

ВЛИЯНИЕ ГАПЛОТИПОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ДНК НА ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ У СВИНЕЙ

Е. Ю. КАНЮКА

Полтавский научно-исследовательский экспертно-криминалистический центр МВД Украины,
г. Полтава, Украина, 36004

(Поступила в редакцию 22.05.2020)

Гаплотипы мтДНК по-разному влияют на фенотип организма. Цель: определить наличие связи между гаплотипами мтДНК изученных свиней с фенотипическими признаками в разных мышцах. Исследовались образцы мышечной ткани свиней, которые отбиралась от парных туш (кастраты) породы ландрас и крупная белая английской селекции, выращенных до 96–112 кг. Было установлено, что в полуперепончатой мышце свиней с гаплотипом N содержится в 2 раза больше жира, чем у их аналогов с гаплотипом C. Аналогичную ситуацию наблюдаем и с показателем мраморности. При этом содержание каприновой кислоты в этой мышце на 27 % выше у свиней с гаплотипом C. Для свиней с гаплотипом C в длиннейшей мышце спины характерно на 16 % большее количество фракции солерастворимых белков. В реберной части диафрагмы свиней с гаплотипом C на 1,5 % содержится больше гигровлаги, чем у свиней с гаплотипом N и на 37 % вырабатывается креатинина больше. Возможно это свидетельствует, о том что в мышце свиней с гаплотипом C преобладают гликолитические волокна. Аналогичная ситуация обстоит и с линолевой кислотой, которой на 20 % больше у свиней с гаплотипом C. В трапецевидной мышце свиней с гаплотипом C содержится на 25 % больше каприловой кислоты и на 10 % больше олеиновой кислоты. Мышечная ткань свиней с мтДНК гаплотипом C, имеет значительные отличия в типе обмена веществ относительно их аналогов с гаплотипом N. Можно лишь предположить, что образ жизни предков исследуемых свиней, привел к мутациям в митохондриальном геноме и в эволюционном процессе закрепил эти мутации. Таким образом сформировались европейские и азиатские типы, которые в свою очередь могли повлиять на формирование предпочтительного типа обмена веществ в мышечной ткани (окислительный или гликолитический).

Ключевые слова: митохондриальное ДНК, гаплотип C, гаплотип N, мышечная ткань, обмен веществ, окислительный тип, гликолитический тип.

MtDNA haplotypes affect the phenotype of an organism in different ways. The purpose is to determine the presence of a relationship between the mtDNA haplotypes of the studied pigs with phenotypic traits in different muscles. Samples of the muscle tissue of pigs were studied, which were taken from paired carcasses (castrates) of the Landrace breed and the Large white breed of English selection, grown to 96–112 kg. It was found that the semimembranous muscle of pigs with haplotype N contains 2 times more fat than their counterparts with haplotype C. A similar situation is observed with the marbling index. At the same time, the content of capric acid in this muscle is 27 % higher in pigs with haplotype C. For pigs with haplotype C, the longest muscle of the back is characterized by a 16 % greater amount of the salt-soluble protein fraction. The costal part of the diaphragm of pigs with haplotype C contains 1.5 % more hygro-moisture than pigs with haplotype N and produces more creatinine by 37 %. Perhaps this indicates that glycolytic fibers predominate in the muscle of pigs with haplotype C. A similar situation is with linoleic acid, which is 20 % more in pigs with haplotype C. The trapezius muscle of pigs with haplotype C contains 25 % more caprylic acid and 10 % more oleic acid. The muscle tissue of pigs with mtDNA of haplotype C has significant differences in the type of metabolism relative to their counterparts with haplotype N. It can only be assumed that the lifestyle of ancestors of the studied pigs led to mutations in mitochondrial genome and fixed these mutations in evolutionary process. Thus, the European and Asian types were formed, which in turn could influence the formation of preferred type of metabolism in muscle tissue (oxidative or glycolytic).

Key words: mitochondrial DNA, haplotype C, haplotype N, muscle tissue, metabolism, oxidative type, glycolytic type.

Введение

Митохондрии являются ключевыми органоидами клетки, которые участвуют в энергетическом обмене, апоптозе, развития ряда патологий и старении. Наряду с ядерной ДНК, митохондриальная ДНК также подвергалась эволюционному влиянию, что приводило к нуклеотидной замене в различных генах, в результате чего были образованы гаплогруппы с различными аллельными состояниями в исследуемых генах. Митохондриальный геном свиньи содержит 16,679 нуклеотидов, входящих в состав 37 генов, из них 13 генов, кодирующих белки и 22 гена, кодирующих транспортную РНК. Кроме этого, митохондриальный геном свиньи кодирует 16S рРНК большой и 12S рРНК малой субъединиц рибосом [1].

Митохондриальный геном, наследуется по материнской линии, за счет кодирования белков электрон-транспортной цепи осуществляет контроль окислительного фосфорилирования (ОХРНОС), производства активных форм кислорода (ROS), термогенеза, клеточного гомеостаза кальция и регуляции апоптоза [2, 3] Индивидуумы, которые имеют разновидность определенных генов в мтДНК, относятся к различным гаплотипам. Гаплотипы мтДНК однозначно по-разному влияют на фенотип организма. В животноводстве некоторые гаплотипы мтДНК связанные с улучшением качества молока и мяса, в то время как другие гаплотипы мтДНК связанные с продолжительностью жизни, производительностью [4, 5] и восприимчивостью к болезням [6]. Изучению влияния гаплотипов мтДНК на фенотип домашних животных уделялось крайне мало внимания.

На сегодняшний день различают 18 вариантов (гаплотипов) митохондриальной ДНК, которые обозначаются латинскими буквами от А до Р. По мнению большинства ученых, определенные гаплотипы характеризуют следующие породы свиней: А – дюрок (европейский тип), мангалица; В1, В2 – миргородская; С – ландрас, гемпшир, уэльс (восточноевропейский тип), дикая свинья (Украина, Польша); D и E – найдены у домашних свиней Австралии, G – Уэльс (западноевропейский тип), дикая свинья (Италия); I – ландрас (европейский тип); J1 – крупная белая (азиатский тип I), мэйшань, азиатская дикая свинья (север Японии), J2 – крупная черная; L – крупная белая (западноевропейский тип); M – дюрок (азиатский тип); N – крупная белая (азиатский тип II), беркшир, азиатская дикая свинья (юг Японии), O – ландрас (восточноевропейский тип), дикая свинья (Швеция); P – азиатская дикая свинья (юг Японии), F, H, K – не найдены среди пород домашней свиньи [7]. В тоже время другие ученые считают, что при современных подходах к размножению, где происходит обширное скрещивание внутри и между породами, гаплотип мтДНК животного больше указывает на его породу, а скорее определяет его общее происхождение от матери. Так же установлено, что разные мт ДНК гаплотипы демонстрировали разные репродуктивные стратегии для достижения своих соответствующих размеров пометов [8].

В этой работе мы поставили цель: определить наличие связи между гаплотипами изученных свиней с фенотипическими признаками в разных мышцах свиней пород ландрас и крупная белая. Небольшое количество животных позволит определить перспективность изучения связи гаплотипов с определенными показателями.

Основная часть

Нами были исследованы образцы мышечной ткани свиней, которые отбирались от парных туш (кастраты) породы ландрас (n = 5) и крупная белая английской селекции (n = 5), выращенных на крупном промышленном предприятии «Таврический бекон» ЗАО «Фридом Фарм Бекон» до 96–112 кг. Мышцы выбраны по их значению в разных частях туши и как мышцы с различными функциями: полуперепончатая (m. Semimembranosus), длинейшая мышца спины (m. Longissimus dorsi), вентрально-зубчатый (m. Serratus ventralis), прямая мышца живота (m. Rectus abdominis), реберная часть диафрагмы (parscostalis diafragmatis) и трапециевидная мышца (m. trapezius (pars cervicalis)).

Выделение ДНК проводили с использованием ионообменной смолы Chelex 100. Амплификацию фрагмента контролирующего региона, который находится между позициями 15534 и 15962 митохондриального (МТ) генома свиньи, проводили на программируемом термостате Терцик-2 (ДНК-технологии, Россия) с использованием набора реагентов «Тапотили» (ГосНИИ генетика, Россия) и олигонуклеотидных праймеров дизайна сотрудниками Института свиноводства и АПП НААН [7]. Аликвоту продукта ПЦР (10 мкл) гидролизировали эндонуклеазой Tas I (MBT Fermentas, Литва). Продукты амплификации и гидролиза ДНК анализировали в 8 % полиакриламидном геле. Как маркер молекулярной массы использовали ДНК плазмиды pUC19/MspI, гидролизованной эндонуклеазой Msp I. Визуализацию продуктов амплификации и рестрикции осуществляли путем окрашивания бромистым этидием и фотографированием на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете.

В исследуемых мышцах свиней определяли физико-химические показатели (цвет, влага, сухое вещество, начальная влага, гигровлага [9]), белковый состав (азот, протеин, водо-, соле-, щелочерастворимые белки [10]), азотистые вещества (креатинин [11], карнозин, триптофан, оксипролин), энергетический обмен (жир [9], холестерин, энергетическая ценность, жирно кислотный состав [12], мраморность [13]), прооксидантно-антиоксидантная система (малоновый диальдегид, цитохромоксидаза, окислительная модификация белков, ксантинооксидаза, каталаза, аскорбиновая кислота, диеновые конъюгаты). Статистическую обработку данных проводили в расчетной среде табличного процессора Excel. Рассчитывали среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (m). С помощью однофакторного дисперсионного анализа и доверительного интервала разницы средних определяли статистически значимые различия между полученными гаплотипами. Обсуждение полученных результатов проводили только для показателей, которые имели статистическую значимую разницу данных.

Нами были установлены следующие гаплотипы исследуемых туш свиней: 4 животных породы ландрас имели гаплотип С (ландрас, гемпшир, уэльс (восточноевропейский тип), дикая свинья (Украина, Польша)), 1 животное породы ландрас и 2 животных породы крупная белая имели гаплотип – N (крупная белая (азиатский тип II)), по 1 животному крупной белой породы имели гаплотипы J1 (крупная белая (азиатский тип I), мэйшань, азиатская дикая свинья (север Японии)), J2 (крупная черная) и G (уэльс (западноевропейский тип), дикая свинья (Италия)).

На основе гаплотипирования по митохондриальной ДНК было установлено, что 4 свиньи породы ландрас происходят от свиноматок породы ландрас, 1 свинья от свиноматки крупной белой породы. Более разнообразной по гаплотипами оказались представители крупной белой породы. Их праматери происходят от крупной белой породы азиатского типа II (2 свиньи), крупной белой азиатского типа I (1 свинья), крупной черной породы (1 свинья), уэльс (западноевропейский тип) (1 свинья).

Сравнительные исследования проводили между группой свиней с гаплотипом С (n = 4) и группой свиней с гаплотипом N (n = 3). Для каждого из 26 исследуемых показателей применили однофакторный дисперсионный анализ. В результате исследования выявили в 9 случаях достоверную разницу ($p \leq 0,05$). Для показателей прямой мышцы живота и вентрально-зубчатой мышцы не получено достоверной разницы. Это может быть связано с малой величиной выборки. Полученные данные занесли в таблицу.

Показатели мышечной ткани свиней с гаплотипами С и N мтДНК

| Мышца | Показатель | Гаплотип С | Гаплотип N | p | ДИ |
|--------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-------|------------------|
| Полуперепончатая | Жир, % | 0,87 ± 0,076 | 1,80 ± 0,417 | 0,049 | 0,003 – 1,856 |
| | мраморность | 2,4 ± 0,25 | 5,2 ± 1,16 | 0,042 | 0,14 – 5,36 |
| | каприновая кислота, % | 0,48 ± 0,029 | 0,35 ± 0,025 | 0,026 | 0,023 – 0,235 |
| Длиннейшая мышца спины | Солераство-римые белки, г% | 0,62 ± 0,015 | 0,52 ± 0,022 | 0,009 | 0,04–0,17 |
| Реберная часть диафрагмы | гигровлага, % | 5,07 ± 0,310 | 3,57 ± 0,209 | 0,013 | 0,46 – 2,55 |
| | Креатинин, мкмоль/кг | 4687,4 ± 229,62 | 2937,4 ± 652,52 | 0,035 | 182,83 – 3317,20 |
| | линолевая кислота, % | 8,25 ± 0,360 | 6,58 ± 0,369 | 0,024 | 0,31 – 3,01 |
| Трапецевидная | каприловая кислота, % | 0,08 ± 0,002 | 0,06 ± 0,005 | 0,024 | 0,003 – 0,03 |
| | олеиновая кислота, % | 45,60 ± 1,15 | 41,08 ± 1,040 | 0,038 | 0,37 – 8,66 |

В полуперепончатой мышце свиней с гаплотипом N содержится в 2 раза больше жира ($p=0,049$), чем у их аналогов с гаплотипом С. Таким образом, первые способны в окороке (именно там находится эта мышца) накапливать больше внутримышечного жира. Аналогичную ситуацию наблюдаем и с показателем мраморности – доверительный интервал разницы между исследуемыми гаплотипами составляет 0,14–5,36 ($p=0,042$). Эти результаты позволяют предположить, что повышенное содержание внутримышечного жира связано с преобладанием окислительных процессов в мышце. Полученные данные согласуются с исследованиями, проведенными на свиньях породы цзиньхуа и ландрас [8].

При этом содержание каприновой кислоты в этой мышце на 27 % выше ($p=0,026$) у свиней с гаплотипом С.

В классической для исследователей мышце – длиннейшей мышце спины – мы обнаружили лишь достоверную разницу во фракции солерастворимых белков. Для свиней с гаплотипом С характерно на 16 % большее их количество ($p=0,009$). Доверительный интервал разницы составляет 0,04–0,17 г%. Как известно, к солерастворимым белками относятся миофибриллярные белки (миозин, актин, актомиозин), которые собственно и формируют мышечную часть [10].

В реберной части диафрагмы свиней с гаплотипом С на 1,5 % содержится больше гигровлаги, чем у свиней с гаплотипом N и на 37% вырабатывается больше креатинина ($p=0,035$). Возможно это следствие того, что в мышце свиней с гаплотипом С преобладают гликолитические волокна. Известно, что гликолитические (тип II-B) мышцы с преобладанием энергообеспечения за счёт гликолиза и креатинфосфатного пути. Что подтверждается данными полученными при исследовании свиней породы цзиньхуа и ландрас [8].

Аналогичная ситуация обстоит и с линолевой кислотой, которой на 20 % больше ($p=0,024$) у свиней с гаплотипом С. Как известно, линолевая кислота не синтезируется в организме животных, а поступает с пищей и потом принимает участие в энергетическом обмене. Ее деградация происходит через β -окисление [14]. Учитывая то, что кормление свиней было идентичным, мы можем предположить, что гаплотипу С характерен гликолитический путь обмена веществ (креатинфосфатный), то в свою очередь интенсивность окислительных процессов ниже, и соответственно сохранение линолевой кислоты в мышце свиней с гаплотипом С выше (доверительный интервал разницы 0,31–3,01 %).

В трапецевидной мышце свиней с гаплотипом С содержится на 25 % больше каприловой кислоты и на 10 % больше олеиновой кислоты. Содержание большого количества каприловой кислоты, на наш взгляд, имеет то же объяснение что и содержание линолевой кислоты в мышечной ткани свиней с гаплотипом С. Так же известно, что повышение ненасыщенных жирных кислот группы C18 в основном за счет олеиновой кислоты, приводит к снижению индекса интенсивности обмена липидов.

Что подтверждает предположение о низкой интенсивности окислительных процессов в организме свиней с гаплотипом С в сравнении с их аналогами, которые имели мтДНК гаплотип N [15].

Заключение

Наши исследования указывают на связь между некоторыми фенотипическими признаками и гаплотипами мтДНК. Мышечная ткань свиней с мтДНК гаплотипом С, имеет значительные отличия в типе обмена веществ относительно их аналогов с гаплотипом N. Можно лишь предположить, что образ жизни предков исследуемых свиней, привел к мутациям в митохондриальном геноме и в эволюционном процессе закрепил эти мутации. Таким образом сформировались европейские и азиатские типы, которые в свою очередь могли повлиять на формирование предпочтительного типа обмена веществ в мышечной ткани (окислительный или гликолитический). Поэтому в свиноводстве может быть полезно определить гаплотипы мтДНК в популяциях, чтобы принимать обоснованные решения о том, какие признаки продолжать развивать.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ursing, B. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Pig (*Sus scrofa*) / B. Ursing, U. Arnason // *J. Mol. Evol.* – 1998. – № 47. – P. 302–306.
2. Kim, M. Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan® real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region / M. Kim, I. Yoo, SY Lee, Y. Hong, HY Kim // *Food Chem.* – 2016. – Nov 1., Vol. 210. – P. 102–106.
3. Колосова, М. А. Изучение гена COX2 мтДНК свиней различного происхождения / М. А. Колосова, Н. Ф. Бакоев, А. Ю. Колосов и др. // *Международный научно-исследовательский журнал.* – 2019. – № 1 (79), Часть 2. – С. 10–13.
4. Tsai T. The relationship between mitochondrial DNA haplotype and the reproductive capacity of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) / T. Tsai, S. Rajasekar, J. C. St. John // *BMC Genet.* – 2016. – № 17. – P. 67 – режим доступа: <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0375-4>
5. Yu, G. Mitochondrial haplotypes influence metabolic traits in porcine transmitochondrial cybrids / G. Yu, H. Xiang, J. Tian, J. Yin, C. A. Pinkert, Q. Li, X. Zhao. // *Sci Rep.* – 2015. - № 5. – режим доступа: doi.org/10.1038/srep13118
6. Walsh P. S. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material / P. S. Walsh, D. A. Metzger, R. Higuchi // *BioTechniques.* – 1991. – №10. – P. 506.
7. Спосіб визначення мітохондріальних гаплотипів свиней: пат. UA №А61D7/00 / Почерняєв К. Ф. – Опубл. 16.05.2005.
8. Guo J. Comparisons of different muscle metabolic enzymes and muscle fiber types in Jinhua and Landrace pigs / J. Guo, T. Shan, T. Wu, L. N. Zhu, Y. Ren, S. An, Y. Wang // *Journal of Animal Science.* – 2011. – Vol. 89, iss 1. – P. 185–191.
9. М'ясо та м'ясні продукти. Метод визначення загального вмісту жиру. ДСТУ ISO 1443:2005 – Вед. 01.03.2008. – Київ: Держспоживстандарт України, 2007 – С. 9.
10. Антипова, Л. В. Методы исследования мяса и мясных продуктов / Л. В. Антипова, И. А. Глотова., И. А. Рогов. – М.: Колос, 2004. – С. 69–71.
11. Набори реактивів для дослідження білкового обміну. – ТУ У 24.4-24607793-018-2003. – № держ. реєстр. 2218/2003.
12. Канюка, О. Ю. Визначення жирнокислотного складу внутрішнього жирового жиру методом газохроматографічного аналізу / О. Ю. Канюка, С. Г. Зінов'єв // *Біологія тварин.* – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 151.
13. Поливода, А. М. Методика оценки качества продуктов убоя у свиней / А. М. Поливода, Р. В. Стробыкина, М. Д. Любецкий // *Методики исследований по свиноводству / Ф. К. Почерняев и др. – ВАСХНИЛ, Полтавский НИИ свиноводства. – Харьков, 1977. – С. 48–56.*
14. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем. – М.: Мир, 2004. – С. 164–174.
15. Алексеев, А. Л. Жирнокислотный состав общих липидов шпика свиней различных пород и типов / А. Л. Алексеев, В. А. Бараников, О. Р. Барило // *Все о мясе.* – 2011. – №4. – С. 48–49.