

Рудоман Г.С., аспірант*

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МОНІТОРИНГ СТІЙКОСТІ СВИНЕЙ РІЗНИХ ПОРІД ДО ЕНТЕРОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЇ *ESCHERICHIA COLI*

Рецензент – кандидат біологічних наук Т.В. Буслик

*Представлені результати ДНК-типуювання свиней різних порід за локусом *FUT1*, що асоційований зі стійкістю тварин до колібактеріозу. Проведено молекулярно-генетичний моніторинг резистентності до цього захворювання. Визначено розподіл частот алелів та генотипів, рівень гетерозиготності та фіксаційний індекс. Наявний поліморфізм даного локусу надає можливість проводити маркерну селекцію з метою створення генетично резистентних стад тварин до кишкової інфекції.*

Ключові слова: локуси, генотип, алелі, фіксаційний індекс, резистентність.

Постановка проблеми. Успішний розвиток свинарства в Україні вимагає запровадження високоефективних заходів щодо попередження різноманітних захворювань тварин, в тому числі - інфекційних. Значна увага приділяється хворобам молодняку свиней, що спричиняють значні економічні збитки господарствам. Серед таких хвороб великого поширення набув колібактеріоз (ешерихіоз). Це гостра інфекційна хвороба, що викликається патогенними штамми бактерії *Escherichia coli*. У новонароджених поросят вона протікає у ентеритній формі (діарея), у молодняку після відлучення - ентеротоксемічній (набрякова хвороба). Загибель поросят від колібактеріозу в перші неділі після опоросу становить від 10 до 50%. Дане захворювання завдає значних збитків господарствам внаслідок недоотримання молодняку, відставання у рості і розвитку тварин, що переохворіли та великих затрат на лікувально-профілактичні заходи. Окрім того, споживання продукції тваринництва, що містить патогенні штами збудника ешерихіозу, може стати причиною спалахів колі-інфекцій серед людей [4]. Отже, здійснення селекційних заходів, які спрямовані на підвищення генетичної стійкості молодняку свиней до кишкової інфекції є досить ефективним шляхом щодо специфічної профілактики цієї хвороби. Виходячи з вищезазначеного, вивчення поліморфізму гена рецептора *E. Coli ECRF18/FUT1*, що асоційований зі стійкістю до колібактеріозу, представляє практичне значення для селекційних заходів у свинарстві як генетичний маркер при створенні резистентних стад тварин. Завдяки сучасному інтенсивному веденню свинарства, що включає завезення імпортного поголів'я і широке застосування штучного запліднення є доцільним проведення генетичного моніторингу стійкості свиней до ешерихіозу.

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. Ген *FUT1* (α -fucosyltransferase1) локалізований у хромосомі 6. Поліморфізм локусу *FUT1* асоційований зі стійкістю до захворювань спровокованих кишковою паличкою. У результаті секвенування гена *FUT1* була виявлена точкова мутація G→A у позиції 307, що дозволило розробити непрямий молекулярно-генетичний тест для діагностики стійких і сприйнятливих до колібактеріозу генотипів. У тварин гомозиготних за рецесивним алелем гена *FUT1*, спостерігається стійкість до захворювань, спричинених кишковою паличкою. Таким чином, мутація гена *FUT1* (G→A у позиції 307 п.н.) у свиней є бажаною [5].

* Науковий керівник: кандидат біологічних наук В.М. Балацький

Генотипування тварин за даним локусом надасть можливість створити резистентні популяції свиней, що в подальшому дозволить зменшити затрати на лікування тварин і профілактичні заходи.

Мета досліджень та методика їх проведення.

Метою досліджень були оптимізація умов визначення генотипів свиней за локусом *FUT1* та молекулярно-генетичний моніторинг популяцій свиней різних порід по локусу *FUT1*.

Генотипування тварин за локусом *FUT1* здійснювалося методом ПЛР-ПДРФ [1] та проводилося у лабораторії генетики Інституту свинарства і АПВ НААН. Для досліджень використані зразки з банку ДНК лабораторії генетики від таких порід: велика біла англійської селекції, українська велика біла, внутріпорідний тип I, ландрас і червона білопояса порода (біоматеріал був відібраний від тварин із провідних племінних господарств України).

Виділення ДНК проводили за допомогою реагенту Chelex 100 (кров та щетина) [2, 6] та за методикою Соколова-Джемелінського (кров)[3]. ПЛР здійснювали у стандартній реакційній суміші (Tapoliti, Росія) в ампліфікаторі “Терцик” (“ДНК – Технологія”, Росія) за програмою 94°C – 5 хв.; 35 цикл.: 94°C – 40с; 60°C – 40 с; 72°C – 60 ста 72°C – 5 хв.

Структура праймерів:

FUT1 – Forward: 5' - CCAACGCCTCCGATTCCTGT– 3',

FUT1 – Reverse: 5' - GTGCATGGCAGGCTGGATGA – 3'.

Під час ПЛР синтезується фрагмент локусу *FUT1* розміром 161 п.н., який гідролізували ендонуклеазою *HinPI* за умов рекомендованих фірмою-виробником (Fermentas, Литва). За результатами гідролізу отримували фрагменти ДНК, які відповідають певним генотипам чутливих або стійких до колибактеріозу тварин, табл.1.

1. Фрагменти рестрикції і відповідні їм генотипи за досліджуванним локусом *FUT1*

Локус/ендонуклеаза рестрикції	Генотипи і відповідні фрагменти рестрикції у п.н.		
<i>FUT1</i> / <i>HinPI</i> (<i>HspAI</i>)	A/A: 161	G/A:161, 117,44	G/G: 117,44

Аналіз фрагментів рестрикції проводили шляхом електрофорезу у 8% поліакриламідному гелі. Для візуалізації здійснювали фарбування гелю бромистим етидієм із послідувачим переглядом на транслюмінаторі. Фотодокументацію виконали цифровим фотоапаратом.

Статистична обробка проводилась у програмі GenAlex 6.0. [7].

Результати досліджень. Всього було досліджено 87 зразків біоматеріалу від різних порід свиней, серед них: велика біла англійської селекції – 29, українська велика біла (УВБ-1) – 40, ландрас – 8, червона білопояса – 10.

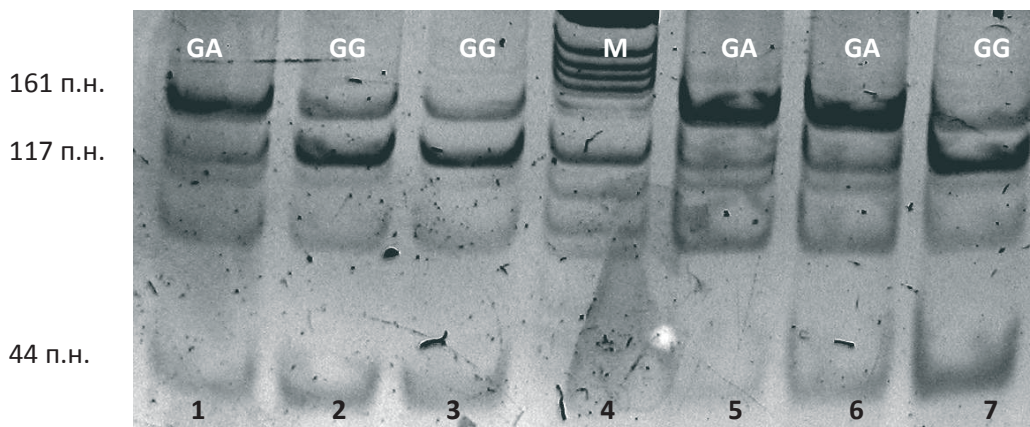


Рис. Електрофорез у 8% поліакриламідному гелі продуктів *HspAI* рестрикції фрагментів локусу *FUT1* ампліфікованих у ПЛР: 4 – маркер молекулярної маси (pBR322/*BsuRI*), 1-3, 5-7 – ДНК свиней відповідних генотипів.

На рисунку представлено результати рестриктного аналізу. Певні рестриктні фрагменти ДНК локусу *FUT1* відповідають різним варіантам генотипів. На доріжках 1, 5, 6 представлений генотип GA, та на доріжках 2, 3 і 7 – генотип GG. Генотипи GA і GG визначають чутливих до колібактеріозу тварин. Генотип AA асоційований із стійкості свиней до кишкової інфекції (на Рис. не представлений).

У таблиці 2 наведені результати популяційного аналізу різних порід свиней по локусу *FUT1*.

Згідно даних таблиці 2 видно, що породи різняться між собою за розподілом алелів та генотипів за геном *FUT1*. Генотип AA при низькій частоті зустрічається серед порід українська велика біла та червона білопояса, тоді як генотипи GA і GG є більш поширеними.

2. Розподіл частот алелів та генотипів по локусу *FUT1* у популяціях свиней

Породи свиней	Частоти алелів		Частоти генотипів			Гетерозиготність		Фіксаційний індекс
	A	G	GA	GG	AA	H ₀	H _e	F
ВБА	0,259	0,741	0,51	0,49	0,00	0,517	0,383	-0,349
УВБ-1	0,338	0,663	0,58	0,37	0,05	0,575	0,447	-0,286
Ландрас	0,125	0,875	0,25	0,75	0,00	0,250	0,219	-0,143
ЧБП	0,250	0,750	0,3	0,6	0,1	0,300	0,375	0,200

Від’ємне значення фіксаційного індексу в породах ВБА, УВБ-1 та ландрас показує певний рівень селективного тиску. Червона білопояса порода має показник фіксаційного індексу 0,200, що свідчить про прилиття крові інших порід.

Згідно літературних даних і результатів досліджень існує можливість відбору тварин з генотипом AA за вказаним локусом, які потенційно можуть бути стійкими до колібактеріозу.

Висновки. 1. Оптимізовано ПЛР-ПДРФ техніку визначення генотипу свиней по локусу *FUT1*.

2. На основі генотипування по локусу *FUT1* здійснено молекулярно – генетичний моніторинг стійкості свиней різних порід до колібактеріозу та розраховано розподіл частот алелів і генотипів, рівень гетерозиготності та фіксаційний індекс.

3. Визначений високий рівень поліморфізму локусу *FUT1* серед досліджених порід свиней надає можливість проводити маркерну селекцію з метою підвищення генетичної резистентності свиней до ешерихіозу.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Дымань Т.Н. ДНК – технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих / В.И.Глазко, Е.В.Шульга, Т.Н.Дымань и др. – Белая Церковь, 2001. – 488 с.

2. Корінний С.М. Шерсть тварин, як зручний об’єкт виділення ДНК для аналізу за допомогою ПЛР / С.М.Корінний, К.Ф.Почерняєв, В.М.Балацький // Ветеринарна біотехнологія. – Київ, 2005. – №7. – С. 80-83

3. Соколов Б.П. Выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК с использованием ацетата калия / Б.П.Соколов, В.В.Джемелинский // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1989. – № 6. – С. 45-46.

4. Тітаренко О.В. Локалізація ентеробактерій роду *Escherichia* в організмі свиней // ВІСНИК Полтавської державної академії. – 2010 - №2. – С.111-113.

5. United States Patent № 6,596,923 B1 US, Methods and compositions to identify swine genetically resistant to F18 E. Coli associated diseases / Bosworthetal.; Date of Patent: Jul/22, 2003.

6. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR – Based Typing from Forensic Material // BioTechniques. – 1991. - № 10. – P.506-9.

7. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.

Рудоман Г.С. Молекулярно-генетический мониторинг устойчивости свиней различных пород к энтеропатогенным штаммам бактерии *Escherichia coli*.

Представлены результаты ДНК-типирования свиней различных пород по локусу FUT1, который ассоциирован с устойчивостью животных к колибактериозу. Проведен молекулярно-генетический мониторинг резистентности к этому заболеванию. Определено распределение частот аллелей и генотипов, уровень гетерозиготности и фиксационный индекс. Имеющийся полиморфизм данного локуса позволяет проводить маркерную селекцию с целью создания генетически резистентных стад животных к кишечной инфекции.

Ключевые слова: локусы, генотип, аллели, фиксационный индекс, резистентность.

G.C. Rydoman. Molecylar genetical monitoring of the resistance of pigs of different breeds to enteropathogenic strains of bacterium *Escherichia coli*.

The results of DNA typing of pigs of different breeds for FUT1 locus which is assotiated with the resistance of animals to colibacteriosis are presented. Molecyla rgenetical monitoring of the resistance to this disease was performed. It has been determined the allocation of frequencies of alleles and genotypes, a heterozygosis level and a fixation index. The presence polymorphism of this locus afford the possibility to performed a marker selection with the aim of the creating of genetically resistant herds of animal to intestinal infection.

УДК 577.21; 636.082

Нор В.Ю., аспірант*

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА ПОРІД СВИНЕЙ РІЗНОГО НАПРЯМКУ ПРОДУКТИВНОСТІ ЗА ГЕНОМ ПЕРИЛІПІНУ

Рецензент – кандидат біологічних наук В.М. Балацький

Представлено результати ДНК-типуння свиней порід велика біла, миргородська та помісей велика біла × ландрас за поліморфними сайтами гену периліпіну, що асоційовані з показниками середньодобового приросту та осаленості туш. Показана можливість проведення маркерної селекції на покращення відгодівельних і м'ясних якостей свиней за певними PLIN - генотипами.

Ключові слова: ДНК-типуння, периліпін, осаленість туш, маркерна селекція.

* Науковий керівник: кандидат сільськогосподарських наук О.І. Метлицька