зависимости от популяции и половозрастной группы животных.

При анализе половозрастных групп в пределах каждой исследуемой породы было установлено, что наибольшей частотой встречаемости гетерозиготного генотипа RYR1^{Nn} и аллеля RYR1ⁿ характеризовались группы хряков-производителей породы дюрок из СГЦ «Западный» (28,6 % и 0,14, соответственно) и откормочного молодняка бело-

русской мясной породы из СГЦ «Заднепровский» (26,7 % и 0,13, соответственно). Наименьшая частота встречаемости гетерозиготного генотипа RYR1^{Nn} и аллеля RYR1ⁿ наблюдалась у свиноматок белорусской мясной породы из СГЦ «Западный» (1,5 % и 0,01, соответственно).

Таблица 3 – Генетическая структура по гену RYR1 различных пород, популяций и половозрастных групп свиней, разводимых в республике

Порода	Наименование хозяйства	n	Частота встречаемости			
			генотипов, %		аллелей	
			NN	Nn	N	n
1	2	3	4	5	6	7
Хряки-производители						
БМ	СГЦ «Заднепровский»	47	91,5	8,5	0,96	0,04
БКБ	СГЦ «Заднепровский»	34	100	-	1	-
Л	«ЖодиноАгро-ПлемЭлита»	30	100	-	1	-
Й	«ЖодиноАгро-ПлемЭлита»	50	100	-	1	-
Й	СГЦ «Заднепровский»	34	100	-	1	-
Д	СГЦ «Западный»	7	71,4	28,6	0,86	0,14
Д	СК «Заря»	10	80,0	20,0	0,90	0,10
Свиноматки						
БМ	СГЦ «Западный»	67	98,5	1,5	0,99	0,01
БКБ	СГЦ «Заречье»	14	100	-	1	-
БКБ	СГЦ «Западный»	161	100	-	1	-
Л	«ЖодиноАгро-ПлемЭлита»	24	100	-	1	-
Откормочный молодняк						
БМ	СГЦ «Заднепровский»	60	73,3	26,7	0,87	0,13
Д	СГЦ «Заднепровский»	16	93,7	6,3	0,97	0,03
Ремонтные свинки						
Д	СГЦ «Западный»	50	92,0	8,0	0,96	0,04
БКБ	СГЦ «Западный»	24	100	-	1	-
БКБ	СГЦ «Вихра»	35	100	-	1	-
Л	«ЖодиноАгро-ПлемЭлита»	55	100	-	1	-

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
Й	«ЖодиноАгро-ПлемЭлита»	27	100	-	1	-
Ремонтные хрячки						
БКБ	СГЦ «Западный»	39	100	-	1	-
БКБ	СГЦ «Вихра»	15	100	-	1	-

Выявлено, что все исследуемые животные белорусской крупной белой породы (n=322) были свободными от мутации, концентрация желательного генотипа RYR1^{NN} составила 100 %.

Популяции хряков-производителей (СГЦ «Заречье», n=6) и хрячки (СГЦ «Западный», n=35) белорусской мясной породы характеризовались как свободные от стресса и имели предпочтительный генотип RYR1^{NN}. Три группы животных породы дюрок (хряки из СГЦ «Заднепровский» n=16, ремонтные свинки и хрячки из СГЦ «Вихра» n=35 и n=31) также имели гомозиготный генотип RYR1^{NN}. Желательный генотип RYR1^{NN} наблюдался у животных породы ландрас из ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» (хряки, свиноматки и ремонтные свинки).

В среднем по породам частота встречаемости животных с генотипом RYR1^{NN}, свободных от мутации, составила 90,23-100 %, носителей мутации RYR1^{Nn} – 5,45-9,77 % (таблица 4).

Таблица 4 – Генетическая структура по гену RYR1 различных пород

Порода	n	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллелей	
		NN	Nn	nn	N	n
БМ	215	90,23	9,77	-	0,95	0,05
БКБ	322	100	-	-	1	-
Д	165	94,55	5,45	-	0,97	0,03
Л	109	100	-	-	1	-
Й	111	100	-	-	1	-

Проведённый анализ выявил, что протестированные животные трёх пород: белорусская крупная белая, ландрас и йоркшир характеризовались как свободные от стресса и имели гомозиготный генотипом RYR1^{NN}.

Заключение. Таким образом, можно сделать вывод, что в целом концентрация желательного генотипа PRKAG3^{II} и аллеля PRKAG3^I у животных исследуемых пород находится на низком уровне и в среднем составляет 5-20 % и 0,24-0,50, соответственно. По нашему мнению, на установленные отличия частот встречаемости предпочтитель-

ного генотипа PRKAG3^{II} и аллеля PRKAG3^I на межпородном уровне, а также в зависимости от половозрастной группы животных оказывает влияние направления селекции в изучаемых племенных хозяйствах и селекционно-гибридных центрах. Поэтому для накопления желательного аллеля PRKAG3^I у животных данных пород дальнейшую селекцию следует проводить с учётом отбора и подбора свиноматок и хряков-производителей с гетерозиготными PRKAG3^{VI} и гомозиготными PRKAG3^{II} генотипами.

В результате проведённого нами скрининга гена RYR1 установлена изменчивость частот аллеля RYR1ⁿ не только на межпородном, межпопуляционном уровне, но и в зависимости от половозрастной группы, что свидетельствует о необходимости обязательного генетического контроля племенных животных.

Литература

1. Зиновьева, Н. А. Проблемы биотехнологии и селекции сельскохозяйственных животных / Н. А. Зиновьева, Л. К. Эрнст. – Дубровицы, 2006. – 326 с.
2. Шейко, И. П. Генетические методы интенсификации селекционного процесса в свиноводстве : моногр. / И. П. Шейко, Т. И. Епишко ; Ин-т животноводства НАН Беларуси. – Жодино, 2006. – 197 с.
3. Evidence for New Alleles in the Protein Kinase Adenosine Monophosphate-Activated3-Subunit Gene Associated With Low Glycogen Content in Pig Skeletal Muscle and Improved Meat Quality / D. Ciobanu [et al.] // Genetics. – 2001. - № 159. – P. 1151-1162.
4. Журина, Н. В. Анализ полиморфизма гена PRKAG3 и продуктивности откормочного молодняка свиней белорусской мясной породы различных генотипов по изучаемому гену / Н. В. Журина, М. А. Ковальчук // Зоотехническая наука Беларуси : сб. научн. тр. – Жодино, 2011. – Т. 46. – С. 69-76.
5. Влияние генов PRLR, ESR, RYR1 и H-FABP на показатели продуктивности животных заводского типа «Березинский» в белорусской мясной породе / Л. А. Федоренкова [и др.] // Новые направления в решении проблем АПК на основе современных ресурсосберегающих инновационных технологий : материалы Междунар. науч.-практ. конф. – Владикавказ, 2011. – С. 205-206.
6. Зиновьева, Н. А. Подготовка проб, выделение ДНК и оптимизация метода ПЦР-анализа / Н. А. Зиновьева // Методы исследований в биотехнологии сельскохозяйственных животных : шк.-практикум / под редакцией Н. А. Зиновьевой. – Дубровицы : ВИЖ, 2004. – Вып. 3. – С. 40-41.
7. Меркурьева, Е. К. Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных / Е. К. Меркурьева. – М. : Колос, 1970. – 423 с.

(поступила 16.03.2015 г.)