

И.К. ЛЯДСКИЙ, А.А. ГЕТЯ, К.Ф. ПОЧЕРНЯЕВ

Институт свиноводства им. А.В. Квасницкого НААН Украины, Полтава
E-mail: Lyadskiyigor@rambler.ru

СВЯЗЬ *Asp298Asn*-ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *mc4r* С ТОЛЩИНОЙ СПИННОГО САЛА У СВИНЕЙ КРУПНОЙ БЕЛОЙ ПОРОДЫ



Исследована связь Asp298Asn-полиморфизма гена mc4r с развитием такого признака, как толщина спинного сала у свиней крупной белой породы популяции АФ «Оржицкая». Обнаружена тенденция формирования более тонкого спинного сала у животных с генотипом АГ. Достоверной разницы по толщине спинного сала у групп животных с различным генотипом гена mc4r, обусловленным Asp298Asn-полиморфизмом, установлено не было. Возможной причиной отсутствия статистически достоверной разницы может быть гетерогенное происхождение исследованных животных. Сделан вывод о нецелесообразности использования Asp298Asn-полиморфизма гена mc4r в селекции свиней крупной белой породы популяции АФ «Оржицкая».

© И.К. ЛЯДСКИЙ, А.А. ГЕТЯ, К.Ф. ПОЧЕРНЯЕВ, 2011

Введение. Существует ряд генов, которые принимают непосредственное участие в формировании откормочных и мясных качеств свиней, в частности, это ген рецептора меланокортина-4 (*mc4r*) [1]. Сегодня известны пять типов рецепторов меланокортина – MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R, которые кодируются разными генами и выполняют различные функции. Непосредственное участие в метаболизме жировой ткани принимает рецептор меланокортина-4 MC4R как одно из звеньев сложной системы пищевого поведения. В ответ на поступление липидов из пищи к клеткам жировой ткани (адипоцитам) происходит синтез и секреция лептина. Главными мишенями действия этого гормона есть рецепторы лептина, локализованные на стенках клеток некоторых сосудов, например, в гематоэнцефалическом барьере. Образование комплекса лептин – рецептор лептина оказывает содействие расщеплению гипоталамического проопиомеланокортина (ПОМК) на α -, β -, γ -меланоцитостимулирующие гормоны, аденокортикотропин (АКТГ), β -эндорфин [2]. α -Меланоцитостимулирующий гормон принадлежит к АКТГ/МСГ-подобным пептидам, которые имеют общее название меланокортины. В итоге меланокортин действует на центры голода и насыщенности через рецептор меланокортина-4. Меланокортиновые рецепторы принадлежат к семье рецепторов, связанных с G-белками, и представляют собой семидоменные трансмембранные белки. Меланокортиновые рецепторы имеют в своей структуре участки, которые распознаются протеинкиназами А и С, что указывает на возможность фосфорилирования. Ген *mc4r* экспрессируется в разных участках ЦНС, в частности таламусе, гипоталамусе, стволе и коре головного, а также участках спинного мозга. Экспрессия *mc4r* в этих структурах нервной системы свидетельствует об их возможном участии в регуляции вегетативных и нейроэндокринных функций [3]. Во время развития эмбриона гены рецепторов меланокортина активно экспрессируются в нервной ткани, что, в свою очередь, указывает на их возможное участие в формировании нервной системы [4]. Таким образом, основной функцией MC4 рецепторов выступает контроль массы тела и регуляция пищевого поведения [5].

Ген *mc4r* расположен на хромосоме 1 свиньи в участке (SSC1) q22–q27 [6]. Было установлено,

что в некоторых популяциях свиней однонуклеотидный полиморфизм этого гена достоверно связан с откормочными и мясными качествами, в частности с толщиной спинного сала.

Исследования, проведенные Houston et al. [7], показали позитивную корреляцию между аллельными состояниями гена *mc4r* и толщиной спинного сала различных пород свиней, у которых присутствие аллеля А в генотипе соотносилось с большим накоплением жира, а аллеля G соответственно меньшим. Эти же результаты были подтверждены и в работах [8, 9], когда аллель G (298Asp) чаще встречался у животных с постным мясом, тогда как аллель А (298Asn) — у более осаленных. Работы, проведенные на породах ландрас и гемпшир [8, 10], показали достоверные отличия в пределах от 0,9 до 1,0 мм толщины спинного сала у животных с генотипами Asp/Asp и Asn/Asn.

Однако в некоторых исследованиях [10] показана определенная породоспецифичность фенотипического проявления этого гена. Еще не обнаружено четкой корреляции между 298Asp та 298Asn-полиморфизмами гена *mc4r* и отложением спинного сала у свиней крупной белой породы [8] и у потомков, полученных от скрещивания крупной белой породы с диким кабаном [11]. Подобная картина наблюдалась и при исследовании свиней породы йоркшир. В частности, *Asp298Asn*-полиморфизм в этой породе не является главным фактором, регулирующим пищевое поведение, а лишь совокупностью эффектов осаленности туши, меньшего роста и длины туши [7, 12, 13].

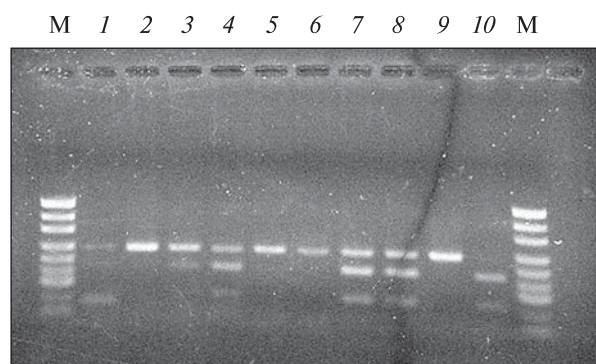
Для маркерной селекции необходимым условием является выяснение связи определенных полиморфизмов генов с проявлением признаков в конкретной популяции. В стадах свиней крупной белой породы, разводимых на Украине, исследований связи полиморфизмов гена *mc4r* с развитием такого признака, как толщина спинного сала, еще не выполняли, что и вызвало необходимость проведения соответствующей работы. В качестве модельной популяции были использованы ремонтные животные стада крупной белой породы АФ «Оржицкая», в котором ведется селекция на уменьшение спинного сала.

Материалы и методы. Для исследования были отобраны чистопородные ремонтные

свинки ($n = 46$) крупной белой породы массой от 74 до 119 кг, родившиеся с 1 по 11 ноября 2007 г. Животных оценивали по методике интегрированной оценки ремонтного молодняка свиней [14]. Измерения толщины спинного сала проводились при достижении животными живой массы 100 кг с помощью ультразвукового устройства PigLog 105 («SFK Technology», Дания) в трех точках: а) на уровне 6–7-го грудных позвонков (на расстоянии от 10 до 11 см от холки и 2 см левее или правее остистых отростков); б) 6 см справа или слева в сторону от середины спины посередине между лопаткой и крестцом; в) 6 см справа или слева в сторону от середины спины на уровне второго поясничного позвонка. Фактические данные, полученные в день измерения, были откорректированы на живую массу 100 кг с использованием предварительно рассчитанных коэффициентов (0,256 — точка а; 0,197 — точка б и 0,171 — точка в). Выделение ДНК из щетины проводили с использованием ионообменной смолы Chelex-100, как описано в [15]. ПЦР-амплификацию фрагмента гена *mc4r* осуществляли на программированном термостате «Терцик» («Биоком», Россия) с использованием набора реагентов («МБИ Ферментас», Литва) и олигонуклеотидных праймеров следующей структуры: MC4R298F — 5'-TACCCTGACCATCTTGATTG, MC4R298R — 5'-ATAGCAACAGATGATCTCTTTG [1], синтезированных в «Metabion International AG» (Германия).

Для рестриктового анализа амплифицированных фрагментов гена *mc4r* использовали эндонуклеазу *TaqI* («МБИ Ферментас», Литва). Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в 1,5%-ном агарозном геле в буфере 1 × TBE, при силе тока 5 В/см длины геля. Визуализацию продуктов рестрикции осуществляли окрашиванием с помощью бромистого этидия и просмотром на трансиллюминаторе в УФ-свете с длиной волны 312/365 нм. Полученные результаты статистически обработали с помощью компьютерной программы «GenAlEx V.6» [16]. Для определения связи разных генотипов гена *mc4r* — AA и AG с толщиной сала на уровне середины спины в трех точках была использована компьютерная программа «STATISTIKA» [17].

Результаты исследований и их обсуждение. ДНК-типирование включало в себя определе-



Разные аллельные состояния гена *mc4r*: AA (2, 5, 6, 9), AG (1, 3, 4, 7, 8), GG (10); M – маркер, pBlue-Script/MspI: 710, 489, 404, 328, 242, 190, 157, 147, 110, 67 п.н.

Таблица 2
Взаимосвязь генотипов AG и AA с откормочными качествами свиней крупной белой породы (животных с генотипом AA – 23, AG – 22)

Откормочные качества свиней	Генотипы	
	AA	AG
Толщина сала в точке <i>a</i> (среднее значение), мм	20,69	20,05
Разница между средними значениями генотипов AA и AG	0,64 мм; 3,1 %	
Стандартная ошибка	1,20	1,23
Толщина сала в точке <i>b</i> (среднее значение), мм	15,32	14,36
Разница между средними значениями генотипов AA и AG	0,96 мм; 6,3 %	
Стандартная ошибка	0,71	0,72
Толщина сала в точке <i>v</i> (среднее значение), мм	16,99	16,38
Разница между средними значениями генотипов AA и AG	0,96 мм; 6,3 %	
Стандартная ошибка	0,75	0,77

ние аллельных вариантов гена. Вследствие миссенс-мутации $G > A$ в нуклеотидной позиции 298 появились два аллельных состояния гена *mc4r*. Аллель G характеризуется рестриктивными фрагментами размером 150 и 70 п.н., аллель A – фрагментом 220 п.н. Фрагменты размером 220, 150, 70 п.н. свидетельствуют о гетерозиготности по этому полиморфизму (рисунок).

Анализ родословных родителей исследуемых животных обнаружил, что популяция формировалась из хряков, имеющих датское и англий-

ское происхождение, а также местных свиноматок. По сравнению с родительским поголовьем ($p = 0,230$) у ремонтных животных F_1 частота встречаемости аллеля G возросла до 0,261. Для сравнения, в некоторых популяциях свиней крупной белой породы частота встречаемости этого аллеля была следующей: племя завод «Комсомолец» Николаевской области (2000 г.) – 0,150, прапраотцовское стадо фирмы UPB – 0,250 [18], датский йоркшир – 0,450 [10], а у животных крупной белой породы, селекция которых на протяжении семи поколений была направлена на максимальное уменьшение количества сала – 0,480 [7]. Таким образом, обнаружено значительное внутривидовое колебание частоты встречаемости аллеля G, который связывают с меньшей толщиной подкожного сала.

Уровень генетического разнообразия был определен на основании оценки наблюдаемой $H_o = 0,478$ и ожидаемой $H_e = 0,386$ гетерозиготности при соблюдении закона равновесия Харди-Вайнберга. Для гена *mc4r* обнаружена статистически недостоверная тенденция избытка гетерозигот, оцененная при помощи программы Bottleneck Version 1.2.02 [20]. Незначительное отрицательное значение индекса фиксации $F_{it} = -0,240$ указывает на слабое вовлечение упомянутого полиморфизма гена в искусственный отбор.

Анализ формирования признака у животных с различными генотипами, обусловленными *Asp298Asn*-полиморфизмом гена *mc4r*, обнаружил наибольшую разницу между средними значениями по толщине сала в точке *b* – 0,96 мм, или 6,3 %. В целом же животные с генотипом AA превышали гетерозигот по толщине сала на уровне середины спины, в области 6–7-го грудных позвонков и крестца в точках *a*, *b* и *v* (таблица).

На основании проведенных исследований можно говорить о некоторой установленной тенденции связи генотипа AG гена *mc4r* с формированием признака менее толстого спинного сала у свиней крупной белой породы АФ «Оржицкая». Генотип GG среди исследованной выборки свиней крупной белой породы встречался только в единичном случае. Обнаруженные отличия по толщине спинного сала статистически не достоверны. Одной из причин

отсутствия достоверной разницы у групп животных с различным генотипом гена *mc4r*, обусловленным *Asp298Asn*-полиморфизмом, может быть гетерогенное происхождение исследуемых животных. Возможно в селекционный процесс популяций свиней крупной белой породы в Англии и Дании были вовлечены разные гены, определяющие формирование упомянутого признака.

Как перспектива дальнейших исследований в этом направлении может быть создание и оценка линии животных, гомозиготных по аллелю G, в популяциях свиней крупной белой породы.

Выводы. В популяции свиней крупной белой породы АФ «Оржицкая» аллель G гена *mc4r*, который связывают с меньшей толщиной подкожного сала, встречался с частотой 0,261. Частота генотипов AA составила 0,500, AG — 0,478 и GG — 0,022. Коэффициент фиксации (F_{ii}), который характеризует степень инбридинга, составил в этой популяции —0,240, что указывает на слабое вовлечение упомянутого полиморфизма гена в искусственный отбор. Установлено определенную тенденцию связи *Asp298Asn*-полиморфизма с толщиной спинного сала. Наибольшая взаимосвязь *Asp298Asn*-полиморфизма гена *mc4r* с толщиной подкожного жира обнаружена при исследовании области середины спины — 6,3 %. Была показана разница в этом показателе между генотипами AA (большой процент жира) и AG (более постное мясо). Одной из причин отсутствия достоверной разницы у групп животных с различным генотипом гена *mc4r*, обусловленным *Asp298Asn*-полиморфизмом, может быть гетерогенное происхождение популяции. В связи с этим использование *Asp298Asn*-полиморфизма гена *mc4r* в селекции свиней крупной белой породы популяции АФ «Оржицкая» нецелесообразно.

I.K. Lyadskiy, A.A. Getya, K.F. Pochernyaev

CORRELATION BETWEEN
THE *Asp298Asn* POLYMORPHISM
OF *mc4r* GENE AND BACK FAT WIDTH
IN LARGE WHITE PIGS

Asp298Asn correlation between the *mc4r* gene polymorphism and development of such trait as back fat width in Large White pigs belonging to AF «Orzhitska» population was studied. The tendency of forming thinner back fat

layer in animals possessing AG genotype was detected. Any reliable differences in back fat width between animal groups with various *mc4r* genotypes caused by the *Asp298Asn* polymorphism were not detected. A possible reason for the absence of statistically reliable difference may be heterogeneous origin of the studied animals. Using *Asp298Asn* polymorphism of *mc4r* gene in selecting the Large White AF «Orzhitska» pig population is unreasonable.

I.K. Lyadskiy, A.A. Getya, K.F. Pochernyaev

ЗВ'ЯЗОК *Asp298Asn*-ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА *mc4r*
З ТОВЩИНОЮ ХРЕБТОВОГО САЛА У СВИНЕЙ
ВЕЛИКОЇ БІЛОЇ ПОРОДИ

Досліджено зв'язок *Asp298Asn*-полиморфизму гена *mc4r* з розвитком такої ознаки, як товщина хребтового сала у свиней великої білої породи популяції АФ «Оржицка». Знайдено тенденцію формування більш тонкого хребтового сала у тварин з генотипом AG. Вірогідної різниці за товщиною хребтового сала у груп тварин з різними генотипами гена *mc4r*, які обумовлені *Asp298Asn*-полиморфизмом, встановлено не було. Можливою причиною відсутності статистично вірогідної різниці може бути гетерогенне походження досліджених тварин. Зроблено висновок про недоцільність використання *Asp298Asn*-полиморфизму гена *mc4r* в селекції свиней великої білої породи популяції АФ «Оржицка».

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kim K.S., Lee J.J., Shin H.Y. et al. Association of melanocortin 4 receptor (MC4R) and high mobility group AT-hook 1 (HMGA1) polymorphisms with pig growth and fat deposition traits // *Anim. Genet.* — 2006. — **37**. — P. 419–421.
2. Панков Ю.А. Лептин — новый гормон в эндокринологии // *Усп. физиол. наук.* — 2003. — **34**, № 2. — С. 3–20.
3. Gantz I., Miwa H., Konda Y., Shimoto Y., Tashiro T., Watson S.J., DelValle J., Yamada T. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor // *J. Biol. Chem.* — 1993. — **268**, № 20. — P. 15174–15179.
4. Wikberg J.E.C., Muceniece R., Mandrika I., Prusis P., Lindblom J., Post C., Skottner A. New aspects on the melanocortins and their receptors // *Pharm. Res.* — 2000. — **42**, № 5. — P. 393–420.
5. Wikberg J.E.C. Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs // *Eur. J. Pharm.* — 1999. — **375**, № 1/3. — P. 295–310.
6. Kim K.S., Larsen N.J., Rothschild M.F. Rapid communication: Linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene // *J. Anim. Sci.* — 2000. — **78**. — P. 791–792.
7. Houston R.D., Cameron N.D., Rance K.A. A melano-

- cortin-4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations // *Anim. Genet.* – 2004. – **35**. – P. 386–390.
8. Kim K.S., Larsen N., Short T., Plastow G., Rothschild M.F. A missense variant of the porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits // *Mammalian Genome.* – 2000. – **11**. – P. 131–135.
 9. Barb C.R., Robertson A.S., Barrett J.B., Kraeling R.R., Houseknecht K.L. The role of melanocortin-3 and -4 receptor in regulating appetite, energy homeostasis and neuroendocrine function in the pig // *J. Endocrinol.* – 2004. – **181**. – P. 39–52.
 10. Bruun C.S., Jorgensen C.B., Nielsen V.H., Andersson L., Fredholm M. Evaluation of the porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene as a positional candidate for a fatness QTL in a cross between Landrace and Hampshire // *Anim. Genet.* – 2006. – **37**. – P. 359–362.
 11. Park H.B., Carlborg O., Marklund S., Andersson L. Melanocortin 4 receptor (MC4R) genotypes have no major effect on fatness in a Large White × Wild Boar intercross // *Anim. Genet.* – 2002. – **33**. – P. 155–157.
 12. Huszar D., Lynch C.A., Fairchild-Huntress V. et al. Targeted disruption of the melanocortin 4 receptor results in obesity in mice // *Cell.* – 1997. – **88**. – P. 131–141.
 13. Farooqi I.S., Keogh J.M., Yeo G.S., Lank E.J., Cheetham T., O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene // *New Engl. J. Med.* – 2003. – **348**. – P. 1085–1095.
 14. Віллеке Х., Гетья А., Чуб О. Методика інтегрованої оцінки ремонтного молодняка свиней за власною продуктивністю в умовах господарства // *Сучасні методики досліджень у свинарстві.* – Полтава, 2005. – С. 38–40.
 15. Корінний С.М., Почерняев К.Ф., Балацький В.М. Шерсть тварин як зручний об'єкт виділення ДНК для аналізу за допомогою ПЛР // *Ветеринар. біотехнологія.* – 2005. – № 7. – С. 80–83.
 16. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes.* – 2006. – **6**. – P. 288–295.
 17. <http://www.statsoft.com>
 18. Гетья А.А., Березовский Н.Д., Почерняев К.Ф., Лядский И.К. Оценка Asp298Asn полиморфизма гена MC4R у свиней крупной белой породы // *Тавр. наук. вісн.: Зб. наук. пр. ХДАУ.* – Херсон : Айлант. – 2008. – Вип. 58/2. – С.45–49.
 19. Bruun C.S., Jorgensen C.B., Nielsen V.H. et al. Evaluation of the porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene as a positional candidate for a fatness QTL in a cross between Landrace and Hampshire // *Anim. Genet.* – 2006. – **37**. – P. 359–362.
 20. Luikart G., Cornuet J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data // *Conserv. Biol.* – 1998. – **12**, № 1. – P. 228–237.

Поступила 29.12.09