

9. Metlyts'ka, O. I., V. P. Polishchuk, and I. I. Holovets'kyu. 2012. Henetychni kryteriyi chystoporodnosti bdzhil ukrayins'koyi porody – Genetic criteria chystoporodnosti Ukrainian bee species. *Ukrayins'kyu pasichnyk – Ukrainian beekeeper*. 5:37–40 (in Ukrainian).

10. Metlyts'ka, O. I., S. I. Kovtun, and M. D. Pal'kina. 2015. DNK-pasportyzatsiya porid bdzhil Ukrayiny v systemi zberezhennya i vdoskonalennya yikh henofondu – DNA certification breeds bees Ukraine in the preservation and improvement of the gene pool. *Visnyk ahrarnoyi nauky – Bulletin of Agrarian Science*. 7:39–43 (in Ukrainian).

УДК 636.4:636.082:575.827

АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА MUC4, АСОЦІЙОВАНОГО ЗІ СТІЙКІСТЮ СВИНЕЙ ВІТЧИЗНЯНОЇ ТА ЗАРУБІЖНОЇ СЕЛЕКЦІЇ ДО КОЛІБАКТЕРІОЗУ

Г. С. РУДОМАН, В. М. БАЛАЦЬКИЙ, В. Ю. НОР

Інститут свиначства і агропромислового виробництва НААН (Полтава, Україна)
maestropoltava@rambler.ru

Проведено дослідження поліморфізму гена муцин-4 (MUC4), що асоційований із резистентністю свиней до ентеропатогенних штамів бактерії Escherichia coli. Молекулярно-генетичний аналіз проведений на вибірці тварин шести порід та внутріпорідних типів свиней різного напрямку продуктивності – велика біла англійської селекції, українська велика біла тип 1 і тип 3, миргородська, полтавська м'ясна, червона білопояса, ландрас. Встановлені основні генетико-популяційні параметри свиней досліджуваних порід за геном MUC4 для кожної мікропопуляції.

Розподіл частот алелів показав переважання потенційно корисного алеля G серед свиней досліджуваних порід. На основі розрахованого індексу PIC можна стверджувати, що локус MUC4 є перспективним щодо використання у маркер-асоційованій селекції з метою удосконалення генетичної резистентності тварин до колібактеріозу.

Ключові слова: свині, колібактеріоз, популяція, поліморфізм, ДНК-маркер, ген муцин 4

ANALYSIS OF POLYMORPHISM IN MUCIN 4 GENE ASSOCIATED WITH ANIMAL RESISTANCE TO COLIBACTERIOSIS IN PIGS OF DOMESTIC AND FOREIGN SELECTIONS

H. Rudoman, V. Balatskyi, V. Nor

Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production of NAAS (Poltava, Ukraine)

Researches of polymorphism in mucin 4 gene (MUC4) were made. Polymorphism is associated with resistance of pigs to enteropathogenic strains of bacteria Escherichia coli. Molecular-genetic analysis was made on samples of animals of six breeds of pigs of different productive directions – Large White of English selection, Large White of Ukrainian selection Type 1 and Type 3, Red White-Belt, Mirgorod, Poltava Meat and Landrace.

Basic genetic-population parameters in MUC4 gene in the chosen breeds were determined. Distribution of allele frequencies showed domination of potential useful allele G among the studied populations of pigs. Based on the calculated PIC index we can confirm locus MUC4 to be used perspectivevely in marker associated selection to improve the genetic resistance of animals to colibacteriosis.

Keywords: pigs, colibacteriosis, population, polymorphism, DNA-marker, mucin 4 gene

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА MUC4, АССОЦИИРОВАННОГО С УСТОЙЧИВОСТЬЮ СВИНЕЙ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ И ЗАРУБЕЖНОЙ СЕЛЕКЦИИ К КОЛИБАКТЕРИОЗУ

Г. С. Рудоман, В. Н. Балацкий, В. Ю. Нор

Институт свиноводства и агропромышленного производства НААН (Полтава, Украина)

*Проведено исследование полиморфизма гена Муцин 4 (MUC4), ассоциированного с резистентностью свиней к энтеропатогенным штаммам бактерии *Escherichia coli*. Молекулярно-генетический анализ проведен на выборке животных шести пород и внутривидовых типов свиней разного направления продуктивности – крупная белая английской селекции, украинская крупная белая тип 1 и тип 3, миргородская, полтавская мясная, красная белопоясная, ландрас. Установлены основные генетико-популяционные параметры свиней исследуемых пород по гена MUC4 для каждой микропопуляции.*

Распределение частот аллелей показало преобладание полезного аллеля G у изучаемых пород свиней. На основе рассчитанного индекса PIC можно утверждать, что локус MUC4 является перспективным для использования в маркер ассоциированной селекции с целью усовершенствования генетической резистентности животных к колибактериозу.

Ключевые слова: свиньи, колибактериоз, популяция, полиморфизм, ДНК-маркер, ген муцин 4

Вступ. Наразі однією із найбільш розповсюджених і критичних проблем у свинарстві є кишкові захворювання молодняку, а саме колибактеріоз. Дане інфекційне захворювання має гострий перебіг і викликається ентеропатогенними штаммами бактерії *Escherichia coli*. Патогенні властивості цих бактерій зумовлені наявністю білкових антигенів (у формі ворсинок) на поверхні клітини, що є факторами прикріплення до специфічних рецепторів ентероцитів тонкого відділу кишечника. Після прикріплення ешерихії швидко розмножуються і виділяють токсини, які відразу поглинаються слизовою оболонкою кишечника. Внаслідок дії токсинів виникають діарея, набрякові явища у тканинах і органах та інші ознаки захворювання. Падіж поросят від колибактеріозу в перші тижні життя становить 30–70% [1, 2].

Одним із сучасних і перспективних підходів щодо профілактики колибактеріозу є застосування маркерної селекції, яка передбачає генотипування свиней за локусами геному, що асоційовані із чутливістю тварин до цього захворювання, і відбору за результатами генотипування тварин з підвищеною резистентністю. За даними ряду досліджень одним з таких локусів є ген муцин 4 (*MUC4*).

Ген *MUC4* знаходиться у 13 хромосомі (SSC13q41) свиней. Муцини (*MUC*) є високомолекулярними глікопротеїнами, які синтезуються келихоподібними ентероцитами, і відіграють важливу роль в захисті кишкового епітелію від патогенних мікроорганізмів, в тому числі адгезивних штамів *Escherichia coli*.

В результаті точкової заміни, g.1849 G>C в інtronі 7 змінюється структура кодованого геном білка муцину, що зумовлює зміну чутливості слизової оболонки кишечника до патогенної кишкової палички. Алель G та, відповідно, генотип GG визначають стійкість тварин до колибактеріозу, тоді як носії генотипів CC і GC є чутливими до цього захворювання [3, 4].

Виявлено іще один однонуклеотидний поліморфізм гена *MUC4* свиней: заміна g.243A<G у 17 інtronі. Зарубіжні дослідники рекомендували його в якості маркеру стійкості до неонатального колибактеріозу поросят. Було встановлено, що тварини з генотипами *MUC4^{AA}* і *MUC4^{AG}* є чутливими до колибактеріозу, а тварини з генотипом *MUC4^{GG}* – резистентні [5].

В Україні дослідження поліморфізму *MUC4* g.1849 G>C проводилися фрагментарно і лише на окремих популяціях української м'ясної та великої білої порід [6, 7]. У той самий час генетична структура інших порід свиней України, як вітчизняної, так і зарубіжної селекції, та їхній генетичний потенціал щодо стійкості до колібактеріозу досліджені недостатньо. Виходячи з вищенаведених фактів, представляється доцільним провести дослідження поліморфізму гена *MUC4* у популяціях свиней різного походження і напрямку продуктивності для оцінки їх потенційної генетичної резистентності до колібактеріозу і можливості проведення маркерної селекції на стійкість до цього захворювання.

Метою роботи було встановити генетичну структуру порід свиней вітчизняної та зарубіжної селекції за геном *MUC4* та визначити можливість проведення маркер-асоційованої селекції на підвищення генетичної резистентності до колібактеріозу.

Матеріали і методи досліджень. Для досліджень були використані зразки біоматеріалу (кров, шетина) від тварин порід велика біла англійської селекції (ВБА) (ПЗ «Степной» Запорізької обл.), українська велика біла, внутріпородний тип 1 (УВБ-1) (ДП ДГ «Степне» Полтавської обл.), українська велика біла, внутріпородний тип 3 (УВБ-3) (ТОВ АФ «Оржицька» Полтавської обл.), ландрас (Л) (ТОВ «Хлібне» Харківської обл.), миргородська (М) (ДП ДГ ПЗ ім. Декабристів Полтавської обл.), полтавська м'ясна (ПМ) (ПЗ «Біловодський» Луганської обл.) та червона білопояса (ЧБП) (ТОВ ПЗ «Україна-Т», Тернопільської обл.) у кількості 50 голів з кожної групи тварин. Вибір тварин для дослідження визначався тим, що вони характеризувалися різним напрямком продуктивності і є різними за походженням. Виділення ДНК зі зразків біоматеріалу проводили з використанням іонообмінної смоли «Chelex-100». Генотипування здійснювали методом ПЛР-ПДРФ згідно методики [3] з власними модифікаціями, що стосувалися підбору температури відпалу праймерів та оптимальної концентрації гелю для розділення фрагментів рестрикції. Для полімеразної ланцюгової реакції використовували праймери наступної структури:

MUC4 Forward: 5'-GTGCCTTGGGTGAGAGGTTA-3'

MUC4 Reverse: 5'-CACTCTGCCGTTCTCTTCC -3'

Синтезований у результаті ПЛР ДНК-продукт обробляли рестриктазою *XbaI* (*Fermentas*, Литва), що зумовлювало появу фрагментів рестрикції, які відповідають наступним генотипам гена *MUC4*: GG – 367 п.н., GC - 367, 216, 151п.н., CC - 216, 151п.н.

Для діалельної маркерної системи *MUC4* відхилення від генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом у досліджених популяціях було виражено критерієм Хі-квадрат; частоти алелів, оцінку генних частот, визначення гетерозиготності обраховували за допомогою програми GenAlex 6.0. [8].

Результати досліджень. За результатами ДНК-аналізу свиней семи порід і внутріпородних типів за локусом *MUC4* визначена їх генетична структура. Зокрема, були розраховані частоти алелів. Результати представлені на рис. 1.

Встановлено переважання частоти потенційно корисного алеля G над небажаним алелем C в усіх досліджених популяціях свиней. Найвищою частотою алеля G характеризувалися миргородська (0,795), полтавська м'ясна (0,740) та червона білопояса породи (0,820). Частоти альтернативних алелів у двох популяціях УВБ-3 і ВБА були майже однаковими (0,590 і 0,550). У порівнянні з іншими популяціями, порода ландрас мала вищу частоту алеля C (0,470), тоді як червона білопояса характеризувалася його найнижчим показником (0,180).

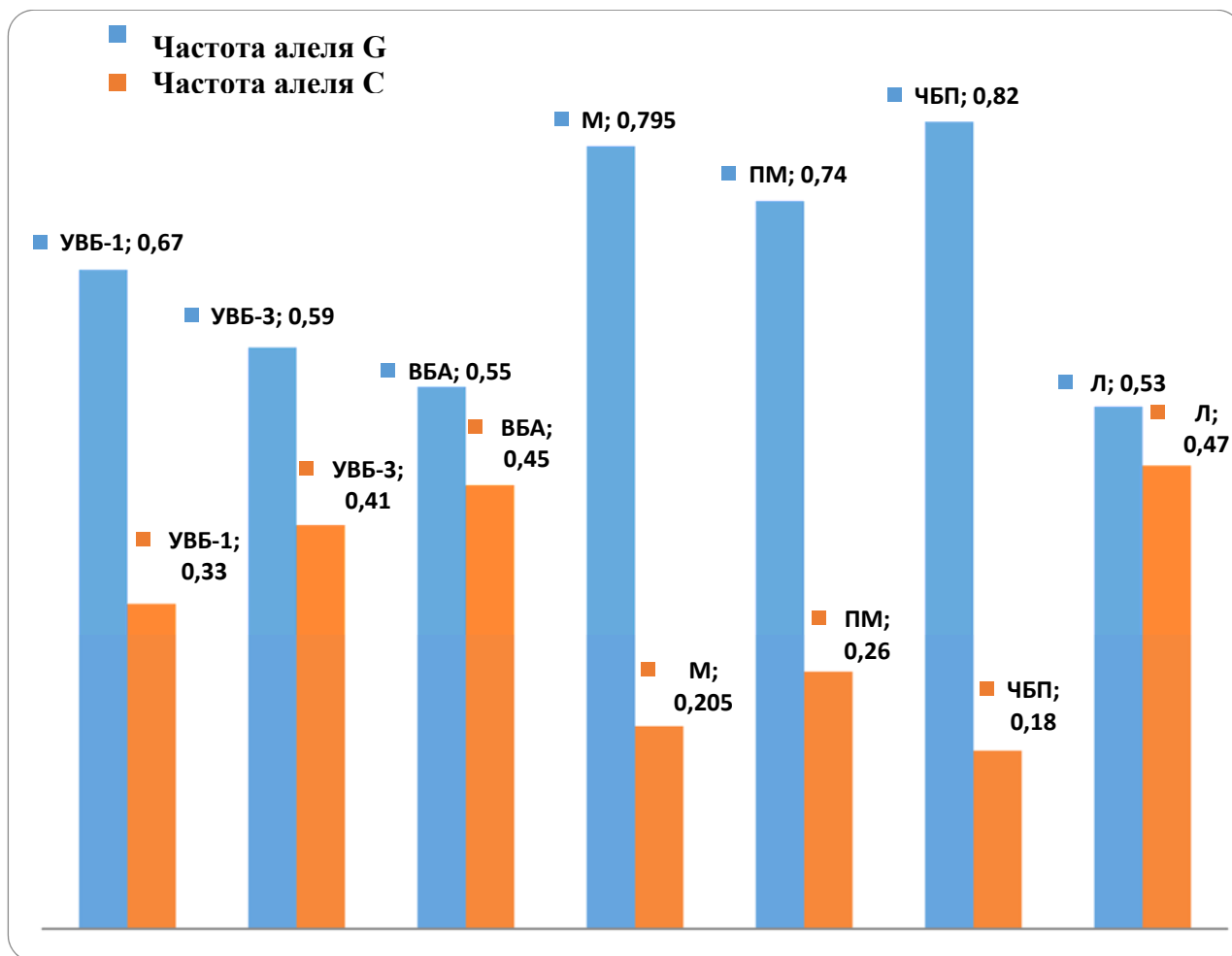


Рис. 1. Розподіл частот алелів гена MUC4 у досліджених популяціях свиней

Аналіз розподілу генотипів показав насиченість усіх популяцій генотипами GG і GC, які наведені у таблиці 1.

1. Генетико-популяційна характеристика різних порід і внутріпородних типів свиней за геном MUC4 (g.1849 G>C)

Породи і внутріпородні типи	Частоти генотипів (фактична/очікувана)			Гетерозиготність		F _{is}	χ ²	PIC
	GG	GC	CC	Ho	He			
УВБ-1	0,380/ 0,449	0,580/ 0,442	0,040/ 0,109	0,580	0,442	-0,312	4,855*	0,34
УВБ-3	0,360/ 0,348	0,460/ 0,484	0,180/ 0,168	0,460	0,484	0,049	0,121	0,36
ВБА	0,140/ 0,303	0,820/ 0,495	0,040/ 0,202	0,820	0,495	-0,657	21,554***	0,37
М	0,589/ 0,631	0,410/ 0,326	0,000/ 0,042	0,411	0,326	-0,258	3,740	0,26
ПМ	0,500/ 0,548	0,480/ 0,385	0,020/ 0,068	0,480	0,385	-0,247	3,060	0,31
ЧБП	0,640/ 0,672	0,360/ 0,295	0,000/ 0,032	0,360	0,295	-0,220	2,409	0,24
Л	0,260/ 0,281	0,540/ 0,498	0,200/ 0,221	0,540	0,498	-0,084	0,352	0,37

Примітка. Ho – фактична гетерозиготність; He – очікувана гетерозиготність; F_{is} – індекс фіксації Райта; χ² – відхилення між емпіричними та теоретичними частотами генотипів відносно закону Гарді – Вайнберга; * – p ≤ 0,05, *** – p ≤ 0,001.

Позитивне значення індексу фіксації Райта та перевага очікуваної гетерозиготності (0,484) над фактичною (0,460) для УВБ-3 може свідчити про на існування помірною інбридингу та селекційного тиску у цьому стаді. Інші популяції характеризувалися негативним значенням фіксаційного індексу, що є показником надлишку гетерозигот, тобто ці породи перебувають в стані аутбридингу. У популяції тварин ВБА знайдена суттєва різниця між фактичною (0,820) та очікуваною (0,495) гетерозиготністю внаслідок переважної більшості гетерозиготних особин. Спираючись на літературні дані, можна припустити, що тварини з генотипом СС, які чутливі до кишкових інфекцій, гинуть у ранньому віці, тоді як особини-носії генотипів GG і GC є стійкими, і характеризуються більшою часткою тварин, що залишилися живими при народженні та у підсисний період [4].

Для популяції свиней ВБА та УВБ-1 визначено статистично достовірне відхилення фактичних частот генотипів від очікуваних за Гарді-Вайнбергом. Це може свідчити, що дані популяції не знаходяться в стані генетичної рівноваги та про залучення певних генотипів за обраним для дослідження геном у селекційний процес.

Отримані результати популяційного аналізу дозволяють провести оцінку інформативності поліморфної системи гена *MUC4* в досліджуваних мікропопуляціях свиней. Оцінка проводилась методом розрахунку PIC (polymorphic informative content) – інформаційного вмісту поліморфізму маркера. Представлені породи мають показник PIC в межах 0,24–0,37, що вказує на середній рівень поліморфності даного гена і є сприятливим щодо перспективи селекції з використанням молекулярної інформації за цим маркером. Низький (менше 0,25) і високий (більше 0,75) рівні PIC не є бажаними для проведення асоціативних досліджень.

Висновки. Отримані дані щодо поліморфізму гена муцин 4 в українських популяціях свиней різного походження та напрямку продуктивності показують можливість проведення маркерної селекції на підвищення генетичної резистентності тварин до колібактеріозу, незалежно від їхньої породної належності. Це створює передумови для створення та впровадження у практику вітчизняного свинарства системи ранньої молекулярно-генетичної діагностики тварин-носіїв господарсько-шкідливого алеля С за геном *MUC4*.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Головка, А. М. Ешерихіоз (колібактеріоз тварин) / А. М. Головка, В. О. Ушкалов // Ветеринарна медицина України.– 2004.– №2.– С.6–9.
2. Тітаренко, О. В. Локалізація ентеробактерій роду *Escherichia* в організмі свиней / О. В. Тітаренко // ВІСНИК Полтавської державної академії. – 2010 – №2. – С.111–113.
3. Jorgensen, C. Porcine polymorphisms and methods for detecting them. Patent Application Publication. / C. Jorgensen 2006. US 2006/0275763.
4. Лобан, Н.Эффективность использования гена *MUC4* в качестве маркера продуктивных качеств свиней белорусской крупной белой породы / Н. Лобан, Д. Каспирович, А. Чернов // Аграрная экономика. – Минск, 2011. – № 6. – С. 57–62
5. Association between the *MUC4* g.243A > G polymorphism and immune and production traits in Large White pigs / Liu Ying, Xue Mei Yin, Ri Wei Xia, Yong Jiu Huo, Guo Qiang Zhu, Sheng Long Wu, Wen Bin Bao//Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences .– 2015. – №39. – P.141–146.
6. Молекулярно-генетичний аналіз генів, асоційованих із господарсько корисними ознаками свині свійської (*Sus Scrofa*) / О. М. Коновал, С. О. Костенко, В. Г. Спиридонов, С. Д. Мельничук // Вісн. Укр. товариства генетиків і селекціонерів. – 2008, том 6. – № 2.– С. 240–243.
7. Поліморфізм локусів *FUT1* та *MUC4* у популяції свиней української м'ясної породи селекції Дніпропетровського СГІ / А. М. Сасенко, В. М. Балацький, Г. І. Сировнев, В. Т. Сметанін // Свинарство. – Полтава, 2012, – Вип. 60. – С. 76–79.

8. Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R Peakall, P. Smouse // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – Vol.6. – P. 288–295.

REFERENCES

1. Holovko, A. M., and V. O. Ushkalov. 2004. Esherykhiroz (kolibakterioz tvaryn) – Colibacteriosis (Animal Colibacteriosis). *Veterynarna medytsyna Ukrayiny – Veterinary Medicine of Ukraine*. 2:6–9 (in Ukrainian).

2. Titarenko, O. V. 2010. Lokalizatsiya enterobakteriy rodu Escherichia v orhanizmi svyney – Localization of enterobacteria of Escherichia genus in the pig organism. *Visnyk Poltavskoyi derzhavnoyi akademiyi – Bulletin of Poltava State Academy*. 2:111–113 (in Ukrainian).

3. Jorgensen, C. 2003. *Porcine polymorphisms and methods for detecting them*. US № 20060275763.

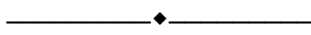
4. Loban, N., D. Kaspyrovych, and A. Chernov. 2011. Эффеkтыvност yспolzovаныа hena MUC4 v kachestve markera produktyvnykh kachestv svyney belorusskoy krupnoy beyoy porodu - Efficiency of Using gene marker MUC4 in productive qualities of Belarusian Large White pigs. *Ahrarnaya ekonomyka – Agrarian economy*. 6:57–62 (in Russian).

5. Ying, Liu, Xue Mei Yin, Ri Wei Xia, Yong Jiu Huo, Guo Qiang Zhu, Sheng Long Wu, and Wen Bin Bao. 2015. Association between the MUC4 g.243A > G polymorphism and immune and production traits in Large White pigs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 39:141–146.

6. Konoval, O. M., S. O. Kostenko, V. H. Spirydonov, and S. D. Mel'nychuk. 2008. Molekulyarno-henetychnyy analiz heniv,asotsiyovanykh iz hospodars'ko korysnymy oznakamy svyni sviys'koyi (Sus Scrofa) – Molecular genetic analysis of genes associated with economically useful traits in Domestic pigs (Sus Scrofa). *Visnyk Ukrayins'koho tovarystva henetykiv i selektsioneriv – Bulletin of the Ukrainian Society of Geneticists and Breeders*. 6(2):240–243(in Ukrainian).

7. Sayenko, A. M., V. M. Balatsky, H. I. Syrovnyev, and V. T. Smetanin. 2012. Polimorfizm lokusiv FUT1 ta MUC4 u populyatsiyi svyney ukrayinskoyi myasnoyi porody selektsiyi Dnipropetrovskoho SHI – Polymorphisms in locis FUT1 and MUC4 in the population of Ukrainian Meety breed under selection of Dnipropetrovsk Agrarian Institute. *Svynarstvo – Swine breeding*. 60:76–79.

8. Peakall, R., and P. Smouse 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6:288–295.



УДК 575:616.7:636.2.034

ВИЯВЛЕННЯ АЛЕЛІВ ГЕНА VOLA-DRB3.2, АСОЦІЙОВАНИХ З НЕКРОБАКТЕРІОЗОМ У КОРІВ УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ

Т. М. СУПРОВИЧ, Т. М. КАРЧЕВСЬКА, Р. В. КОЛІНЧУК, В. П. МІЗИК

Подільський державний аграрно-технічний університет (Кам'янець-Подільський, Україна)

suprovycht@gmail.com

У статті приведено результати виявлення алелів гена VolA-DRB3.2, які мають виражений зв'язок із захворюванням корів української чорно-рябої молочної породи на некробактеріоз і можуть слугувати як ДНК-маркери даного захворювання.

Діагноз на некробактеріоз встановлювався на основі епізоотологічних, клінічних та

© Т. М. СУПРОВИЧ, Т. М. КАРЧЕВСЬКА,
Р. В. КОЛІНЧУК, В. П. МІЗИК, 2016