

УДК 577.21; 636.082.12; 619

*М. Е. Михайлова, Е. Л. Романишко, Н. А. Камыш***ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ СВИНЕЙ
ПО ЛОКУСУ ГЕНА RYR1**

Мутация, вызывающая замену 1843C > T в экзоне 17 гена рецептора рианодина RYR1 в гомозиготном состоянии вызывает у свиней стресс-синдром. Исследование животных-носителей мутации (nn) не выявило, гетерозиготная форма генотипа (Nn) встречается с частотой в среднем 3,79%. Мутантный аллель n во всех исследованных хозяйствах встречался приблизительно с одинаковой частотой (0,02–0,03%). В ЗАО «Советская Белоруссия» выявлено 5,7% скрытых носителей мутации (Nn), в РУП «С/к «Заря» – 2,48%. В исследованных популяциях свиней обнаружено: 4,4% животных породы дюрок, 6,7% – породы крупной белой и 50% животных породы пьетрен обладали гетерозиготными генотипами.

Введение

Современное свиноводство развивается и совершенствуется на основе достижений генетики и биотехнологии. Признавая ведущую роль традиционных методов разведения, следует отметить, что применение только классической селекции уже не может обеспечить должного уровня эффективности селекционно-племенной работы [1].

Использование отбора по генетическим маркерам выводит селекцию на новый уровень, позволяя непосредственно оценивать генотипы, выявлять носителей скрытых мутаций в гетерозиготном состоянии [2].

Селекция свиней с помощью молекулярных маркеров – это поиск особенных различий по ДНК у пород и отдельных особей. До недавнего времени количество ДНК-маркеров, использованных в свиноводстве, было менее 100. Первым, наиболее известным ДНК-маркером стал ген Hal 1843, позволяющий контролировать ген стресса свиней. Зачастую фенотипическое изменение признака вызвано мутацией одного единственного нуклеотида в последовательности ДНК (точечные мутации), приводящей к изменению или обрыву аминокислотной последовательности белка. При оценке точечных мутаций с рецессивным типом наследования по фенотипу невозможно разделение гомозиготных носителей и гетерозиготных скрытых носителей наследственных изменений. Это приводит к тому, что даже при выбраковке всех носителей неблагоприятный рецессивный аллель сохраняется в популяции, и хотя с меньшей частотой, но все же проявляется в последующих поколениях. Использование молекулярно-генетических методов не только позволяет разделить популяцию на носителей и неносителей, но и делает возможной диагностику, а следовательно, и выбраковку скрытых носителей [3].

Сегодня в свиноводстве республики уделяется большое внимание разведению пород интенсивного типа, обладающих высокими показателями мясной продуктивности. В то же время интенсивная селекция свиней на мясность привела к нежелательным тенденциям – появлению у них гормональной и вегето-нервной неустойчивости, высокой нервной возбудимости и чувствительности сердечно-сосудистой системы, к ослаблению природной устойчивости, ухудшению качества мяса и увеличению стресс-чувствительности (PSS-синдром). Эти животные слишком «изнежены». Повышенная чувствительность некоторых пород свиней к стрессам становится все более острой проблемой, так как сопровождается большими экономическими потерями от падёжа свиней. Под действием таких стрессовых факторов, как перегрев, скученность, транспортировка, избежать которых в условиях животноводческого комплекса очень трудно, у животных развивается злокачественный гипертермический синдром (MHS – Malignant Hypertermia Syndrome), наблюдается резкое снижение рН на фоне высокой температуры тела (38–40° С), что приводит к гибели животных. Стресс у животных отражается также на качестве мяса. У таких свиней после убоя происходят быстрые биохимические изменения в скелетной мускулатуре (резко увеличивается концентрация молочной кислоты), в результате чего образуется так называемое PSE-мясо (бледная, водянистая, рыхлая свинина с кислым привкусом) или DFD (темная, сухая, жесткая, волокнистая свинина) [4].

PSS – это генетически обусловленная аномалия, имеет аутосомно-рецессивный тип наследования. Ранее для выявления стресс-чувствительности животных использовали галотановый

тест [4]–[6]. Определить наличие мутантного аллеля с помощью этого теста можно только для животных, являющихся рецессивными гомозиготами по RYR-гену, поэтому выбраковка галотан-положительных свиней с целью элиминации дефектного аллеля из популяции неэффективна [7].

MacLennan et al. (1990) и Fujii et al. (1991) выявили, что причиной злокачественной гипертермии является точковая мутация в экзоне 17 гена рианодинового рецептора, который кодирует экспрессирующийся в скелетных мышцах белок кальциевого канала [8]. Эта транзиция в позиции 1843 (C → T) приводит к замене аргенина на цистеин в позиции 615 рианодин-рецепторного белка, который находится в саркоплазматическом ретикулуме мышечного волокна, что вызывает нарушение основной функции этого белка, в результате чего происходит ряд биохимических изменений, приводящих к развитию злокачественной гипертермии [9]–[11].

Исследования Н. В. Рыжовой и Л. К. Калашниковой показали, что у пород свиней скороспелая мясная, крупная белая эстонской селекции, ландрас, цивильская и крупная белая выявлен генетический полиморфизм гена RYR1. Во всех исследуемых популяциях свиней обнаружено от 2 до 15% животных – носителей мутантного аллеля гена RYR1 в гетерозиготной форме. Среди животных крупной белой и миргородской пород носителей мутантного аллеля не был выявлен. Было обнаружено, что у 8% свиней в геноме есть аллель гена RYR1, поврежденный мутацией в составе гетерозиготного генотипа. Частота мутантного аллеля – 0,042 [12].

Цель исследования – изучить генетическую структуру некоторых популяций свиней пород крупная белая, белорусская мясная, ландрас, дюрок, йоркшир, пьетрен по локусу гена RYR1, ответственному за повышенную стресс-чувствительность.

Материалы и методы исследования. Было проведено ДНК-тестирование 482 особей: хряков-производителей, свиноматок и ремонтного молодняка, разводимых в РУП «С/к «Заря», ЧСУП «Золак-Агро», С/к «Яжевичи», С/к «Багратионовский», ЗАО «Советская Белоруссия» и РСУП «Брестплемпредприятие». Ядерную ДНК выделяли из отщипа ушной раковины животных фенольно-хлороформовым методом [13], [14]. Выделенную ДНК ресуспензировали и измеряли ее концентрацию. Для этого на спектрофотометре определяли степень поглощения раствором ДНК УФ-света с длиной волны 260 нм. Чем больше света поглощает раствор, тем выше концентрация ДНК. Для контроля степени очистки ДНК определяли соотношение оптических плотностей раствора ДНК при длине волны 260 и 280 нм.

Исследование фрагмента гена RYR1 проводили по полиморфизму длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию фрагмента Ryr-1 гена проводили с праймерами: RYR 56.1: gtg ctg gat gtc ctg tgt tcc ct; RYR 56.2: ctg gtg aca tag ttg atg agg ttt g в течение 35 циклов в следующем режиме: денатурация (94° С – 1 мин), отжиг праймеров (60° С – 1 мин), элонгация (72° С – 1 мин), длительная элонгация (5 мин при 72° С) с предварительной денатурацией при 94° С – 5 мин.

Амплификаты подвергались рестрикции эндонуклеазой HinfI, буфер Y = /Tango™, температура инкубации 37° С. Рестриктаза расщепляет исследуемую ДНК на определенное количество фрагментов фиксированной длины.

Продукты рестрикции разделяли в 2% агарозном геле в течение 20–40 мин в специальной камере, заполненной 1x TBE-буфером, при напряжении 80–120 V. Для приготовления геля растворяли 2 г агарозы в 98 мл 1x TBE-буфера. Нагревали до 100° С для растворения агарозы, постоянно перемешивая раствор, затем медленно охлаждали до 50–60° С. Добавляли в раствор агарозы Sibf Green 5000x 5–6 мкл на 100 мл раствора. Затем с помощью специальной кюветы и гребенки формировали гель с лунками, в которые внесли пробы в количестве 5–8 мкл, предварительно смешанные с 2 мкл загрузочного буфера (0,05% бромфеноловый синий – 100 мг, 3% фикол – 6 г, 25% сахароза – 50 г; довели объем 1x TBE-буфером до 200 мл). Затем исследуемые образцы визуализировали в проходящем УФ-свете на трансиллюминаторе. Полученные результаты регистрировали с помощью фотокамеры и переносили на компьютер для статистической обработки.

Если ДНК расщепляется рестриктазой на два фрагмента длиной 84 и 50 пн относительно маркера, мутация отсутствует, анализируемое животное стрессустойчивое с доминантным гомозиготным генотипом NN; если визуализируется одна яркая полоса длиной 134 пн, анализируемое животное классифицируется как стрессчувствительное с рецессивным гомозиготным генотипом nn (рисунок 1).

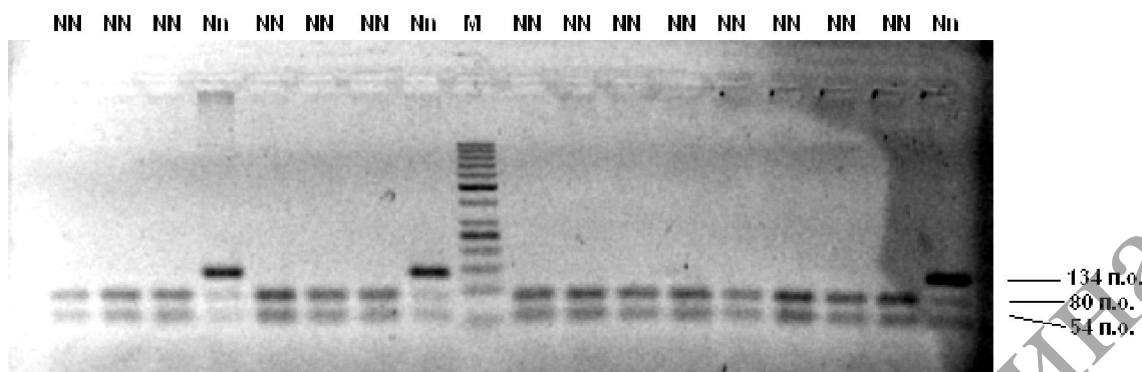


Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ анализа по гену RYR1

На рисунке показана электрофореграмма ПЦР-ПДРФ анализа по гену RYR1.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате исследования был выявлен полиморфизм гена RYR1, представленный двумя аллелями: N – доминантный дикий, n – рецессивный с точковой мутацией. Определены генотипы: NN – свободные от мутации (устойчивые к стрессу), Nn – скрытые носители. Генотип nn не выявлен (таблица 1).

Таблица 1 – Генетическая структура хряков-производителей, свиноматок и ремонтного молодняка по локусу гена RYR1

Хозяйство	Группы животных	Комбинация скрещиваний	Кол-во голов	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
				NN	Nn	nn	N	n
1	2	3	4	5	6	7	8	9
РУП С/к «Заря»	Хряки	Дюрок	29	96,55	3,45	-	0,98	0,02
			34	100,0	-	-	1,0	-
	Свиноматки		67	95,53	4,47	-	0,98	0,02
		Ремонт	КБ* х Л х ЭБ	7	100,0	-	-	1,0
		ЭБ х Д х КБ х ЭБ	8	100,0	-	-	1,0	-
		БМ х БЧП х ЭБ х Л	9	100,0	-	-	1,0	-
		КБ х ЭБ х БМ х БЧП	7	100,0	-	-	1,0	-
В среднем по хозяйству			161	97,52	2,48	-	0,98 ± 0,011	0,02 ± 0,011
ЧСУП «Золак-Агро»	Хряки		25	100,0	-	-	1,0	-
В среднем по хозяйству			25	100,0	-	-	1,0	-
С/к «Яжевичи»	Хряки	Ландрас	7	100,0	-	-	1,0	-
		Эстонская беконная	5	100,0	-	-	1,0	-
		БМ	2	100,0	-	-	1,0	-
		КБ	5	80,0	20,0	-	0,97	0,3
В среднем по хозяйству			19	94,44	5,56	-	0,99 ± 0,023	0,1 ± 0,023
С/к «Багратионовский»	Хряки	Дюрок	5	100,0	-	-		
		КБ	6	100,0	-	-		
		БМ	9	100,0	-	-		
		Эстонская беконная	3	100,0	-	-		
	Свиноматки	КБ	90	92,13	7,87	-	0,96	0,04
	Ремонт		80	96,25	3,75	-	0,98	0,02

Продолжение таблицы 1

В среднем по хозяйству			193	94,79	5,21	-	0,97 ± 0,012	0,03 ± 0,012
ЗАО «Советская Белоруссия»	Хряки	КБ	9	100,0	-	-	1,0	-
		Дюрок	7	85,72	14,28	-	0,93	0,07
		Пьетрен	2	50,0	50,0	-	0,50	0,50
		Эстонская беконная	3	100,0	-	-	1,0	-
		Ландрас	14	100,0	-	-	1,0	-
В среднем по хозяйству			35	94,3	5,7	-	0,97 ± 0,028	0,03 ± 0,028
РСУП «Брестплем предприятие»	Хряки	Ландрас	20	100,0	-	-	1,0	-
		Йоркшир	20	100,0	-	-	1,0	-
		Дюрок	5	100,0	-	-	1,0	-
		Л х Д	5	100,0	-	-	1,0	-
В среднем по хозяйству				100,0	-	-	1,0	-
ВСЕГО			482	96,21	3,79	-	0,98 ± 0,006	0,02 ± 0,006

*КБ – крупная белая, Л – ландрас, ЭБ – эстонская беконная, БМ – белорусская мясная, Д – дюрок, БЧП – белорусская черно-пестрая.

Результаты исследования 482 особей показали, что стрессчувствительных животных-носителей мутации в гомозиготном рецессивном состоянии (nn) не было выявлено, гетерозиготная форма генотипа (Nn) встречалась с частотой в среднем по всем хозяйствам – 3,79%. Мутантный аллель RYRⁿ во всех исследованных хозяйствах встречался приблизительно с одинаковой частотой – 0,02–0,03. Наибольшее количество скрытых носителей мутации (животные с гетерозиготным генотипом Nn) выявлено в ЗАО «Советская Белоруссия», а наименьшее – в РУП С/к «Заря» (5,7% и 2,48% соответственно). В ЧСУП «Золак-Агро» скрытых носителей мутантного аллеля выявлено не было.

Среди породы эстонская беконная, ландрас, белорусская мясная, йоркшир и помесных животных полиморфизма по RYR-гену выявлено не было (таблица 2).

Таблица 2 – Частоты генотипов и аллелей RYR1-гена у свиней Республики Беларусь

Порода	Количество голов	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
		NN	Nn	nn	N	n
Дюрок	46	95,4	4,6	-	0,98	0,02
Пьетрен	2	50,0	50,0	-	0,5	0,5
Ландрас	41	100,0	-	-	1,0	-
Эстонская Беконная	11	100,0	-	-	1,0	-
Крупная белая	20	93,3	6,7	-	0,97	0,03
Белорусская мясная	11	100,0	-	-	1,0	-
Йоркшир	20	100,0	-	-	1,0	-

Из исследованных животных пород дюрок, крупная белая и пьетрен 4,4%, 6,7% и 50% животных соответственно были гетерозиготными носителями злокачественной гипертермии. Такой высокий процент носителей мутации среди животных породы пьетрен может быть связан с недостаточностью выборки, однако такие показатели хорошо соотносятся с литературными данными, согласно которым наличие мутантного аллеля у породы пьетрен составляет 31–100% [15].

Выводы

В результате исследования был выявлен аллельный полиморфизм гена RYR1. Мутантный аллель RYRⁿ встречался с частотой 0,02, доминантный аллель RYR^N – с частотой 0,98 в среднем по всем хозяйствам. Животных с генотипом nn выявлено не было. Частота встречаемости особей с генотипом Nn в среднем по всем хозяйствам 3,79%. Среди исследованных пород наибольший процент животных-носителей мутантного аллеля выявлен у пород пьетрен (50%), дюрок (4,4%) и крупной белой (6,7%).

Проблема скрининга племенной продукции очень актуальна, особенно в условиях интенсивного завоза высокопродуктивных племенных животных из-за рубежа. Проведение генотипирования по RYR-гену позволяет выявить и удалить из популяции скрытых носителей злокачественной гипертермии, что будет способствовать увеличению откормочной, мясной продуктивности и улучшению качества свинины.

Список сокращений

RYR1 – ген рианодинового рецептора;
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
 PSS-синдром (porcine stress syndrom) – синдром стресса;
 MHS – (malignant hyperthermia syndrome) злокачественный гипертермический синдром;
 PSE-мясо – (pale, soft, exudative) экссудативное мясо;
 DFD-мясо – (dark, firm, dry);
 ПДРФ – полиморфизм длин рестриционных фрагментов;
 ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Литература

1. Эрнст, Л. К. Генетические основы селекции сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст. – М. : РАСХН, ВГНИИ животноводства, 2004. – 733 с.
2. Brascamp, E. Evaluation of six lines of pigs for crossing / E. Brascamp // *Reproduction and fattening in pure breeding*. – 1979. – № 96. – P. 60–61.
3. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase / R. K. Salkl [et al.] // *Science*. – 1988. – V. 239. – P. 487–491.
4. Archibald, A. L. Inherited halothane-induced malignant hyperthermia in pigs / A. L. Archibald // *Breeding for disease resistance in farm animals*. – CAB Intern. – Wallingford, Oxon, UK, 1991. – P. 449–466.
5. Eds. Chrousos, G. P. Stress: basic mechanisms and clinical implications / G. P. Eds. Chrousos // *Annals of The New York Acad. Sci.* – 1995. – V. 771. – P. 755.
6. Bouchard, T. J. Genes, environment and personality / T. J. Bouchard // *Science* – 1994. – V. 264. – P. 1700–1711.
7. Топіха, В. С. Стресчутлівість свиней породи дюрок внутрішньопородного типу «Степовий» / В. С. Топіха, О. О. Стародубець // *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. – Вип. 2. – 2008 – С. 150–154.
8. Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia / J. Fujii, K. Otsu, F. Zorzato [et al.] // *Science*. – 1991. – V. 253. – P. 448–451.
9. Hardge, T. The influence of RYR1-genotype and breed on fattening performance carcass value and meat quality / T. Hardge, A. Scholz // *45th Annual Meeting of the EAAP*. – Edinburg. – September 5–8. – 1994. – P. 340.
10. Russo, V. Study of halothane locus by PCR-typing of CRC gene in pig breeds reared in Italy / V. Russo // *Int: Abstr. XXIV. Int. Conf. Anim. Genetics*. – Praha. – 1994. – P. 137.
11. O'Brien, P. J. Porcine malignant hyperthermia susceptibility: Hypersensitive calcium – release mechanism of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum / P. J. O'Brien // *Vet. Res. Commun.* – 11. – 1987. – P. 527–559.
12. Рыжова, Н. В. Ген RYR1 и продуктивность свиней мясных пород / Н. В. Рыжова, Л. К. Калашникова // *Животноводство России*. – 2003. – С. 46–47.
13. Зиновьева, Н. А. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н. А. Зиновьева, Е. А. Гладырь // *Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: материалы Междунар. науч. конф., 19–20 дек. 2002 г.* / ВГНИИ животноводства. – Дубровицы, 2002. – С. 44.
14. ДНК-технология оценки сельскохозяйственных животных / Л. А. Калашникова [и др.]. – ВНИИплем. – 1999. – 148 с.
15. Анализ генетической структуры популяций хряков-производителей по локусу гена RYR1 / И. П. Шейко [и др.] // *Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. / редкол.: И. П. Шейко (гл. ред.) [и др.]* – Т. 39. – 2004. – С. 166–170.

Summary

A genetic structure of some pig populations of major breeds in RB was studied for RYR1 gene locus. Mutation that causes replacement 1843C > T in exon 17 receptor gene rianodina RYR1 in the homozygous state causes stress syndrome by pigs. The animals-carriers of the mutation (nn) are not revealed during the studying. Geterozyt form of genotype (Nn) occurs with a frequency of approximately 3,79%. The frequency of the preferable allele N of RYR-gene was revealed to be 0,98. The mutant n-allele was shown to occur in Duroc, Large White and Pietrain breeds of the studied sample with the same frequency, on the average 3,79%.

Поступила в редакцию 02.02.11.