

ГЕНЕТИЧНИЙ ТА АСОЦІАТИВНИЙ АНАЛІЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛІМОРФІЗМА g.22 G>C В ГЕНІ КАТЕПСИНУ F СВИНЕЙ РІЗНИХ ПОРІД

Є. К. ОЛІЙНИЧЕНКО, аспірант*

В. О. ВОВК, кандидат сільськогосподарських наук,

Т. В. БУСЛИК, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник

М. О. ІЛЬЧЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук, вчений секретар

В. М. БАЛАЦЬКИЙ, доктор сільськогосподарських наук,

завідувач лабораторії генетики

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

E-mail: pigbreeding@ukr.net

Анотація. Визначено генетичну структуру порід свиней велика біла, полтавська м'ясна, велика чорна і миргородська за геном катепсину F (CTSFG.22 G>CSNP), встановлено основні популяційні параметри. В усіх породах генетичний маркер характеризувався поліморфізмом за переважання за частотою алеля g.22C. Рівень інформативності CTSF g.22 G>C SNP виявлено на оптимальному для асоціативного аналізу рівні (PIC = 0,358-0,375), що дозволяє здійснювати в досліджених субпопуляціях порід пошук зв'язків маркера з ознаками продуктивності свиней. В субпопуляції свиней великої білої породи української селекції проведено аналіз зв'язку генетичного маркера CTSF g.22 G > C SNP з показниками продуктивності тварин: віком досягнення живої маси 100 кг, товщиною шпигу на рівні 6-7 ребра, 10 ребра, в області крижів і середньодобовим приростом маси та селекційним індексом. Встановлено тенденцію до асоціації зазначеного генетичного маркера з віком досягнення тваринами живої маси 100 кг ($p = 0,07$).

Ключові слова: свині, породи, SNP, генетична структура, ген катепсину F

Актуальність.

Останнім часом племінна робота у свинарстві все частіше ґрунтується на застосуванні технології маркер-асоційованої селекції (MAS, marker-assisted selection), яка передбачає генотипування особин за локусами, що контролюють господарські ознаки, і використання отриманої молекулярної інформації для оцінки генотипів, добору і підбору тварин.

Встановлено велику кількість генів-кандидатів, що належать до таких локусів (локуси кількісних ознак, QTL – quantitative traits loci), які впливають на репродуктивні, відгодівельні і м'ясні якості свиней. Але серед них відомо не так багато генів і відповідних ДНК маркерів, які з точки зору їх інформативності і сили асоціації з ознаками, можна ефективно використовувати у практиці селекційної роботи [1, 2].

* Науковий керівник – доктор с.-г. наук, професор В.М. Балацький

Аналіз останніх досліджень і публікацій.

Ген катепсину F (*CTSF*) у свиней картований на хромосомі 2(*SSC2*) р14-р17 і складається з 12 екзонів та 11 інтронів, продуктом його експресії є білок, який містить 474 амінокислотного залишку [3]. За фізіологічною функцією цього білка та локалізацією гену у межах QTL-регіону геному свині, що відповідає за м'ясні якості та накопичення жиру [4], його віднесено до генів. Встановлено, що поліморфізм гену катепсину F відіграє суттєву роль у детермінації економічно важливих ознак свиней: середньодобового приросту живої маси тварин, відсотка пісного м'яса в туші та товщини хребтового сала. Зокрема, у роботах V. Russo показано значну асоціацію поліморфізму *CTSF* g.22 G>C SNP із середньодобовим приростом та товщиною хребтового сала свиней породи італійська велика біла [4, 5]. Зазначений поліморфізм *CTSF* обумовлений одонуклеотидною заміною G на C (rs1113132904) [6], що в свою чергу, призводить до заміни в поліпептидному ланцюзі ферменту катепсину F глютамінової кислоти на аспарагінову. Свині з генотипом g.22 CC гену катепсину F характеризувалися підвищеними показниками росту та меншою жирністю м'яса туші [4].

Для низки порід свиней, що розводять в Україні, визначено генетичну структуру за генами катепсинів *CTSS*, *CTSL*, *CTSB*, *CTSK* оцінено інформативність і можливість використання відповідних генетичних маркерів у MAS, встановлені їх асоціативні зв'язки з окремими ознаками продуктивності свиней великої білої породи [7, 8]. Подібна інформація щодо гену катепсину F відсутня і першим кроком щодо оцінки можливості

його використання у MAS є аналіз генетичної структури порід.

Мета роботи – визначити генетичну структуру порід свиней велика біла, миргородська, велика чорна і полтавська м'ясна за геном катепсину F (g.22 G>C SNP), оцінити поліморфізм і інформативність генетичного маркера для подальшого використання в асоціативних дослідженнях і маркер-асоційованій селекції. Дослідити асоціативні зв'язки генетичного маркера *CTSF* g.22 G>C SNP з окремими продуктивними ознаками свиней великої білої породи української селекції.

Матеріали і методи досліджень.

Тварини, що використовувались в дослідженнях, були перевірені на мутацію с.1843 СТ в гені ріанодинового рецептора 1, пов'язану з дефектами м'яса [9]. Всі тварини мали генотип CC, що свідчить про відсутність мутантного алеля. Товщина шпигу вимірювалася переносними цифровим Renco Lean-Meater (США, Renco Corporation) в трьох точках: 1) товщина шпигу на рівні 10 ребра, мм (перерахунок на вагу 100 кг); 2) товщина шпигу на рівні 6-7 ребра, мм (перерахунок на вагу 100 кг); 3) товщина шпигу на рівні крижів мм, (перерахунок на вагу 100 кг).

Зразки біологічного матеріалу для виділення ДНК відбирали від основного поголів'я племінних стад порід велика біла (ВБ, племзавод ДГ Степне, $n = 102$), миргородська (М, племзавод ім. Декабристів, $n = 50$), велика чорна (ВЧ, ТОВ «Маяк», $n = 50$) та полтавська м'ясна (ПМ, ТОВ «племзавод «Біловодський», $n = 50$). ДНК із зразків м'яса тварин виділя-

ли за допомогою комплексу реагентів «ДНК-сорб-В» (ИнтерЛабСервис, РФ) згідно інструкції.

Типування за SNP CTFS g. 22 G>C проводили методом ПЛР-ПДРФ [4]. Для ампліфікації поліморфної ділянки гену у ПЛР використовували праймери наступної структури прямий 5AGGGAGGG-CTGGA-GACGGAGTA-3/ та зворотній 5/-TCATTCTGGCTC-AGCTCCAC-3/.

Рестрикцію продуктів ПЛР здійснювали за допомогою ендонуклеази RsaI відповідно до рекомендацій виробника (Thermo SCIENTIFIC, Литва).

Фрагменти рестрикції розділяли у 8 % поліакриламідному гелі. Візуалізацію електрофореграм після фарбування гелю у бромистому етидії проводили на транслюмінаторі в УФ світлі.

Частоти алелей і генотипів, рівні гетерозиготності Но (гетерозиготність, що спостерігається) і Не (очікувана гетерозиготність) були обчис-

лені за використання програмного забезпечення і методики, описаної GenALEX6.0 [10], індекс інформаційного змісту поліморфізму (PIC - polymorphic information content) - PIC калькулятора [11]. Відхилення фактичного розподілу генотипів від рівноважного, визначеного за формулою Гарді-Вайнберга, статистично оцінено за використання критерію χ^2 .

Асоціативні зв'язки між генотипами та показниками досліджувалися за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) за використання пакетів прикладних програм Microsoft Excel 2007.

Результати досліджень та їх обговорення.

Результати дослідження генетичної структури порід свиней велика біла, миргородська, велика чорна і полтав-

1. Генетична структура субпопуляції свиней за одноклеотидним поліморфізмом g.22 G>C гену катепсину F.

Порода	Генотип	N	Частота Генотипі	Частота алелів		Ноа	Неb	Fis	χ^2	PICc
				g.22C	g.22G					
ПМ	GG	6	0,12/0,15	0,63	0,37	0,52	0,47	-0,104	0,536	0,358
	GC	26	0,52/0,47							
	CC	18	0,36/0,38							
ВЧ	GG	5	0,1/0,17	0,59	0,41	0,62	0,48	-0,282	3,963	0,367
	GC	31	0,62/0,48							
	CC	14	0,28/0,34							
М	GG	7	0,14/0,16	0,59	0,41	0,52	0,48	-0,282	0,347	0,367
	GC	26	0,52/0,48							
	CC	17	0,34/0,36							
ВБ	GG	30	0,29/0,28	0,53	0,47	0,47	0,50	0,000	0,315	0,371
	CG	48	0,47/0,5							
	CC	24	0,24/0,22							

Примітка: n – кількість тварин у вибірці, Но – фактична гетерозиготність, Не – очікувана гетерозиготність, Fis – індекс фіксації Райта, PIC – інформаційний зміст поліморфізму, χ^2 - значення критерію

ська м'ясна за геном катепсина F (g.22 G > C SNP) представлені в таблиці 1.

В усіх досліджуваних вибірках свиней виявлено присутність як алелю g.22G, так і алелю g.22C, при цьому суттєвих міжпородних відмінностей не встановлено (табл. 1). Щодо розподілу генотипів, більшість тварин, виявилася носіями гетерозиготного генотипу g. 22CG ВБ (0,47), ПМ (0,52), М (0,52), ВЧ (0,47), за присутності незначної кількості гомозиготних тварин g.22CC ПМ (0,36), М (0,34), ВЧ (0,28), ВБ (0,29) у той же час кількість особин гомозиготного генотипу g.22GG ВБ (0,29), ПМ (0,12), М (0,1), ВЧ (0,14) було виявлено у значно меншій кількості. В усіх субпопуляціях спостерігалось незначне переважання фактичної частоти гетерозиготних генотипів над їх очікуваною частотою, що, у свою чергу, відбилося на значеннях індекса

фіксації Райта. Відхилення розподілу генотипів від розрахованого за формулою Гарді-Вайнберга виявилось незначним і не носило достовірного характеру ВБ ($\chi^2 = 0,315$), ПМ ($\chi^2 = 0,536$), М ($\chi^2 = 0,660$), ВЧ ($\chi^2 = 0,556$). Це вказувало на генетичну збалансованість досліджених субпопуляцій тварин за локусом *CTFS*, поліморфізм якого визначався за генетичним маркером g.22 G > C, а отже на відсутність селекційного тиску на нього.

Дані, отримані в результаті популяційного аналізу, дали змогу оцінити інформативність генетичного маркера *CTSF* g.22 G > C SNP у досліджуваних породах. Таке оцінювання було проведено шляхом розрахунку інформаційного змісту поліморфізму маркера. Середній рівень PIC (0,25–0,75) є оптимальним для пошуку асоціації певного генетичного маркера з ознаками продуктивності в даній популяції і сприят-

2. Асоціація між різними частотами алелей SNP *CTSF* g.22 G > C з продуктивними якостями великої білої породи свиней української селекції.

Продуктивні якості	Генотипи <i>CTSF</i> SNP g.22			p		
	22 GC	22 GG	22 CC	GC/GG	GG/CC	GC/CC
Вік досягнення живої маси 100 кг (днів)	199,92 ± 2,66	193,47 ± 2,29	198,36 ± 4,36	0,07	0,32	0,76
Шпик на рівні 10-го ребра, мм (розрахована на 100 кг живої ваги)	18,90 ± 0,54	19,44 ± 0,61	18,86 ± 1,01	0,51	0,62	0,97
Шпик на рівні 6-го - 7-го ребра, мм (розрахована на 100 кг живої ваги)	24,00 ± 0,68	24,07 ± 0,72	23,89 ± 1,06	0,94	0,88	0,93
Товщина шпику на рівні крижів, мм (розрахована на 100 кг живої ваги)	19,71 ± 0,60	19,96 ± 0,75	20,03 ± 0,96	0,79	0,96	0,78
Добовий приріст ваги, г (розрахована на 100 кг живої ваги)	504,68 ± 6,79	519,26 ± 6,07	509,30 ± 10,95	0,11	0,42	0,72

Примітка: p – рівень статистичної значущості різниці показника між групами; p ≤ 0,06-0,09- тенденція до зміни показника за критерієм t Стьюдента; p ≤ 0,05- p ≤ 0,001 — значуща зміна за критерієм t Стьюдента

ливим щодо перспективи селекції з використанням молекулярної інформації за даним маркером. Низький (менш як 0,25) і високий (більш як 0,75) рівні PIC не є бажаними для асоціативних досліджень [6]. Для діалельних поліморфних генетичних систем максимальний рівень PIC – 0,375. Щодо генетичного маркера *CTSF* g.22 *G>C* SNP, інформаційний зміст його поліморфізму в усіх субпопуляціях полтавської м'ясної, української великої білої, миргородської, великої чорної був на оптимальному для проведення асоціативних досліджень рівні (PIC = 0,358-0,375).

Результати асоціативних досліджень представлені в таблиці 2.

Статистично достовірних зв'язків генетичного маркера *CTSF* g.22 *G>C* SNP з досліджуваними ознаками продуктивності не виявлено. Встановлено лише тенденцію до його асоціації з віком досягнення тваринами живої маси 100 кг асоціації. Свині з генотипом GC характеризувалися більшим віком досягнення 100 кг у порівнянні з тваринами з генотипом GG ($p = 0,07$).

Висновки та перспективи.

В породах свиней миргородська, велика біла, велика чорна і полтавська м'ясна генетичний маркер *CTSF* g.22 *C>G* характеризувався поліморфізмом за переважання за частотою алеля g.22C. Не виявлено відхилення у розподілі *CTSF*-генотипів від збалансованого, визначеного за формулою Гарді-Вайнберга.

Рівень інформативності генетичного маркера *CTSF* g.22 *G>C* SNP в усіх породах був на оптимальному для асоціативних досліджень рівні (PIC = 0,358-0,375), що дозволяє проводити пошук зв'язків маркера з ознаками продуктивності свиней.

Встановлено тенденцію до асоціації генетичного маркера *CTSF* g.22 *G>C* SNP з віком досягнення тваринами живої маси 100 кг ($p = 0,07$).

Досліджувані популяції свиней порід полтавська м'ясна, миргородська, велика чорна, велика біла порода української селекції будуть використані для асоціативних досліджень з метою пошуку зв'язку маркерів з ознаками продуктивності свиней і впровадження маркер-асоційованої селекції.

References

1. Williams, J. L. (2005). The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Rev Sci Tech.*, 24, 379–91.
2. Cui, Y., Zhang, F., Xu, J., Li, Z., Xu, S. (2015). Mapping quantitative trait loci in selected breeding populations: A segregation distortion approach. *Heredity (Edinb)*, 115(6), 538–546.
3. NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100520004>.
4. Russo, V., Fontanesi, L., Davoli, R., Galli, S. (2004). Linkage mapping of the porcine cathepsin F (*CTSF*) gene close to the QTL regions for meat and fat deposition traits on pig chromosome 2. *Anim. Genet.*, 35, 155–157.
5. Russo, V., Davoli, R., Nanni, C. L., Fontanesi, L., Baiocco, C., Buttazzoni, L., Galli, S., Virgili, R. (1998). Association of the *CTSB*, *CTSF* and *CSTB* genes with growth, carcass and meat quality traits in heavy pigs. *Italian journal of animal Science*, 2, 67–69.
6. NCBI RS database. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.
7. Hao, L. L., Yu, H., Zhang, Y., Sun, S. C., Liu, Y. Z. (2011). Zeng Single nucleotide polymorphism analysis of exons 3 and 4 of *IGF-1* gene in pigs. *Genet. Mol. Res.*, 10, 1689–95.
8. Balatsky, V. N., Pochernyaev, K. F., Buslyk, T. V., Dykan, O. S., Korinnyi, S. N., Pena, R., Doran, O. (2015). Sequence variation in the

- cathepsin B (CTSB), L (CTSL), S (CTSS) and K (CTSK) genes in Ukrainian pig breeds. *Global J. Anim. Breed. Genet.*, 3 (3), 117–124.
9. Nonneman, D. J., Brown–Brandl, T., Jones, Sh. A., Wiedmann, R. T, Rohrer, G. A. (2012). A defect in dystrophin causes a novel porcine stress syndrome. *BMC Genomics*, 13, 233–238.
10. Peakall, R., Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
11. PIC calculator. Available at: <http://www.liv.ac.uk/~kempsj/pic.html>.
-

Y. Oliinychenko, V. Vovk, T. Buslik, M. Ilchenko, V. Balatsky (2019). GENETIC STRUCTURE OF DIFFERENT PIG BREEDS ON THE POLYMORPHISM OF THE CATHEPSIN F GENE. ANIMAL SCIENCE AND FOOD TECHNOLOGY, 10(1): 21-26. <https://doi.org/>

Abstract. Selection in pig breeding involves a set of measures that ensure the development of animal productivity through the improvement of the animal treats, herds and breeds. Effective breeding is not possible without the involvement of new approaches that predict animal DNA genotyping by chosen polymorphisms. Cathepsin F (CTSF) is the potential candidate for marker-associated selection, which directly participates in fat storing processes and meat quality in pigs. The genetic structure of Ukrainian Large White, Poltava Meaty, Ukrainian Large Black and Mirgorodska pig breeds for cathepsin F gene (CTSF g.22 G> C SNP) was determined, and basic population parameters were established. In all populations, the genetic marker was characterized by polymorphism with the predominance of the g.22C allele frequency. The level of informativity of CTSF g.22 G> C SNP was found at the optimal level for associative analysis (PIC = 0.358-0.375), which allows to invest to the research of marker association studies with traits. In the subpopulation of Ukrainian Large White pig breed, the analysis of the genetic marker CTSF g.22 G> C SNP was studied by following traits: the age for reaching live weight of 100 kg, the thickness of the backfat at the level of 6th - 7th rib, 10- th ribs, in the sacrum area and the average daily weight gain. A tendency towards the association of the CTSF g.22 G> C genetic marker with the age parameter for reaching live weight of 100 kg ($p = 0.07$) has been established. The studied populations of pig breeds can be used for associative researches in order to find associations between genetical markers and meat, backfat quality parameters.

Keywords: pigs, breeds, SNP, genetic structure, gene of cathepsin F
