

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПОВ ПО *IGF2*, *SSKAR* И *MC4R* НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ПЛЕМЕННУЮ ЦЕННОСТЬ СВИНЕЙ ПО ХОЗЯЙСТВЕННО ПОЛЕЗНЫМ ПРИЗНАКАМ*

Е.Е. МЕЛЬНИКОВА¹, Н.В. БАРДУКОВ¹, М.С. ФОРНАРА¹,
О.В. КОСТЮНИНА¹, А.А. СЕРМЯГИН¹, А.М. ЗАЙЦЕВ², Н.А. ЗИНОВЬЕВА¹

Разработка программ маркерной селекции должна основываться на полиморфизмах, генетическое влияние которых на показатели продуктивности и племенной ценности животных достоверно и значимо. Перспективы использования геномной селекции у свиней связывают с разработкой ДНК-матриц низкой плотности (LD, low density) с включением в них SNP (single nucleotide polymorphisms), отобранных по результатам GWAS-анализа (genome-wide association studies) с использованием HD-панелей (high density). Потенциальными ДНК маркерами для включения в LD-панели служат гены инсулиноподобного фактора роста 1 (*IGF2*), рецептора холицистокинина А (*SSKAR*), рецептора меланокортина 4 (*MC4R*). Многочисленные исследования свидетельствуют о достоверном влиянии этих генов на вариацию таких фенотипических показателей, как конверсия корма, скорость роста, наращивание мышечной массы, отложение жира у свиней. Целью настоящей работы было изучение комплексного влияния генотипов по *IGF2*, *SSKAR* и *MC4R* на показатели мясной и откормочной продуктивности у свиней (*Sus scrofa*) пород крупная белая и ландрас российской селекции. В 2017-2018 годах в ООО «Селекционно-гибридный центр» (Воронежская обл.) была сформирована выборка из 1262 животных, которая включала свиней пород крупная белая ($n = 667$) и ландрас ($n = 595$). Фенотипы свиней определяли для показателей глубины мышцы (MD, muscle depth, мм), скорректированного возраста достижения живой массы 100 кг (AGE_{100} , сут) и толщины шпика (BF, back fat) в трех точках: BF1 (в области 6-7 ребра, мм), BF2 (в области 10 ребра, мм) и BF3 (в области 14 ребра, мм). ДНК выделяли из проб ткани хряков (ушной выщип) с использованием набора реагентов ДНК-Экстран-2 (НПО «Синтол», Россия). Оценивали концентрацию и качество ДНК. Полиморфизм гена определяли методом real-time ПЦР. SNP в генах *SSKAR* и *MC4R* выявляли методом мультиплексной ПЦР с FLASH-детекцией. Частоты аллелей ДНК маркеров (pA) у свиней пород ландрас и крупная белая составили соответственно 27,2 и 86,3 % для *IGF2*, 0,6 и 21,1% для *SSKAR*, 54,1 и 60,0 % для *MC4R*. Значения коэффициентов наследуемости (h^2) равнялись 0,204-0,242 для BF1, BF2, BF3, 0,309 — для MD, 0,366 — для AGE_{100} . Разработано уравнение модели и доказано достоверное влияние отдельных факторов (порода, пол, год рождения животного), в том числе конкретных генотипов по анализируемым ДНК-маркерам (для *IGF2* и *MC4R* на BF1, BF2 и BF3, $P > 0,95$), на изменчивость фенотипических показателей и племенную ценность (EBV) особей по мясной и откормочной продуктивности. Для каждого из трех маркеров в модели была показана доля аддитивной генетической вариации от 0,5 до 7,6 % при $P > 0,95-0,999$. Выявлены экономически значимые варианты желательных аллелей по маркеру *IGF2* (A) и *MC4R* (A). Животные с генотипом AA по *IGF2* и *MC4R* имели достоверно лучшие EBV по анализируемым признакам (согласно результатам по методу наименьших квадратов), превосходя особей, гомозиготных по альтернативному аллелю G. Установлена закономерность, характеризующая аддитивное компенсирующее влияние сочетаний генотипов по *IGF2* и *MC4R* на откормочные качества животных. Лучшими характеристиками по показателям толщины шпика отличались животные, имеющие в своем генотипе наибольшее число аллелей A по *IGF2* и *MC4R*, по сравнению с животными с генотипом GG (по обоим маркерам). Различия между группами, несущими в генотипе от одного до четырех аллелей A, и группой, не имеющей аллеля A (генотипы GG по обоим ДНК маркерам), составили по BF1 от 7,9 до 21,0 %, BF2 — от 8,5 до 21,4 %, BF3 — от 9,9 до 22,6 %, MD — от 2,8 до 3,2 %. Таким образом, генотипы по ДНК маркерам *IGF2* и *MC4R* могут быть использованы в маркерной селекции свиней пород крупная белая и ландрас по отдельным показателям мясных и откормочных качеств.

Ключевые слова: свиньи, крупная белая порода, ландрас, *IGF2*, *SSKAR*, *MC4R*, полиморфизм, оценка племенной ценности особей (EBV), откормочные и мясные качества.

Геномная селекция рассматривается в качестве перспективной стратегии генетического совершенствования сельскохозяйственных животных, включая свиней (1-3). Интеграция геномных методов в селекцию свиней

* В исследованиях было использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Исследования выполнены при поддержке Министерства образования и науки РФ, уникальный номер проекта RFMEFI60417X0182.

стала возможной благодаря созданию коммерческих SNP-панелей (single nucleotide polymorphisms) для высокопроизводительного генотипирования с плотностью от 10,2 тыс. до более 650 тыс. SNP (4). Если в скотоводстве программы геномной селекции реализуются на основе использования SNP-панелей средней (MD, medium density) и высокой плотности (HD, high density) (2, 5, 6), то в свиноводстве применение MD- и HD-панелей экономически неоправданно. Внедрение геномной селекции у свиней связывают с разработкой ДНК-матриц низкой плотности (LD, low density) с включением в них SNP, отобранных по результатам GWAS-анализа (genome-wide association studies) с использованием MD- и HD-панелей (7-10). Для повышения информативности LD-панелей в них дополнительно включают SNP, локализованные в «главных» генах, ассоциированных с QTL. В настоящее время известно более десяти генов, оказывающих заметный эффект на основные хозяйственно полезные признаки свиней (11). Их включение в LD-панели будет способствовать повышению точности прогноза получаемых значений племенной ценности (EBV, estimated breeding values). Для отбора экономически значимых SNP необходимо проводить оценку их влияния на хозяйственно полезные признаки в популяциях, где реализуются программы маркерной и геномной селекции. Потенциальными ДНК маркерами для включения в LD-панели служат гены инсулиноподобного фактора роста 2 (*IGF2*), рецептора холицистокинина А (*CCKAR*), рецептора меланокортина 4 (*MC4R*).

Ген *IGF2* локализован на дистальном конце хромосомы SSC2 свиней (12). Выявлена мутация G3072A, оказывающая существенное влияние на скорость роста, наращивание мышечной массы и отложение жира у этих животных (13-15). В последующем действие этой мутации подтверждено в многочисленных исследованиях, проведенных на различных популяциях свиней как зарубежной (16, 17), так и отечественной селекции (18, 19). Преимущество использования *IGF2* в качестве ДНК маркера обусловлено его патернальным характером: действие генотипа отца по *IGF2* проявляется в потомстве вне зависимости от генотипа матерей (13). Другое преимущество *IGF2* связано с позитивным влиянием потенциально «желательного» с точки зрения откормочных качеств аллеля А на воспроизводительные качества (18).

CCKAR — один из важнейших рецепторов, участвующих в регуляции чувства голода (20, 21). Ген *CCKAR* свиней картирован на хромосоме SSC8 (22). Известен экономически значимый SNP A179G (1-й экзон) (23), ассоциированный с энергией роста и конверсией корма свиней: животные, несущие хотя бы один аллель G, характеризуются в среднем на 3 % более высокими среднесуточными приростами и на 5 % более высокими затратами корма на 1 кг прироста (23, 24).

MC4R вовлечен в регуляцию деятельности гипоталамо-гипофизарно-адренальной оси (hypothalamic—pituitary—adrenal axis, HPA) через вазопресинергические и кортикотропные нейроны (25). Экспрессия *MC4R* в участке мозга, регулирующем аппетит, позволяет предполагать его связь с потреблением корма и балансом энергии. Локус *MC4R* картирован на хромосоме SSC1 в области q22-27 (26). Известна мутация G→A, приводящая к аминокислотной замене Asp298Asn, для которой установлена связь с повышением упитанности, приростов живой массы и увеличением потребления корма (26). Популяционно-генетические исследования показали существенные различия в частотах аллелей *MC4R* ($p_A = 0,24-1,00$) как между, так и внутри различных пород свиней (27-29). Установлена связь распределения аллелей *MC4R* с используемыми селекционными стратегиями. Так,

в линии свиней крупной белой породы, отселектированной на высокую мясность и низкую конверсию корма, частота аллеля *A* по *MC4R* составила $p_A = 0,52$ против $p_A = 1,00$ в линии, отселектированной на низкую мясность и высокую конверсию корма (30). Имеющиеся данные о влиянии полиморфизма *MC4R* на продуктивные показатели не носят универсального характера. Однако выявлено заметное влияние этого гена на среднесуточный прирост чистопородных свиней (28-30) и кроссов (31-33), потребление корма (27), а также наращивание мышечной массы и содержание жира в туше (33-35). Установлен существенный эффект полиморфизма *MC4R*, проявляемый в отношении потребления корма, что, в свою очередь, оказывало влияние на толщину шпика и скорость роста (различия 5-8 %) (27). Действие мутации на перечисленные признаки отмечали практически во всех изученных коммерческих линиях. Максимальные средние различия для комбинированных генотипов составили 2 мм по толщине шпика, 70 г/сут — по среднесуточному приросту, 2 % — по содержанию мяса. К. Salajpal с соавт. (36) установили существенное влияние генотипа по *MC4R* на толщину шпика ($GG < AA$) и процентное содержание мяса в туше ($GG > AA$, $p < 0,05$) у товарных свиней.

Включение в селекционные программы нескольких ДНК маркеров требует оценки их комплексного действия на проявление хозяйственно полезных признаков, а также установления количественных связей с показателями племенной ценности (EBV).

В настоящей работе мы впервые выполнили исследование ассоциаций полиморфизмов нескольких генов, участвующих в регуляции ряда метаболических и физиологических процессов, с признаками мясной и откормочной продуктивности свиней, разводимых в России, и установили достоверную связь некоторых генотипов по *IGF2*, *CCKAR*, *MC4R* с изменчивостью этих показателей.

Нашей целью было изучение комплексного влияния генотипов по *IGF2*, *CCKAR* и *MC4R* на показатели мясной и откормочной продуктивности у свиней пород крупная белая и ландрас.

Методика. В 2017-2018 годах в ООО «Селекционно-гибридный центр» (Воронежская обл.) была сформирована выборка из 1262 животных, которая включала свиней (*Sus scrofa*) пород крупная белая ($n = 667$) и ландрас ($n = 595$) российской селекции. Фенотипы свиней определяли по показателям глубины мышцы (MD, muscle depth, мм), скорректированного возраста достижения живой массы 100 кг (AGE_{100} , сут) и толщины шпика (BF, back fat) в трех точках — BF1 (в области 6-7 ребра, мм), BF2 (в области 10 ребра, мм) и BF3 (в области 14 ребра, мм).

ДНК выделяли из проб ткани хряков (ушной выщип) с использованием набора реагентов ДНК-Экстран-2 (НПО «Синтол», Россия). Концентрацию и качество ДНК оценивали с помощью настольного флуориметра Qubit 2.0 («Invitrogen»/«Life Technologies», США) и спектрофотометра NanoDrop 8000 («Thermo Fisher Scientific», США). Полиморфизм гена *IGF2* (G→A в позиции 16144, Accession No. AY242112) определяли методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США). SNP в генах *CCKAR* (A→G в позиции +179, Accession No. DQ496228.1) и *MC4R* (G→A в позиции +1426, Accession No. NM_214173.1) выявляли методом мультиплексной ПЦР с FLASH-детекцией (fluorescent amplification-based specific hybridization) по конечной точке с использованием системы высокопроизводительного генотипирования Fluidigm EP1 («Fluidigm Corporation», США).

Разработка модели для оценки степени влияния генотипов живот-

ных по *IGF2*, *CCKAR*, *MC4R* на изменчивость анализируемых показателей включала рассмотрение ряда уравнений, которые, кроме исследуемых генетических факторов, содержали факторы, отражающие паратипические эффекты, вероятно, влияющие на фенотипические проявления мясных и откормочных качеств свиней. На основе многофакторного дисперсионного анализа (MANOVA) были апробированы уравнения моделей с разным числом фиксированных факторов. Для дальнейших исследований выбрали уравнение, характеризующееся наименьшим значением дисперсии неучтенных факторов (вариансы ошибки), на основе которого с использованием программы STATISTICA 10 («StatSoft, Inc.», США) рассчитали средние значения оценок методом наименьших квадратов (least square means, LSM):

$$y = \mu + B_i + Sex_j + Year_k + G_l + e,$$

где y — учитываемые показатели мясных и откормочных качеств (BF1, BF2, BF3, MD, AGE₁₀₀); μ — средняя популяционная константа; B_i — фактор «порода животного» (ландрас, крупная белая); $Year_k$ — год рождения животного (2009-2017 годы); G_l — эффект генотипа по каждому из маркеров *IGF2*, *CCKAR* и *MC4R*; e — случайная ошибка (нераспределенная дисперсия).

Значения племенной ценности (estimated breeding value, EBV) особей при сопоставлении с маркерными генотипами рассчитывали по аналогичной модели, но с привлечением информации по аддитивной матрице родства согласно методу BLUP Animal Model ($n = 1752$, включая 1262 гол., имеющих генотипы по соответствующим генам). Расчеты EBV и анализ вариационных компонентов проводили с помощью семейства программ BLUPF90 (37).

При изучении комплексного влияния комбинации генотипов по двум маркерам (*IGF2/MC4R*) всех животных разделили на группы по частоте желательных аллелей A . К группе 4A (100 %) были отнесены особи с генотипом AA/AA соответственно по *IGF2* и *MC4R*; 3A (75 %) — с AA/AG, AG/AA; 2A (50 %) — с AA/GG, AG/AG, GG/AA; 1A (25 %) — с AG/GG, GG/AG; 0A (0 %) — GG/GG.

Для оценки статистической значимости влияния учтенных факторов использовали критерий Фишера (F -критерий, отношение дисперсии учтенного фактора к остаточной дисперсии $F = \sigma_f^2/\sigma_e^2$) для соответствующего числа степеней свободы (df). Достоверности разности средних значений признаков по сравниваемым группам генотипов определяли с помощью t -критерия Стьюдента для соответствующего числа степеней свободы и уровней доверительной вероятности $P > 0,95$; $P > 0,99$; $P > 0,999$.

Результаты. Исследуемая выборка свиней характеризовалась относительно высокими средними значениями показателей мясной и откормочной продуктивности (табл. 1). Был установлен умеренный характер наследуемости для изучаемых признаков ($h^2 = 0,204-0,366$), что согласуется с результатами работ других авторов (38).

1. Характеристика мясной и откормочной продуктивности в исследуемой выборке свиней (*Sus scrofa*) пород крупная белая и ландрас (ООО «Селекционно-гибридный центр», Воронежская обл., 2017-2018 годы)

Показатель	M	σ	BF1	BF2	BF3	MD	AGE ₁₀₀
BF1	14,74	3,44	0,242 ^c	0,931	0,926	0,400	0,070
BF2	12,10	2,92	0,878	0,236 ^c	0,969	0,165	0,008
BF3	11,74	2,75	0,807	0,843	0,204 ^c	0,216	-0,136
MD	56,36	6,06	0,327	0,325	0,351	0,309 ^c	-0,070
AGE ₁₀₀	159,6	8,26	0,116	0,127	0,099	0,099	0,366 ^c

Примечание. M — среднее значение показателя, σ — среднеквадратическое отклонение; c — по диагонали расположены коэффициенты наследуемости h^2 (под диагональю — фенотипические корреляции, над диагональю — генетические корреляции).

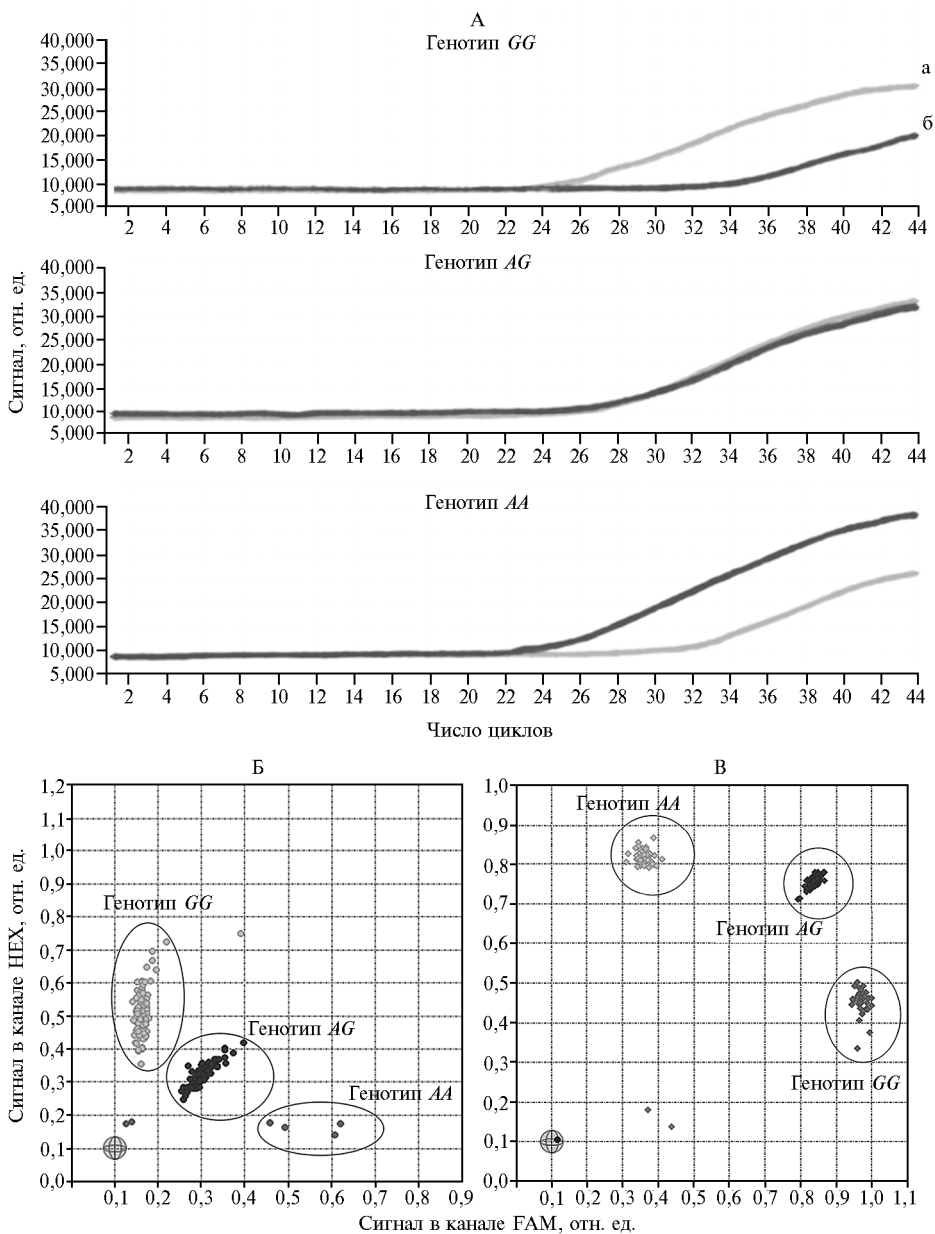


Рис. 1. Результаты генотипирования ДНК маркеров *IGF2*, *CCKAR* и *MC4R* у свиней (*Sus scrofa*) пород крупная белая и ландрас: А — генотипирование ДНК маркера *IGF2* методом аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени (QuantStudio 5, «Thermo Fisher Scientific», США), Б и В — генотипирование соответственно ДНК маркеров *CCKAR* и *MC4R* методом ПЦР по технологии FLASH (fluorescent amplification-based specific hybridization) с детекцией по конечной точке (Fluidigm EP1, «Fluidigm Corporation», США); а — аллель G, б — аллель А (ООО «Селекционно-гибридный центр», Воронежская обл., 2017-2018 годы).

Проведенный анализ выявил наличие высоких положительных взаимосвязей между фенотипическими (r_1 от +0,807 до +0,878) и генетическими (r_2 от +0,926 до +0,969) показателями пар признаков BF1-BF2, BF1-BF3, BF2-BF3, что свидетельствует о равномерности жировых отложений (жировой ткани) у свиней по изученным контрольным точкам на момент достижения ими живой массы 100 кг и считается позитивной характеристикой разводимого поголовья. Вместе с тем значения толщины шпика показали среднюю и низкую (для генетических характеристик осо-

бей) степень взаимосвязи с глубиной мышцы и возрастом достижения живой массы 100 кг, то есть с генетической точки зрения оказались практически независимыми. Исходя из этого, представляется целесообразным проведение генетической оценки поголовья по каждому из названных признаков в отдельности, а также их включение в систему комплексной оценки свиней по мясным и откормочным качествам.

Генотипирование *IGF2*, *CCKAR* и *MC4R* методами высокопроизводительного ПЦР-анализа позволило четко идентифицировать генотипы изучаемых ДНК маркеров (рис. 1).

Все ДНК маркеры у исследованных пород свиней оказались полиморфными (рис. 2). Анализ показал отсутствие существенных различий в частотах встречаемости генотипов и аллелей *MC4R* между породами ландрас и крупная белая (p_A — соответственно 54,1 и 60,0 %). В то же время было выявлено неодинаковое распределение генотипов и аллелей двух других ДНК маркеров: по *IGF2* — p_A 27,2 и 86,3 %, по *CCKAR* — p_A 0,6 и 21,1 % соответственно у ландрасов и крупных белых свиней.

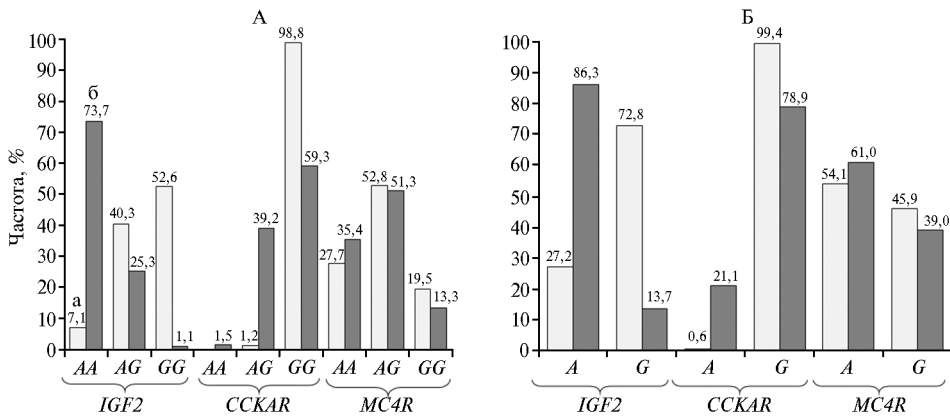


Рис. 2. Распределение частот генотипов (А) и аллелей (Б) ДНК маркеров *IGF2*, *CCKAR* и *MC4R* в группах свиней (*Sus scrofa*) пород крупная белая (а) и ландрас (б) (ООО «Селекционно-гибридный центр», Воронежская обл., 2017-2018 годы).

2. Значения достоверности влияния факторов модели на изменчивость показателей мясных и откормочных качеств свиней (*Sus scrofa*) пород крупная белая и ландрас по результатам многофакторного дисперсионного анализа без взаимодействия факторов (ООО «Селекционно-гибридный центр», Воронежская обл., 2017-2018 годы)

Фактор модели	df	<i>F</i> -критерий				
		BF1	BF2	BF3	MD	AGE ₁₀₀
Порода	2	2,03	3,18*	2,20	0,02	6,01*
Пол	1	12,10*	14,37*	16,87*	0,41	14,50*
Год рождения	8	21,16*	26,85*	17,54*	40,35*	19,35*
Генотип <i>IGF2</i>	2	12,06*	11,67*	13,83*	0,64	2,16
Генотип <i>CCKAR</i>	2	0,02	0,24	0,15	0,28	0,06
Генотип <i>MC4R</i>	2	21,27*	18,59*	15,66*	2,07	2,81

Примечание. df — число степеней свободы; *F*-критерий — статистический критерий распределения Фишера; BF1 — толщина шпика в области 6-7-го ребра, мм; BF2 — толщина шпика в области 10-го ребра, мм; BF3 — толщина шпика в области 14-го ребра, мм; MD — глубина мышцы, мм; AGE₁₀₀ — скорректированный возраст достижения живой массы 100 кг, сут.

* Влияние фактора на изменчивость показателя статистически значимо при $P > 0,95$.

Анализ варiancesных компонент (MANOVA) показал, что для исследуемой группы животных значимое влияние на изменчивость показателей продуктивности оказывали факторы порода (для показателей BF2 и AGE₁₀₀, $P > 0,95$), пол и год рождения (для всех признаков $P > 0,95$, за исключением MD), а также генотипы по маркерам *IGF2* и *MC4R* (для показателей

BF, $P > 0,95$) (табл. 2). Генотип особей по маркеру *ССКАR* не имел достоверного влияния на проявление исследуемых продуктивных показателей.

Наименьшей толщиной шпика характеризовались особи, несущие в генотипе аллели *A* по *IGF2* и *MC4R*. Так, показатели толщины шпика у особей *AA* по *IGF2* в среднем были ниже на 1,0-1,5 мм (12-14 %), чем у животных с генотипом *GG*. Аналогичные результаты получены при сравнении гомозиготных генотипов по *MC4R*.

3. Сопряженность оценок племенной ценности (EBV) по показателям мясной и откормочной продуктивности у свиней (*Sus scrofa*) пород крупная белая и ландрас в зависимости от генотипа по генам *IGF2*, *ССКАR* и *MC4R* (ОО «Селекционно-гибридный центр», Воронежская обл., 2017-2018 годы)

Маркер	Сравниваемая пара генотипов	Оценка EBV				
		BF1	BF2	BF3	MD	AGE ₁₀₀
<i>IGF2</i>	<i>AA</i>	-0,086	-0,005	-0,024	-0,519	+0,043
	<i>AG</i>	+0,122	+0,137	+0,122	-0,303	-0,114
	<i>GG</i>	+0,491	+0,450	+0,399	-0,186	-0,042
	<i>F</i> -критерий	33,0***	31,3***	33,6***	3,2*	0,3
	R^2 , %	4,99	4,75	5,07	0,51	0,05
<i>ССКАR</i>	<i>AA</i>	-0,245	-0,010	-0,038	-2,276	+0,553
	<i>AG</i>	-0,029	+0,059	+0,035	-0,732	+0,155
	<i>GG</i>	+0,172	+0,183	+0,157	-0,247	-0,090
	<i>F</i> -критерий	4,6**	2,5	3,0*	11,4***	0,9
	R^2 , %	0,73	0,40	0,48	1,78	0,14
<i>MC4R</i>	<i>AA</i>	-0,244	-0,123	-0,132	-0,616	+0,327
	<i>AG</i>	+0,191	+0,207	+0,178	-0,345	-0,120
	<i>GG</i>	+0,599	+0,527	+0,480	+0,073	-0,481
	<i>F</i> -критерий	49,0***	46,4***	51,6***	8,5***	5,6**
	R^2 , %	7,24	6,88	7,59	1,33	0,88

Примечание. BF1 — толщина шпика в области 6-7-го ребра, мм; BF2 — толщина шпика в области 10-го ребра, мм; BF3 — толщина шпика в области 14-го ребра, мм; MD — глубина мышцы, мм; AGE₁₀₀ — скорректированный возраст достижения живой массы 100 кг, сут.

*, **, *** Влияние фактора на изменчивость показателя статистически значимо соответственно при $P > 0,95$; $P > 0,99$ и $P > 0,999$.

Для использования ДНК маркеров в селекции особый интерес представляет изучение характера их влияния на показатели племенной ценности (EBV) особей (табл. 3). Определение критерия значимости (*F*-критерий) для фактора «генотип по ДНК маркеру» позволило выявить достоверное влияние каждого из исследуемых генетических факторов на изменение EBV по всем пяти признакам для *MC4R*, по четырем из пяти признаков — для *IGF2* (кроме AGE₁₀₀) и по трем признакам — для *ССКАR* (кроме BF2 и AGE₁₀₀). Полученные результаты подтверждают достоверное превосходство ($P > 0,95-0,999$) в племенной ценности особей, обладающих генотипом *AA* по *IGF2*, над животными с генотипами *AG* и *GG* по толщине шпика. При этом свиньи с генотипом *AA* выделяли пониженными значениями EBV по MD и AGE₁₀₀. Схожие тенденции выявлены для маркеров *ССКАR* и *MC4R*, для которых были определены желательные генотипы *AA* для значений генетической ценности по BF1, BF2 и BF3 и генотипы *GG* для признаков MD и AGE₁₀₀. Наивысшее значение линейности взаимосвязи между анализируемыми показателями отмечали для пар признаков «генотип по маркеру *MC4R*—толщина шпика в трех точках» ($R^2 = 6,88-7,59$ %) (см. табл. 3).

Выявленные закономерности подтверждаются и при сопоставлении результатов, полученных для обеих пород свиней (табл. 4). При этом для поголовья крупной белой породы установлены статистически значимые различия между гомозиготными генотипами по *MC4R* по показателю AGE₁₀₀ ($P > 0,95-0,999$), что косвенно свидетельствует о взаимосвязи между этим показателем и характеристиками мясной продуктивности (толщины шпика в трех точках измерения BF1, BF2 и BF3).

4. Взвешенные значения оценок по продуктивным признакам для генотипов по IGF2, CCKAR и MC4R в группах свиней (Sus scrofa) разных пород, полученные методом наименьших квадратов (LSM) (ООО «Селекционно-гибридный центр», Воронежская обл., 2017-2018 годы)

ДНК маркер	Генотип (число голов)	Оценка LSM для продуктивных признаков				
		BF1	BF2	BF3	MD	AGE ₁₀₀
Л а н д р а с						
IGF2	AA (n = 42)	13,69±0,60 ^a	10,63±0,48 ^a	9,66±0,46 ^a	55,18±0,99	160,12±1,40
	AG (n = 240)	14,46±0,38	11,67±0,30	10,62±0,29	53,74±0,62	159,84±0,88
	GG (n = 313)	15,22±0,39	12,34±0,31	11,20±0,30	53,12±0,65	161,19±0,91
CCKAR	AA (n = 0)					
	AG (n = 7)	14,38±1,32	11,60±1,06	10,29±1,01	54,37±2,17	160,15±3,07
	GG (n = 588)	14,68±0,36	11,83±0,28	10,76±0,27	53,63±0,58	160,39±0,83
MC4R	AA (n = 165)	13,88±0,41 ^b	11,11±0,32 ^b	10,26±0,31 ^b	53,39±0,68	160,44±0,97
	AG (n = 314)	14,82±0,37	11,97±0,29	10,80±0,28	53,62±0,62	160,36±0,87
	GG (n = 116)	15,84±0,45	12,82±0,36	11,63±0,35	54,19±0,76	160,42±1,07
К р у п н а я б е л а я						
IGF2	AA (n = 481)	13,68±0,38 ^a	11,25±0,33 ^a	10,69±0,32 ^a	52,52±0,65	153,71±0,94
	AG (n = 165)	14,45±0,44	11,68±0,38	11,22±0,36	52,47±0,75	154,54±1,08
	GG (n = 7)	16,64±1,22	13,47±1,07	13,39±1,02	57,20±2,11	158,63±3,03
CCKAR	AA (n = 10)	13,83±1,05	11,54±0,91	10,87±0,88	51,35±1,80	154,58±2,58
	AG (n = 256)	13,85±0,41	11,27±0,36	10,77±0,35	52,45±0,71	153,82±1,02
	GG (n = 387)	13,86±0,39	11,39±0,34	10,85±0,32	52,62±0,67	153,96±0,96
MC4R	AA (n = 231)	13,12±0,42 ^b	10,88±0,37 ^b	10,37±0,35 ^b	51,94±0,73	155,24±1,04 ^b
	AG (n = 335)	13,81±0,39	11,30±0,34	10,78±0,33	52,65±0,68	153,96±0,98
	GG (n = 87)	14,73±0,46	11,97±0,40	11,39±0,39	52,99±0,80	152,43±1,14

Примечание. BF1 — толщина шпика в области 6-7-го ребра, мм; BF2 — толщина шпика в области 10-го ребра, мм; BF3 — толщина шпика в области 14-го ребра, мм; MD — глубина мышцы, мм; AGE₁₀₀ — скорректированный возраст достижения живой массы 100 кг, сут.

^a Различия статистически значимы при сравнении с группой по генотипу GG (IGF2) при P > 0,95-0,999.
^b Различия статистически значимы при сравнении с группой по генотипу GG (MC4R) при P > 0,95-0,999.

5. Взвешенные значения оценок по продуктивным признакам для сочетаний генотипов по ДНК маркерам IGF2/MC4R в группах свиней (Sus scrofa) пород крупная белая и ландрас, полученные методом наименьших квадратов (LSM) (ООО «Селекционно-гибридный центр», Воронежская обл., 2017-2018 годы)

Группа	n, гол.	Оценки LSM для продуктивных признаков				
		BF1	BF2	BF3	MD	AGE ₁₀₀
4A	195	12,96±0,41 ^{abc}	10,35±0,34 ^{abc}	9,61±0,33 ^{abc}	52,71±0,71	160,81±1,02
3A	400	13,65±0,35 ^{ab}	10,85±0,30 ^{ab}	10,17±0,28 ^{ab}	53,54±0,61	159,93±0,87
2A	339	14,19±0,38 ^{abcd}	11,25±0,32 ^{abe}	10,60±0,31 ^{abe}	53,01±0,66	159,69±0,94
1A	258	15,14±0,40 ^{acde}	12,05±0,34 ^{acde}	11,18±0,32 ^{acde}	52,96±0,70	160,21±0,99
0A	64	16,43±0,53 ^{bcde}	13,17±0,45 ^{bcde}	12,41±0,43 ^{bcde}	54,47±0,92	160,52±1,32

Примечание. BF1 — толщина шпика в области 6-7-го ребра, мм; BF2 — толщина шпика в области 10-го ребра, мм; BF3 — толщина шпика в области 14-го ребра, мм; MD — глубина мышцы, мм; AGE₁₀₀ — скорректированный возраст достижения живой массы 100 кг, сут.

^a Различия статистически значимы при сравнении с группой 0A при P > 0,95-0,999.
^b Различия статистически значимы при сравнении с группой 1A при P > 0,95-0,999.
^c Различия статистически значимы при сравнении с группой 2A при P > 0,95-0,999.
^d Различия статистически значимы при сравнении с группой 3A при P > 0,95-0,999.
^e Различия статистически значимы при сравнении с группой 4A при P > 0,95-0,999.

ДНК маркеры IGF2 и MC4R могут не только оказывать существенное и схожее влияние на мясные и откормочные характеристики животных, но и быть связанными между собой, проявляя компенсирующее взаимодействие (эффект аддитивного действия генов). Для проверки этой гипотезы мы проанализировали оценки показателей мясных и откормочных качеств животных в зависимости от комбинации генотипов по двум маркерам (IGF2/MC4R). Полученные результаты (табл. 5) подтвердили истинность предложенной гипотезы по отношению к показателям откормочной продуктивности свиней (толщина шпика в трех точках измерения). При этом лучшими характеристиками выделялись особи, имеющие наибольшую частоту встречаемости желательных аллелей A по IGF2 и MC4R. Выявленные закономерности подтверждают наличие коррелятивных взаимосвязей

генотипов *IGF2* и *MC4R* с характеристиками по мясным и откормочным качествам, что может быть использовано в практической селекции.

Таким образом, установлено достоверное влияние определенных генотипов по *IGF2*, *SSKAR*, *MC4R* на изменчивость показателей мясной и откормочной продуктивности у свиней пород ландрас и крупная белая. Наличие желательного генотипа по этим генам может быть использовано как фактор в маркерной селекции свиней по показателям толщины шпика (в трех точках измерения) и глубины мышцы для *IGF2* ($P > 0,95-0,999$), а также по показателям толщины шпика (в трех точках измерения), глубины мышцы и возраста достижения живой массы 100 кг для *MC4R* ($P > 0,99-0,999$). Для генотипа по гену *SSKAR* установлена сопряженность с генетической оценкой по признакам BF1 ($P > 0,99$) и MD ($P > 0,999$). Наряду с этим выявлена аддитивная взаимосвязь генотипов по маркерам *IGF2* и *MC4R* с анализируемыми откормочными характеристиками свиней и доказано достоверное превосходство особей с наибольшей частотой встречаемости желательного аллеля над животными, гомозиготными по альтернативному генотипу.

Итак, наличие определенного генотипа по анализируемым маркерам может условно характеризовать генетический потенциал особи в отношении мясных и откормочных качеств. При оценке и отборе животных в основные селекционные группы целесообразно учитывать наличие у особи как индивидуальных желательных аллелей по маркерам *IGF2* и *MC4R*, так и сочетания генотипов по генам, проявляющим достоверное коррелированное влияние на изменчивость экономически значимых продуктивных признаков. При разработке ДНК-биочипов необходимо учитывать в дизайн-панели изученные нуклеотидные мутации, ассоциированные с количественными признаками продуктивности свиней, как имеющие достоверную значимость для племенной ценности животных. Это повысит эффективность отбора при геномной селекции в свиноводстве.

¹ФГБНУ Федеральный научный центр
животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: melnikovaee@vij.ru, bardukv-nikolajj@mail.ru,
margaretfornara@gmail.ru, kostolan@yandex.ru, alex_sermyagin85@mail.ru,
n_zinovieva@mail.ru ☒;

²ФГБНУ Всероссийский НИИ коневодства,
391105 Россия, Рязанская обл., Рыбновский р-н, пос. Дивово,
e-mail: amzaitceff@mail.ru

Поступила в редакцию
21 марта 2018 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 4, pp. 723-734

EFFECTS OF GENOTYPES FOR *IGF2*, *SSKAR* AND *MC4R* ON THE PHENOTYPIC ESTIMATIONS AND BREEDING VALUES FOR PRODUCTIVE TRAITS IN PIGS

*E.E. Melnikova¹, N.V. Bardukov¹, M.S. Fornara¹, O.V. Kostyunina¹, A.A. Sermyagin¹,
A.M. Zaitsev², N.A. Zinovieva¹*

¹*Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry*, Federal Agency of Scientific Organizations, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail melnikovaee@vij.ru, bardukv-nikolajj@mail.ru, margaretfornara@gmail.ru, kostolan@yandex.ru, alex_sermyagin85@mail.ru, n_zinovieva@mail.ru (☒ corresponding author);

²*All-Russian Research Institute for Horse Breeding*, Federal Agency of Scientific Organizations, pos. Divovo, Rybnovskii Region, Rязан Province, 391105 Russia, e-mail amzaitceff@mail.ru

ORCID:

Melnikova E.E. orcid.org/0000-0002-7498-1871

Fornara M.S. orcid.org/0000-0002-8844-177X

Sermyagin A.A. orcid.org/0000-0002-1799-6014

Zinovieva N.A. orcid.org/0000-0003-4017-6863

The authors declare no conflict of interests

Bardukov N.V. orcid.org/0000-0002-5497-2409

Kostyunina O.V. orcid.org/0000-0001-8206-3221

Zaitsev A.M. orcid.org/0000-0003-4260-602X

Acknowledgements:

The equipment of the Sharing Center for Farm Animal Bioresources and Bioengineering (FSC for Animal Husbandry) was used.

Supported financially by Ministry of Education and Science of the Russian Federation (the project unique identifier RFMEF160417X0182)

Received March 21, 2018

doi: 10.15389/agrobiol.2018.4.723eng

Abstract

Development of programs for marker-assisted selection has to be based on genetic polymorphisms, whose effect on the production traits and breeding values of animals is reliable and significant. Prospects for the use of genomic selection in pigs are associated with the development of low-density (LD) DNA arrays, which include the SNPs (single nucleotide polymorphisms) selected by the results of genome-wide association studies (GWAS) with HD-panels. Genes of insulin-like growth factor 2 (*IGF2*), cholecystokinin receptor A (*CCKAR*) and melanocortin 4 receptor (*MC4R*) are of interest for inclusion in LD-panels. Numerous studies have shown a significant effect of these genes on feed conversion rate, growth rate, meat content, and fat deposition. The aim of this work was to evaluate the effect of complex genotypes for *IGF2*, *CCKAR* and *MC4R* on growth and carcass traits of the Landrace and Large White pigs raced in Russia. In total, 1262 animals, including Large White ($n = 667$) and Landrace pigs ($n = 595$) were studied. Pig phenotypes were determined for muscle depth (MD, mm), adjusted age at 100 kg (AGE100, day) and back fat thickness (BF, back fat) at three points: BF1 (at ribs 6-7, mm), BF2 (at rib 10, mm), BF3 (at 14 rib, mm). DNA was extracted from tissue samples (ear pluck) using a DNA-Extran-2 Kit (Sintol, Russia). Polymorphism of *IGF2* was determined by real-time PCR. Causative SNPs in *CCKAR* and *MC4R* genes were defined by multiplex PCR with FLASH detection. The allele frequencies of DNA-markers were $p_A = 27.2\%$ and $p_A = 86.3\%$ for *IGF2*, $p_A = 0.6\%$ and $p_A = 21.1\%$ for *CCKAR*, $p_A = 54.1\%$ and 60.0% for *MC4R* in Landrace and Large White pigs, respectively. The heritability coefficients (h^2) were 0.204-0.242 for BF1, BF2, and BF3, 0.309 for MD, and 0.366 for AGE100. We developed an equation model for the pig's breeding traits and found the significant effects of fixed factors in the model (breed, sex, year of birth), including specific genotypes for the analyzed genes on the phenotypic variations (for *IGF2* and *MC4R* on BF1, BF2 and BF3, $P > 0.95$), and estimated breeding values (EBV) for growth and carcass traits (for each of the three markers the ratio of additive genetic variation ranged from 0.5 to 7.6 %, $P > 0.95-0.999$). We identified the economically desired alleles for *IGF2* (allele *A*) and *MC4R* (allele *A*) genes. Animals which carried the homozygous genotypes for the desired alleles (*AA* for both of *IGF2* and *MC4R* genes) were characterized by the significantly better scores for analyzed traits, estimated by least squares method, comparing to the individuals which were homozygous for the alternative allele *G*. The additive compensating effect of genotypes' combinations for *IGF2* and *MC4R* on the pig growth traits was established. The animals with the highest number of the *A* alleles for *IGF2* and *MC4R* had preferable characteristics for the back fat thickness comparing to animals with *GG* genotypes (for both DNA markers). The differences between groups of animals carrying in their genotypes from four to single copy of the *A* alleles comparing to animals which do not have *A* alleles (*GG* genotypes for both markers) varied from 7.9 to 21.0 % for BF1, from 8.5 to 21.4 % for BF2, from 9.9 to 22.6 % for BF3, and from 2.8 to 3.2 % for MD. In this regard, the *IGF2* and *MC4R* genotypes can be used in breeding programs of Large White and Landrace pigs raced in Russia to select the pigs with desired growth and carcass characteristics.

Keywords: pigs, Large White breed, Landrace, *IGF2*, *CCKAR*, *MC4R* genes, polymorphisms, estimated breeding value (EBV), growth and carcass traits.

REFERENCES

1. Sermyagin A.A., Naryshkina E.N., Karpushkina T.V., Strekozov N.I., Zinov'eva N.A. *Molochnoe i myasnnoe skotovodstvo*, 2015, 7: 2-5 (in Russ.).
2. Sermyagin A.A., Gladyr' E.A., Kharitonov S.N., Ermilov A.N., Strekozov N.I., Brem G., Zinov'eva N.A. Genome-wide association study for milk production and reproduction traits in Russian Holstein cattle population. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya]*, 2016, 51(2): 182-193 (doi: 10.15389/agrobiol.2016.2.182eng).
3. Zinov'eva N.A., Sermyagin A.A., Kostyunina O.V. *Zhivotnovodstvo Rossii*, 2018, 7: 53-55 (in Russ.).
4. Ramos A.M., Crooijmas R.P., Affara N.A., Amaral A.J., Archibald A.L., Beever J.E., Benedixen C., Churcher C., Clark R., Dehais P., Hansen M. S., Hedegaard J., Hu Z.L., Kerstens H.H., Law A.S., Megens H.-J., Milan D., Nonneman D.J., Rohrer G.A., Rothschild M.F., Smith T.P.L., Schnabel R.D., Van Tassell C.P., Taylor J.F., Wiedmann R.T., Schook L.B., Groenen M.A.M. Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *PLoS ONE*, 2009, 4(8): 6524 (doi: 10.1371/journal.pone.0006524).

5. Meuwissen T.H.E., Hayes B.J., Goddard M.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 2001, 157(4): 1819-1829.
6. VanRaden P.M., Null D.J., Sargolzaei M., Wiggans G.R., Tooker M.E., Cole J.B., Sonstegard T.S., Faust M.A., Doak G.A. Genomic imputation and evaluation using high-density Holstein genotypes. *J. Dairy Sci.*, 2013, 96(1): 668-678 (doi: 10.3168/jds.2012-5702).
7. Habier D., Fernando R.L., Dekkers J.C.M. Genomic selection using low-density marker panels. *Genetics*, 2009, 182(1): 343-353 (doi: 10.1534/genetics.108.100289).
8. Huang Y., Hickey J.M., Cleveland M.A., Maltecca C. Assessment of alternative genotyping strategies to maximize imputation accuracy at minimal cost. *Genet. Sel. Evol.*, 2012, 44(1): 25 (doi: 10.1186/1297-9686-44-25).
9. Cleveland M.A., Hickey J.M. Practical implementation of cost-effective genomic selection in commercial pig breeding using imputation. *J. Anim. Sci.*, 2013, 91(8): 3583-3592 (doi: 10.2527/jas.2013-6270).
10. Abell C.E., Dekkers J.C.M., Rothschild M.F., Mabry J.W., Stalder K.J. Total cost estimation for implementing genome-enabled selection in a multi-level swine production system. *Genet. Sel. Evol.*, 2014, 46(1): 32 (doi: 10.1186/1297-9686-46-32).
11. *Pig QTLdb*. Available <https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>. Accessed May 10, 2018.
12. Van Laere A.-S. From QTL to QTN. *Identification of a quantitative trait nucleotide influencing muscle development and fat deposition in pig. Doctoral thesis*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2005.
13. Van Laere A.S., Nguyen M., Braunschweig M., Nezer C., Collette C., Moreau L., Archibald A.L., Haley C.S., Buys N., Tally M., Andersson G., Georges M., Andersson L. A regulatory mutation in *IGF2* causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, 2003, 425 (6960): 832-836 (doi: 10.1038/nature02064).
14. Chang K.C. Key signalling factors and pathways in the molecular determination of skeletal muscle phenotype. *Animal*, 2007, 1(5): 681-698 (doi: 10.1017/S1751731107702070).
15. Estellé J., Mercadé A., Noguera J.L., Pérez-Enciso M., Óvilo C., Sánchez A., Folch J.M. Effect of the porcine *IGF2*-intron3-G3072A substitution in an outbred Large White population and in an Iberian×Landrace cross. *J. Anim. Sci.*, 2005, 83(12): 2723-2728. (doi: 10.2527/2005.83122723x).
16. Heuven H.C.M., Bovenhuis H., Janss L.L.G., Van Arendonk J.A.M. Efficiency of population structures for mapping of Mendelian and imprinted quantitative trait loci (QTL) in outbred pigs using variance component methods. *Genet. Sel. Evol.*, 2005, 37: 35-655 (doi: 10.1051/gse:2005019).
17. Oczkiewicz M., Tyra M., Walinowicz K., Różycki M., Rejduch B. Known mutation (A3072G) in intron3 of the *IGF2* gene is associated with growth and carcass composition in Polish pig breeds. *J. Appl. Genet.*, 2009, 50(3): 257-259 (doi: 10.1007/BF03195681).
18. Kostyunina O.V., Svezhentseva N.A., Zinov'eva N.A., Dotsev A.V., Shakhina A.V., Sizareva E.I., Gladyr' E.A. Effect of ESR and *IGF2* marker genotypes on the breeding values of the large white boars. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 6: 54-59.
19. Kostyunina O.V., Kramarenko S.S., Svezhentseva N.A., Sizareva E.I., Zinov'eva N.A. The association of *IGF2* with productive traits of pigs of large white breed in the aspect of sexual differentiation. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2015, 50(6): 736-745 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.736eng).
20. Crawley J.N., Fiske S.M., Durieux C., Derrien M., Roques B.P. Centrally administered cholecystokinin suppresses feeding through a peripheral-type receptor mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1991, 257: 1076-1080.
21. Asin K.E., Bednarz L. Differential effects of CCK-JMV-180 on food intake in rats and mice. *Pharmacol. Biochem. Be.*, 1992, 42(2): 291-295.
22. Clutter A.C., Sasaki S., Pomp D. Rapid communication: the cholecystokinin type-A receptor (CCKAR) gene maps to porcine chromosome 8. *J. Anim. Sci.*, 1998, 76(7): 1983-1984.
23. Houston R.D., Haley C.S., Archibald A.L., Cameron N.D., Plastow G.S., Rance K.A. A polymorphism in the 5' untranslated region of the porcine Cholecystokinin Type-A Receptor (CCKAR) gene affects feed intake and growth. *Genetics*, 2006, 174(3): 1555-1563 (doi: 10.1534/genetics.106.059659).
24. Johnson R. Effect of DNA markers in Nebraska selection lines. *Nebraska Swine Reports*, 2010: 44-50. Available https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1260&context=coopext_swine. Accessed May 10, 2018.
25. Mountjoy K.G., Mortrud M.T., Low M.J., Simerly R.B., Cone R.D. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.*, 1994, 8(10): 1298-1308.
26. 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(3): 791-792.
27. Kim K.S., Larsen N., Short T., Plastow G., Rothschild M.F. A missense variant of the melanocortin 4 receptor (MC4R) gene is associated with fitness, growth and feed intake traits. *Mamm.*

- Genome*, 2000, 11(2): 131-135.
28. Hernández-Sánchez J., Visscher P., Plastow G., Haley C. Candidate gene analysis for quantitative traits using the transmission disequilibrium test: the example of the melanocortin 4-receptor in pigs. *Genetics*, 2003, 164(2): 637-644.
 29. Stachowiak M., Szydlowski M., Obarzanek-Fojt M., Switonski M. An effect of a missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene on production traits in Polish pig breeds is doubtful. *Anim. Genet.*, 2005, 37(1): 55-57 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2005.01373.x).
 30. Houston R.D., Cameron N.D., Rance K.A. A melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations. *Anim. Genet.*, 2004, 35(5): 386-390 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2004.01182.x).
 31. Chen J.F., Xiong Y.Z., Zuo B., Zheng R., Li F.E., Lei M.G., Li J.L., Deng C.Y., Jiang S.W. New evidences of effect of melanocortin-4 receptor and insulin-like growth factor 2 genes on fat deposition and carcass traits in different pig populations. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 2005, 18(11): 1542-1547 (doi: 10.5713/ajas.2005.1542).
 32. Óvilo C., Fernández A., Rodríguez M.C., Nieto M, Silió A. Association of *MC4R* gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs. *Meat Science*, 2006, 73(1): 42-47 (doi: 10.1016/j.meatsci.2005.10.016).
 33. Van den Maagdenberg K., Stinckens A., Claeys E., Seynaeve M., Clinquart A., Georges M., Buys N., De Smet S. The Asp298Asn missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene can be used to affect growth and carcass traits without an effect on meat quality. *Animal*, 2007, 1(8): 1089-1098 (doi: 10.1017/S1751731107000456).
 34. Park H.B., Carlborg O., Marklund L., Andersson L. *Melanocortin-4 receptor (MC4R)* genotypes have no major effect on fatness in a Large White × Wild Boar intercross. *Anim. Genet.*, 2002, 33(2): 155-157 (doi: 10.1046/j.1365-2052.2002.00824.x).
 35. Bruun C.S., Juurgensen 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(4): 359-362 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2006.01488.x).
 36. Jokubka R., Maak S., Kerziene S., Swalve H.H. Association of a melanocortin 4 receptor (MC4R) polymorphism with performance traits in Lithuanian White pigs. *J. Anim. Breed. Genet.*, 2006, 123(1): 12-22 (doi: 10.1111/j.1439-0388.2006.00559.x).
 37. Salajpal K., Đikić M., Karolyi D., Šurina J., Matković M., Liker B. Effect of MC4R polymorphism on physiological stress response in pigs. *Poljoprivreda*, 2007, 13(1): 46-50. Available <https://hrcak.srce.hr/16049>. Accessed May 10, 2018.
 38. Misztal I., Tsuruta S., Strabel T., Auvray B., Druet T., Lee D.H. BLUPF90 and related programs (BGF90). *Proc. 7th World Congress on genetics applied to livestock production*. Montpellier, France, 2002, 28(28-07): 21-22.
 39. Dube B., Mulugeta S.D., Dzama K. Genetic relationship between growth and carcass traits in Large White pigs. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 2013, 43(4): 482-492.