

Полиморфизм ДНК-маркеров, ассоциированных с качеством мяса у свиней трёхпородного скрещивания

И. М. Чернуха, доктор техн. наук,

ГНУ ВНИИ мясной промышленности им. В. М. Горбатова Россельхозакадемии

О. А. Шалимова, доктор биол. наук, **В. И. Крюков**, доктор биол. наук, **Н. Г. Друшляк**, канд. биол. наук, **М. В. Радченко**, ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный Университет»

Одним из актуальных направлений формирования оптимальных характеристик мяса является маркерная селекция и генетический мониторинг, предусматривающие использование ДНК-маркеров, ассоциированных с уровнем проявления хозяйственно-ценных признаков и наследственных заболеваний [1].

УДК: 637.5'64.05:636.082.12

Ключевые слова: свиньи, гибриды, ландрас, йоркшир, дюрок, ПЦР, ДНК-диагностика, полиморфизм, RYR1, H-FABP, MC4R, качество мяса.

→ В условиях увеличения производства и потребления продукции свиноводства особое внимание должно уделяться ее качеству [2]. Специалисты ВНИИ мясной промышленности им. В.М. Горбатова на основании предпочтений покупателей и мясоперерабатывающих предприятий разработали требования, предъявляемые к качеству мясного сырья. Наиболее важными из них являются:

- гарантированная безопасность;
- предубойная масса до 100 кг;
- выход мышечной ткани свыше 60%;
- низкая доля сырья с пороками PSE и DFD;
- доля внутримышечного жира от 1,0 до 5,5%;
- площадь мышечного глазка свыше 35 см²;
- высокие органолептические показатели [3].

В мясном скотоводстве определяющими факторами являются откормочные и мясные качества животных, к важнейшим из которых относятся: скороспелость, среднесуточный прирост, уровень расхода корма и выход мышечной ткани.

Цель настоящей работы состоит в генотипировании свиней

трехпородного скрещивания ландрас × йоркшир × дюрок (Л×И×Д) канадской селекции, выращенных на свинокомплексе ОАО «Агрофирма «Ливенское мясо» по локусам, ассоциированным с генами, влияющими на рост животных и качество мяса.

В задачи исследования входит изучить у трехпородных гибридов Л×И×Д:

- полиморфизм гена рианодинового рецептора (RYR1);
- полиморфизм гена белка, связывающего жирные кислоты (H-FABP);
- полиморфизм гена рецептора меланокортина 4 (MC4R).

Материалы и методы исследований.

В качестве исходного материала использовали кровь от 130 свиноматок и хряков в возрасте 8-10 месяцев. ДНК выделяли с помощью набора D1Atom™ DNA Prep100 («Биоком», Россия). Генотипирование осуществляли методом ПЦР-ПДРФ (полимеразно-цепной реакции полиморфизма длин рестриционных фрагментов) в соответствии с ранее описанными методиками [4]. Амплификацию проводили с помощью набора реагентов GenPak PCR Core («Биоком», Россия) в термоциклере MyCycler (BioRad США).

Результаты и их обсуждение.

В связи с повышенным спросом потребителей на мясную свинину в свиноводстве используют селекционные программы, направленные на разведение животных с сильным развитием спинной части и окорока и с одновременным уменьшением содержания жира в туше. Однако оказалось, что селекция на «мясность» сопровождается определенными негативными последствиями и, в первую очередь, связана с нежелательной повышенной чувствительностью свиней к стрессам, что снижает качество свинины и формирует появление специфического порока, получившего название PSE (pale – бледный, soft – мягкий, exudative – экссудативный) [5].

Fujii J. с соавт. (1991) выявили точковую мутацию в рианодин-рецепторном гене, возникающую в результате замены цитозина на тимин в позиции 1843 нуклеотидной последовательности, что приводит к синтезу в 615 позиции полипептидной цепи рианодин-рецепторного белка аргинина вместо цистеина. Это является предполагаемой причиной возникновения стрессчувствительности, крайним проявлением которой является гипертермический синдром. Живот-

ные, имеющие генотип NN, являются устойчивыми к стрессам, генотип nn – стрессчувствительными, гетерозиготы с генотипом Nn являются носителем гена стрессчувствительности [6,7].

Методом ПЦР-ПДРФ нами получен специфический фрагмент RYR1-гена свиней, представляющий собой нормальные доминантные алели, либо аллели, в которых возможна искомая рецессивная мутация. Полученные амплификаты подвергли рестрикции эндонуклеазой HindI. При помощи маркера были определены длины фрагментов рестрикции: два фрагмента, состоящих из 149 и 123 пар нуклеотидов (п.н.), представляют генотип NN, три фрагмента в 272, 149 и 123 п.н. соответствуют гетерозиготному генотипу Nn (рис. 1). Рецессивных гомозиготных генотипов nn (один фрагмент рестрикции 272 п.н.) не обнаружили.

Проведенными исследованиями установлено, что у трехпородных гибридов Л×Й×Д не был выявлен стрессчувствительный генотип – nn гена RYR1, гетерозиготная форма генотипа Nn встречалась с частотой 1,54%, а гомозиготный генотип доминантной формы встречается у 98,46% животных.

Небольшое количество гетерозиготных и отсутствие рецессивных гомозиготных носителей является следствием гетерозиса, поскольку свиньи породы дюрок обладают высокой устойчивостью к стрессам. Полученные нами данные согласуются с результатами исследований Siczowska H. и соавт. (2009), установившими отсутствие гетерозиготных и рецессивных гомозиготных генотипов по гену RYR1 в популяции трехпородных гибридов Л×Й×Д датской селекции [8].

Согласно правилам менделевского наследования половина потомков, полученных от скрещивания гетерозиготных животных по гену RYR1 с нормальными гомозиготными животными, будут иметь гетерозиготный генотип. При скрещивании гетерозиготных хряков с гетерозиготными свиньями наряду с гомозиготным

доминантными и гетерозиготными потомками будут появляться гомозиготные рецессивные особи nn примерно в соотношении 1:2:1. Все это будет способствовать сохранению и увеличению уровня встречаемости мутантного аллеля гена RYR1 в следующих поколениях животных. При этом в условиях производства в промышленных хозяйствах, в отличие от племенных, целесообразно использовать животных не только с генотипом NN, но и с генотипом Nn, что будет способствовать получению мяса с высокими качественными и органолептическими показателями. Животные со стрессчувствительным генотипом nn должны подлежать выбраковке.

Одним из важных показателей качества мяса является содержание внутримышечного жира, под которым понимают сумму внутриклеточных, межклеточных и межволоконных жировых компонентов. Содержание внутримышечного жира определяет такой показатель как мраморность мяса. По мнению ряда исследователей, одним из наиболее перспективных генов, оказывающих влияние на содержание внутримышечного жира в тушах свиней, является ген H-FABP [9, 10]. Его биологиче-

ская особенность заключается в кодировании белков, участвующих в липидном обмене, основная функция которых – связывание длинных цепочек жирных кислот и перенос их внутри клетки к различным органеллам. Таким образом, в процессе липидного обмена происходит жиросотложение между волокнами мышечной ткани, что способствует увеличению мраморности мяса [11].

Gerbens и соавт. (1999) выявили три аллели (A, D и H) гена H-FABP, обуславливающие три класса полиморфизма, и установили, что аллель d (рецессивный аллель) ассоциирована с повышенным содержанием внутримышечного жира [12].

В то же время, Nechtelberger и соавт. (2001), Ovilo и соавт. (2002), Urban и соавт. (2002) показывают отсутствие достоверных корреляций между содержанием внутримышечного жира, темпов роста и генотипами по H-FABP [13,14,15].

Фрагменты, полученные при ПЦР-ПДРФ анализе полиморфизма гена H-FABP, «разрезаны» и разделены в агарозном геле с помощью эндонуклеазы HaeIII. Для D аллеля характерно присутствие двух фрагментов: 683 и 117 пн. У аллеля d присутствуют три фрагмента – 405, 278

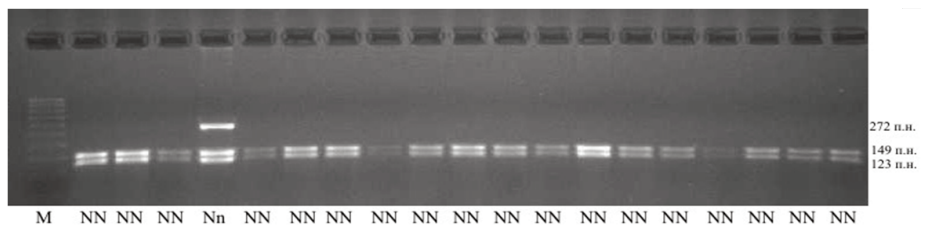


Рисунок 1. Электрофореграммы ПЦР-ПДРФ генотипирования по локусу RYR1 (M – маркер молекулярного веса)

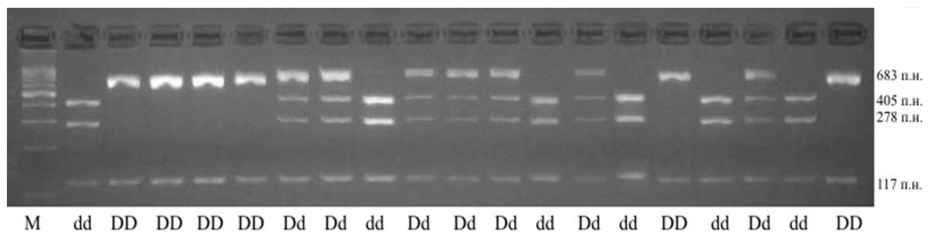


Рисунок 2. Электрофореграммы ПЦР-ПДРФ генотипирования по локусу H-FABP (M – маркер молекулярного веса)

и 117 п.н. У гетерозиготных животных Dd присутствуют все 4 фрагмента – 683, 405, 278 и 117 п.н. (рис. 2).

Проведенные нами генетические исследования гибридных свиней Л×Й×Д выявили относительно высокую частоту встречаемости предпочтительного генотипа dd – 40% (рис. 3). Животные с этим генотипом, по данным Gerbens и соавт. (2001), отличаются повышенной мраморностью мяса по сравнению со свиньями с генотипами Dd и DD [16]. Это можно использовать в качестве селекционного параметра при селекции свиней по содержанию в внутримышечного жира.

Согласно нашим исследованиям, частота встречаемости гомозиготных и гетерозиготных особей гена H-FABP у свиней трехпородного скрещивания Л×Й×Д составила 29% и 31%, соответственно. По данным Арсиенко Р. Ю. (2003) животные с генотипом DD характеризуются более высокими темпами роста по сравнению с гетерозиготными и рецессивными гомозиготными особями, что объяснимо повышенным отложением жира в туше [17].

Полиморфизм гена меланокортина рецептора-4 (MC4R) связан с показателями энергии роста свиней. Ген MC4R локализован в хромосоме 1 (SSC1) q22-q27, его полиморфизм обусловлен точечной мутацией G→A в позиции 1426, в связи с чем происходит аминокислотная замена Asp298Asn в MC4-рецепторе. Изменение первичной структуры MC4-рецептора нарушает процессы регулирования секреции клеток жировой ткани. Это влечёт за собой нарушение липидного обмена и отражается на процессе формирования признаков, характеризующих откормочные и мясные качества свиней [18].

Гомозиготные свиньи с генотипом AA достигают рыночного веса на три дня быстрее, чем свиньи генотипа GG. В то же время свиньи с генотипом GG отличаются более высокой конверсией корма и в их тушах

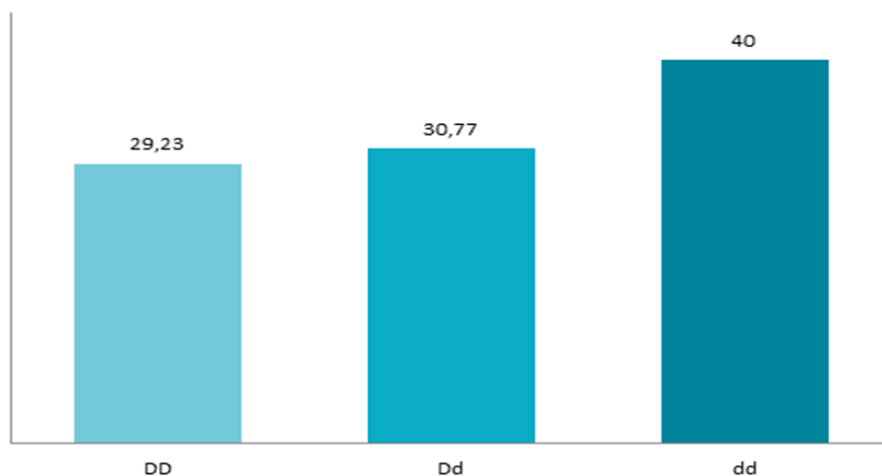


Рисунок 3. Частота встречаемости генотипов гена H-FABP, %

на 8% меньше сала [19].

Методом ПЦР-ПДРФ нами получен специфический фрагмент гена MC4R. Для A аллеля характерно отсутствие сайта узнавания рестриктазы TaqI поэтому фрагмент, полученный при ПЦР остаётся неизменным – 226 п.н. У аллеля G есть сайт узнавания – рестриктаза «режет» ПЦР фрагмент на две части – 156 п.н. и 70 п.н., поэтому у гомозигот GG в геле два фрагмента – 156 и 70 п.н., а гомозигот AA один фрагмент – 226 п.н., и у гетерозиготных животных (AG) в геле обнаруживаются три фрагмента: 226, 156 и 70 п.н. (рис.4).

ПЦР-ПДРФ генотипированием установлено, что частота распространения гетерозиготного генотипа AG составляет 47,69% (рис.5). Исследованиями Гетманцевой Л. В. (2012) установлено, что трехпородные гибриды ЛхЙхД генотипа AG отличаются меньшей толщиной шпика на 13,2%, большей массой задней трети полутуши на 3,45%, площадью «мышечного глазка» на 10,5%,

убойным выходом на 1,36% и выходом мышечной ткани на 2,2% по сравнению с аналогами генотипа AA [20]. Следовательно, тестируемые животные характеризуются высокими откормочными и мясными качествами.

Частота распространения генотипа AA у протестированных гибридов Л×Й×Д составила 20%, а генотипа GG – 32,31%. Таким образом, производитель может формировать специализированные линии, выбирая генотип, связанный с быстрым ростом (AA) или генотип, связанный с «постным и эффективным приростом» (GG). Полученные нами данные согласуются с результатами исследований Максимова Г. В. и соавт. (2011), определивших генотипическую структуру стада гибридов Л×Й×Д в ЗАО «Русская свинина» Ростовской области [21]. Однако необходимо отметить, что в исследованной популяции трехпородных гибридов присутствует более высокий процент животных с генотипом GG. Это объясняется использованием раз-

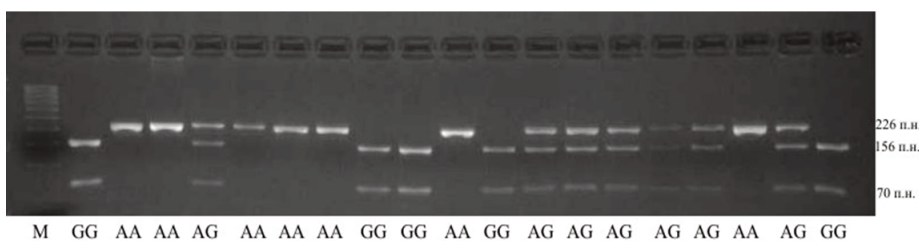


Рисунок 4. Электрофореграммы ПЦР-ПДРФ генотипирования по локусу MC4R (M – маркер молекулярного веса)

ных селекционных стратегий в ОАО «Агрофирма «Ливенское мясо» и ЗАО «Русская свинина».

Выводы.

Проведенные нами генетические исследования свиней трехпородного скрещивания ландрас × йоркшир × дюрок, выращенных на свином комплексе ОАО «Агрофирма «Ливенское мясо» позволили:

- выявить высокий генетический потенциал стрессустойчивости, оцененный по маркеру RYR1, у 98,46%, протестированных животных гомозиготный генотип доминантной формы;

- установить значительную (40%) долю предпочтительного рецессивного генотипа dd по гену H-FABP в исследуемой популяции животных;

- выполнить оценку генетического потенциала скороспелости и постности с использованием маркера MC4R. Частота встречаемости желательного генотипа AG составила 47,69%.

Проведенные исследования свидетельствуют о необходимости

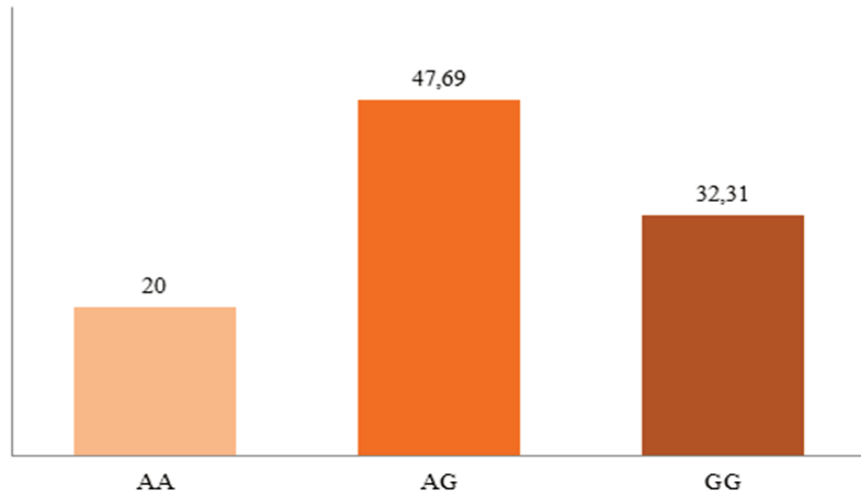


Рисунок 5. Частота встречаемости генотипов гена MC4R, %

сти использования в селекции свиней ДНК-диагностики по генам RYR1, H-FABP, MC4R в качестве дополнительного критерия отбора животных с более высокими откормочными и мясными показателями. →

Контакты:

- Друшляк Наталья Геннадьевна +7(4862) 47-5171
- Крюков Владимир Иванович +7 (4862) 47-5171
- Радченко Михаил Васильевич +7(4862) 47-5171
- Чернуха Ирина Михайловна +7(495) 676-7211
- Шалимова Оксана Анатольевна +7(4862) 47-51-71

Литература

1. Зиновьева Н.А., Кленовицкий П.М., Гладырь Е.А., Никишов А.А. Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификация племенного материала в животноводстве: Учеб. пособие. М.: РУДН, 2008. 329 с.
2. Лисицын А.Б., Татулов Ю.В., Чернуха И.М., Миттельштейн Т.М. Мировая практика формирования качества мясного сырья и требования к нему перерабатывающей промышленности // Мясная индустрия. 2001. №9. С. 6-9.
3. Лисицын А.Б. Требования к качеству свинины для промышленной переработки. Перспективы российско-канадского сотрудничества // Все о мясе. 2011. №4. С. 8-11.
4. Крюков В.И., Пикунова А.В., Друшляк Н.Г. Использование ДНК-маркеров в селекции свиней // Вестник Орел ГАУ. 2011. №1. С. 36-40.
5. Рыжова Н.В. Полиморфизм гена RYR1 в популяциях свиней мясной пород: дис. на соиск. учен. степ. канд. биолог. наук. – п. Лесные Поляны, Московской обл., 2001. 125 с.
6. Fujii J., Kinya O., Zorzato F., Leon S., Khanna V.K., Weiler J.E. Identification of a Mutation in Porcine Ryanodine Receptor Associated with Malignant Hyperthermia // Science. 1991 V. 253. P. 448-451.
7. Рыжова Н.В., Калашникова Л.А. Ген RYR1 и продуктивность свиней мясных пород // Животноводство России. 2003. № 9. С. 46-47.
8. Sieczkowska H., Koćwin-Podsiadła M., Krzęcio E., Antosik K., Zybert A. Quality and technological properties of meat from Landrace-Yorkshire × Duroc and Landrace-Yorkshire × Duroc-Pietrain fatteners // Pol. J. Food Nutr. Sci. 2009. V. 59. №4. P. 329-333.
9. Gerbens F. Genetic control of intramuscular fat accretion in pigs. The role of heart and adipocyte fatty acid-binding proteins: dissertation for the degree of the doctrine of Medical Sciences // Nijmegen. 2000. 173 p.
10. Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А. Диагностика полиморфизма гена H-FABP как генетического маркера мясных качеств свиней // Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных: матер. II Междунар. науч. конф., 19–20 нояб. 2002. Дубровицы, 2002. С. 45–50.
11. Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism // J Appl Genet. 2006. Vol. 47. № 1. P. 39–48.
12. Gerbens F., van Erp A.J., Harders F.L., Verburg F.J., Meuwissen T.H., Veerkamp J.H., Pas M. F. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs // J. Anim. Sci. 1999. V.77. P. 846-852.
13. Nechtelberger D., Pires V., Soolknet J., Stur I., Brem G., Mueller M., Mueller S. Intramuscular fat content and genetic variants at fatty acidbinding protein loci in Austrian pigs // J. Anim. Sci. 2001. V.79(11). P. 2798-2804.
14. Ovílo C., Oliver A., Noguera J.L., Clop A., Barragan C., Varona L., Rodriguez C., Toro M., Sanchez A., Perez-Enciso M., Sillio L. Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6 // Genet Sel. Evol. 2002. V. 34(4). P. 465-479.
15. Urban T., Mikolasova R., Kuciel J., Ernst M., Ingr I. A study of associations of the H-FABP genotypes with fat and meat production of pigs // J. Appl. Genet. 2002. V. 43(4). P. 505-509.
16. Gerbens F., Verburg F.J., Van Moerkkerk H.T., Engel B., Buist W., Veerkamp J.H., Te Pas M.F. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs // J. Anim. Sci. 2001. V. 79(2). P. 347-354.
17. Арсиенко Р.Ю. Полиморфизм гена белка, связывающего жирные кислоты (H-FABP), и его влияние на хозяйственно-полезные признаки свиней: дис. на соиск. учен. степ. канд. биолог. наук: 03.00.23. п. Дубровицы, Московской обл., 2003. 97 с.
18. Kim K. S., Larsen N.J., Rothshild M.F. Rapid communication: Linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene // J. Anim. Sci. 2000. Vol. 78. P. 791-792.
19. Изучить генетический полиморфизм КРС и свиней Орловской области с целью выявления маркерных генов хозяйственно ценных признаков, хромосомных нарушений, наследственных и инфекционных заболеваний: отчет о НИР (заключ.) / ФГБОУ ВПО Орел ГАУ; рук. и отв. исп. Крюков В.И.; исполн.: Друшляк Н.Г., Пикунова А.В., Манюхин Я.С. [и др.]. Орел, 2012. 143с. – Библиограф. 129-143.
20. Гетманцева Л.В. Влияние полиморфизма генов MC4R, IGF2 и POU1F1 на продуктивные качества свиней: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. с.-х. наук: 06.02.07. п. Персиановский, 2012. 28 с.
21. Максимов Г.В., Гетманцева Л.В. Влияние гена MC4R на мясную продуктивность свиней // Главный зоотехник. 2011. №10. С. 9-13.