

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСОВ *FUT1* И *MUC4* В ЛОКАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ СВИНЕЙ УКРАИНСКОЙ МЯСНОЙ ПОРОДЫ

Г.И. СЫРОВНЕВ

Днепропетровский государственный аграрный университет
E-mail: g.i.syrovnnev@yandex.ru

*В соответствии с данными ПЦР-ПДРФ анализа проб биоматериала свиней украинской мясной породы (тип селекции Днепропетровского сельскохозяйственного института) выявлены полиморфизмы в локусах *FUT1* и *MUC4*, ассоциированные с устойчивостью животных к колибактериозу. Изучены особенности распределения аллелей и генотипов по исследуемым локусам в популяции в целом, среди производителей и маток основного стада, а также в создаваемой инбредной линии. Исследована структура генофонда популяции свиней по полиморфным локусам *FUT1* и *MUC4*. Установлены распределения аллелей и генотипов среди семейств и линий, а также уровни филогенетической взаимосвязи между генеалогическими элементами популяции.*

Ключевые слова: популяция, свиньи, полиморфизм, локус, *FUT1*, *MUC4*, семейство, линия.

Введение. Животные селекции Днепропетровского сельскохозяйственного института (ДСХИ) созданы путем длительной племенной работы с использованием сложного воспроизводительного скрещивания крупной белой породы свиней, беркширов и ландрасов с применением различных степеней инбридинга и жесткой браковки. Генеалогия популяции представлена тремя линиями и четырьмя семействами [1].

На основе генетико-популяционных исследований Сметаниным [2] разработана концепция сохранности генетической изменчивости в закрытых локальных популяциях свиней. Дальнейшее развитие этих исследований базируется на введении в анализ генофонда новых маркерных систем, в том числе локусов хозяйственно полезных признаков (QTL).

Важной проблемой на современном этапе развития свиноводства остается разработка систем мероприятий, целью которых является повышение резистентности молодняка к кишечным инфекциям. Практика зоотехнии показывает, что традиционных санитарно-ветеринарных мероприятий в борьбе с инфекционными болезнями животных недостаточно. В частнос-

ти, учитывая значительные ежегодные потери поголовья свиней от отечной болезни и послеотъемной диареи поросят, вызванных энтеропатогенными *E. coli*, первостепенной задачей промышленного свиноводства является предупреждение и преодоление последствий таких заболеваний [3].

Одними из факторов, влияющих на процесс инфицирования животных патогенными *E. coli*, являются сиалогликопротеин слизи кишечника муцин 4 (*MUC4*) и фукозилирующий фермент α -фукозилтрансфераза-1 (*FUT1*), которые участвуют в молекулярном взаимодействии бактериальных клеток, имеющих фимбрии типа *F4* и *F18*, с клетками эпителия кишечника поросят [4, 5].

Полиморфизм последовательностей генов *MUC4* и *FUT1* свиней в свою очередь влияет на характеристики продуктов их экспрессии. Трансверсия $G \rightarrow C$ в позиции 1849 п.н. гена *MUC4* приводит к синтезу муцина 4, который не адсорбирует патогенные *E. coli*. Транзиция $G \rightarrow A$ в позиции 307 п.н. гена *FUT1* приводит к сверхсинтезу α -фукозилтрансферазы-1, что конкурентно блокирует рецепторные соединения для клеток бактерий на поверхности энтероцитов. Гены *MUC4* и *FUT1* представляют собой диаллельные кодоминантные системы [4, 5]. Поэтому практический интерес представляет изучение возможности применения полиморфизма генов *FUT1* и *MUC4* в процессе разведения свиней внутривидового типа селекции ДСХИ украинской мясной породы.

Вместе с тем стоит провести оценку распределения желательных генотипов в линиях и семействах изучаемой популяции, рассчитывая на выявление генеалогических структур, наиболее перспективных для селекции на устойчивость к колибактериозу.

Материалы и методы. Определение генотипов проводили у производителей и маток популяции свиней селекции ДСХИ, разводи-

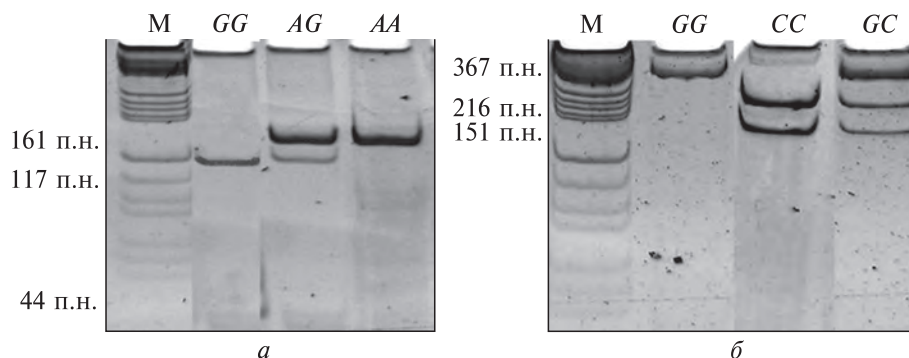


Рис. 1. Электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле продуктов *HinPI* (а) и *XbaI* (б) рестрикции фрагментов локусов *FUT1* (а) (*GG* – чувствительные к колибактериозу гомозиготы, *AG* – чувствительные гетерозиготы, *AA* – устойчивые гомозиготы) и *MUC4* (б) (*GG* – устойчивые к колибактериозу гомозиготы, *CC* – чувствительные гомозиготы, *GC* – чувствительные гетерозиготы); М – маркер молекулярной массы *pBR322/BsuRI*

мых в ООО «Луговское» Солонянского района Днепропетровской области. Выделение ДНК осуществляли из проб пятен крови и щетины животных в присутствии ионообменной смолы Chelex-100 [6]. Оценку генотипов животных по локусам *FUT1* и *MUC4* проводили в лаборатории генетики Института свиноводства и агропромышленного производства НААН Украины с помощью метода ПЦР-ПДРФ [7]. ПЦР осуществляли в стандартной реакционной смеси (Тапотили, РФ) в амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», РФ) по программе: 94 °С – 5 мин; 35 циклов: 94 °С – 40 с; 60 °С – 40 с; 72 °С – 60 с и 72 °С – 5 мин для последовательностей *MUC4* и *FUT1*.

Для идентификации фрагмента локуса *FUT1* размером 161 п.н. использовали праймеры: прямой 5'-ССААСГССТССГАТТССТ-ГТ-3', обратный 5'-ГТГСАТГГСАГГСТГ-

ГАТГА-3' [8], для идентификации фрагмента локуса *MUC4* размером 367 п.н. – прямой 5'-GTGCCTTGGGTGAGAGGTTA-3', обратный 5'-ACTCTGCCGTTCTCTTTCC-3' [9].

Синтезированные в результате ПЦР фрагменты локуса *FUT1* расщепляли эндонуклеазой *HinPI*, фрагменты локуса *MUC4* – эндонуклеазой *XbaI* в условиях, рекомендованных фирмой-производителем («Fermentas», Литва).

Анализ фрагментов рестрикции проводили при помощи электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (рис. 1), визуализацию – путем окрашивания полиакриламидного геля бромистым этидием с последующим просмотром в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью анализа распределения частот аллелей и генотипов в популяции и ее

Таблица 1. Частоты генотипов и аллелей по локусу *FUT1* в популяции свиней селекции ДСХИ

Группа животных	n	Генотип			Аллель		S _{p,q}	χ ²
		AA	AG	GG	A	G		
Производители	36	0,06	0,44	0,50	0,28	0,72	0,050	00,42
Матки	55	0,06	0,47	0,47	0,29	0,71	0,040	1,17
Инбредные	35	0,12	0,17	0,71	0,20	0,80	0,058	7,54 **
Аутбредные	56	0,03	0,63	0,34	0,34	0,66	0,034	10,54 *
Все стадо	91	0,06	0,46	0,48	0,29	0,71	0,031	1,55

Примечание. Вероятности различия между распределением генотипов исследуемой популяции и согласно закону Харди-Вайнберга: * P ≥ 0,99; ** P ≥ 0,95.

структурных единицах, расчет генетических дистанций и генетической идентичности, а также построение дендрограммы филогенетических связей – по программе MEGA 5.0 [10].

Результаты исследований и их обсуждение. С помощью ДНК-маркирования выявлен генетический полиморфизм локусов *FUT1* и *MUC4* среди всех исследуемых групп животных популяции. Частоты распределения аллелей и генотипов по локусу *FUT1* в популяции и ее структурных единицах представлены в табл. 1. В целом популяция свиней селекции ДСХИ характеризуется пониженной частотой (0,29) желательного аллеля *A* по локусу *FUT1*. В инбредной группе животных частота аллеля *A* на 0,09 ниже, чем среди всех животных с определенными генотипами. Для животных аутбредной и инбредной групп распределение частот аллелей и генотипов по локусу *FUT1* заметно различается. Среди инбредных животных преобладает генотип *GG* (0,71), а среди аутбредных – *AG* (0,63). Частота аллелей у инбредных животных

смещена на 0,09÷0,14 в сторону нежелательного *G* относительно других исследуемых групп. Следует отметить, что распределение генотипов по локусу *FUT1* среди производителей и маток близко к показателям по стаду в целом.

На сегодняшний день среди стран Восточной Европы наиболее полно исследован полиморфизм гена *FUT1* в популяциях свиней крупной белой породы. При этом концентрация желательного аллеля *A* находится в диапазоне 0,13–0,24, что сопоставимо с данными, полученными в нашем исследовании [11–13]. Такая тенденция распределения аллельных вариантов характерна для коммерческих пород крупная белая, ландрас, дюрок и пьетрен, разводимых в Центральной и Западной Европе [14, 15]. Однако в популяциях некоторых локальных пород Польши и Чехии количество животных с генотипом *AA* гена *FUT1* достигает 35,5 % (злотницкая пятнистая) и 83,6 % (пржештицкая черно-пестрая) [16, 17]. Согласно проведенным в Китае исследованиям [18, 19] большинство

Таблица 2. Частоты генотипов и аллелей по локусу *MUC4* в популяции свиней селекции ДСХИ

Группа животных	n	Генотип			Аллель		S _{р,ч}	χ ²
		GG	GC	CC	G	C		
Производители	23	0,39	0,48	0,13	0,63	0,37	0,070	0,02
Матки	44	0,25	0,61	0,14	0,56	0,44	0,046	2,64
Инбредные	18	0,44	0,56	–	0,72	0,28	0,059	2,66
Аутбредные	49	0,25	0,57	0,18	0,53	0,47	0,047	1,06
Все стадо	67	0,30	0,57	0,13	0,58	0,42	0,039	1,84

Таблица 3. Распределение комплексных генотипов локусов *FUT1* и *MUC4* в популяции свиней селекции ДСХИ

Генотип	Все стадо		Производители		Матки		Желательные аллели		Разница желательные/нежелательные аллели
	n	%	n	%	n	%	Количество	Доля	
<i>AAGG</i>	–	–	–	–	–	–	4	100	+4
<i>AAGC</i>	4	6,35	2	10,00	2	4,65	3	75	+2
<i>AGGG</i>	7	11,11	2	10,00	5	11,63	3	75	+2
<i>AACC</i>	–	–	–	–	–	–	2	50	0
<i>AGGC</i>	19	30,15	5	25,00	14	32,56	2	50	0
<i>GGGG</i>	11	17,47	5	25,00	6	13,95	2	50	0
<i>AGCC</i>	6	9,52	4	20,00	9	20,93	1	25	–2
<i>GGGC</i>	13	20,64	1	5,00	5	11,63	1	25	–2
<i>GGCC</i>	3	4,76	1	5,00	2	4,65	0	0	–4

местных пород свиней и популяция дикого азиатского кабана не имеют мутации $G \rightarrow A$ гена *FUT1* в позиции 307 п.н.

Показатели распределения аллелей и генотипов по локусу *MUC4* в исследуемой популяции и в отдельных ее группах приведены в табл. 2. Установлено, что популяция характеризуется высоким уровнем полиморфизма по локусу *MUC4*. Значительная часть животных стада представлена генотипом *GG*, ассоциированным с устойчивостью молодняка к кишечным расстройствам, вызываемым патогенными *E. coli*. Следует отметить, что для инбредной линии свиней украинской мясной породы (тип селекции ДСХИ) характерна высокая концентрация аллеля *G* – 0,72 и отсутствие животных с нежелательным генотипом *CC*.

В соответствии с исследованиями основных европейских пород свиней на наличие полиморфизма гена *MUC4* установлено, что генотип *GG* редко встречается у животных породы ландрас (0,2 %) и йоркшир (20 %), а наиболее часто – у породы дюрок (88,3 %) и гемпшир (97,9 %) [20, 21]. Распределение животных в соответствии с частотой комплексных генотипов локусов *FUT1* и *MUC4* представлено в табл. 3.

Следует отметить, что крайне низкая концентрации генотипов *AA* по локусу *FUT1* в популяции обуславливает отсутствие вариантов генотипов *AAGG* и *AACC*, а генотип *AAGC* встречается с частотой 0,06 (4 особи). Однако около $\frac{1}{3}$ всех животных являются гетерозиготными по обоим локусам, что позволяет проводить их дальнейшее спаривание для получения гомозиготных потомков по аллелям *A* и *G*, локусов *FUT1* и *MUC4* соответственно. А скрещивание родительских форм с генотипами *AAGC* и *AGGG* позволяет уже в первом поколении получить половину потомков с наиболее благоприятным сочетанием аллелей (*AAGG*). Поэтому в дальнейшем селекционные мероприятия должны быть направлены на повышение доли генотипов, имеющих аллели генов *FUT1* и *MUC4*, которые обеспечивают устойчивость к колибактериозу.

В исследованной популяции, а также во всех ее внутривидовых структурах рассчитаны наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготности, а также индекс фиксации Райта (F_{IS}), указывающий на избыток гетерозигот и

присутствие инбридинга в популяции (табл. 4).

Следует отметить, что для всей популяции по локусу *FUT1* характерно небольшое превышение значений наблюдаемой гетерозиготности по сравнению с ожидаемой. Упомянутая закономерность прослеживается также в группах производителей и маток. Однако для инбредных и аутбредных животных характерны определенные особенности в распределении гетерозигот. Для инбредной группы выявлена более высокая ожидаемая, чем наблюдаемая гетерозиготность, а для аутбредных животных обнаружена обратная закономерность. Одновременно значения индексов фиксации для этих групп животных указывают на наличие определенного селекционного давления.

По локусу *MUC4* во всех группах животных популяции наблюдаемая гетерозиготность была выше ожидаемой. Наименьший индекс фиксации и соответственно селекционная нагрузка наблюдалась в разрезе группы производителей (–0,026), а наибольший (–0,385) – инбредной линии. Среди всех исследуемых генеалогических групп популяции имеется полиморфизм по локусам *FUT1* и *MUC4*. В семействах Вольницы по обоим локусам, а Степной – по локусу *MUC4* выявлены лишь чувствительные к колибактериозу гетерозиготы.

Таблица 4. Гетерозиготность и индексы фиксации по локусам *FUT1* и *MUC4* в структурных единицах популяции свиней селекции ДСХИ

Группа животных	Гетерозиготность		Индекс фиксации Райта, F_{IS}
	ожидаемая (H_e)	наблюдаемая (H_o)	
Локус <i>FUT1</i>			
Все стадо	0,408	0,462	–0,131
Производители	0,401	0,444	–0,107
Матки	0,413	0,473	–0,146
Инбредные	0,320	0,171	0,464
Аутбредные	0,448	0,643	–0,434
Локус <i>MUC4</i>			
Все стадо	0,487	0,567	–0,166
Производители	0,466	0,478	–0,026
Матки	0,494	0,614	–0,243
Инбредные	0,401	0,556	–0,385
Аутбредные	0,498	0,571	–0,147

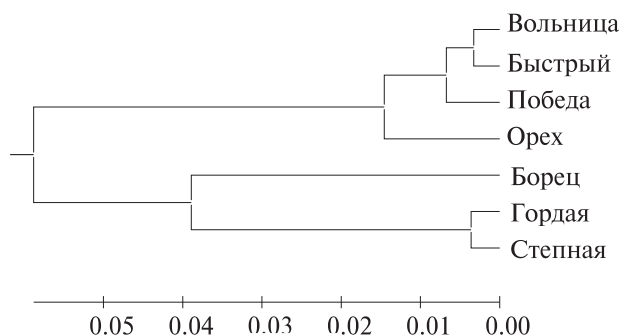


Рис. 2. Дендрограмма генетических связей между линиями и семействами популяции свиней селекции Днепропетровского СХИ с учетом полиморфизма локусов *FUT1* и *MUC4*

ты. Семейство Гордой по исследуемым локусам представлено тремя возможными генотипами. По локусу *FUT1* в семействах Степной и Победы выявлены чувствительные гетерозиготы (генотип *AG*) и гомозиготы (генотип *GG*).

Генотип *AA* (локус *FUT1*), обуславливающий устойчивость к патогенным *E. coli*, выявлен лишь у животных семейства Гордой с частотой 0,07. В семействах Гордой и Победы выявлены все три генотипа по локусу *MUC4*. Частота встречаемости генотипа *GC* по локусу *MUC4* составила соответственно 0,56 и 0,46 в семействах Гордой и Победы, а генотипа *GG* – 0,31 в обоих указанных семействах.

У хряков селекции ДСХИ по локусу *FUT1* только в линии Быстрого встречаются животные с генотипом *AA* с частотой 0,10. Концентрация генотипа *AG* (чувствительные гетерозиготы) среди линий популяции: Борец – 0,53, Быстрый – 0,38, Орех – 0,75. Нежелательные генотипы *GG* чувствительных гомозигот присутствуют с частотой 0,47; 0,52 и 0,25 среди линий Борца, Быстрого и Ореха соответственно. По локусу *MUC4* хряки с нежелательным генотипом *CC* среди линий Быстрого, Борца и Ореха наблюдаются с частотой 0,10; 0,15 и 0,25, а количество гетерозигот *GC* соответственно составляет 0,60, 0,53 и 0,75, частота желательного генотипа *GG* по локусу *MUC4* в линиях Борца и Быстрого – 0,32 и 0,30.

На рис. 2 представлена дендрограмма генетических взаимосвязей между генеалогическими структурами популяции, рассчитанными согласно полиморфизму локусов *FUT1* и *MUC4* при помощи метода невзвешенного попарно-груп-

пового арифметического среднего (UPGMA). На дендрограмме можно выделить два отдельных кластера. В один из них входят линии Быстрого и Ореха, а также семейства Вольницы и Победы, во второй линия Борца и два семейства – Гордой и Степной. Данные кластеризации указывают на уровни филогенетической связи между линиями и семействами и могут непосредственно использоваться в программе селекционных мероприятий с учетом генетического разнообразия по другим полиморфным локусам хозяйственно полезных признаков.

Выводы. Анализ генофонда популяции свиней селекции ДСХИ по локусам *FUT1* и *MUC4* показал наличие генетического полиморфизма в большинстве внутривидовых единиц. Распределение частот аллелей *A* и *G* в популяции по локусу *FUT1* составляет 0,29 и 0,71 соответственно, а по локусу *MUC4* аллелей *G* – 0,58 и *C* – 0,42. Исследуемая популяция свиней характеризуется высокой наблюдаемой гетерозиготностью по обоим локусам относительно теоретически ожидаемой. По исследуемым локусам установлено тесное внутривидовое взаимодействие генеалогических элементов. Наиболее генетически близкими являются линия Быстрого и семейство Вольницы, а наибольшее расхождение наблюдается между семействами Степной и Победы. Во всех линиях и семействах преобладают чувствительные гомо- и гетерозиготы (генотипы *GG* и *AG*) по локусу *FUT1*. Генотип *AA* встречается только в линии Быстрого (0,10) и семействе Гордой (0,07). По локусу *MUC4* во всех генеалогических элементах популяции преобладают чувствительные к колибактериозу гетерозиготы (*GC*). В семействах Гордой и Победы, а также линиях Борца и Быстрого превалирует число особей с устойчивым генотипом *GG* над чувствительными *CC*.

THE GENETIC POLYMORPHISM OF *FUT1* AND *MUC4* LOCI IN LOCAL POPULATION OF UKRAINIAN MEAT BREED PIGS

G.I. Syrovnev

Dnepropetrovsk state agrarian university
E-mail: g.i.syrovnev@yandex.ru

According to the PCR-RFLP analysis of biological material polymorphisms in the population of Ukrainian meat breed pigs (the type of Dnepropetrovsk agricultural

institute selection) was found at loci *FUT1* and *MUC4*, which determine the resistance to colibacteriosis in animals. The features of distribution on alleles and genotypes for the loci in the general population, among boars and sows in the herd, and in the created inbred line were studied. The gene pool structure of the pig population of Dnepropetrovsk agricultural institute selection on polymorphic loci *FUT1* and *MUC4* was investigated. A distribution of alleles and genotypes of the families and the lines and levels of phylogenetic relationships between of genealogical elements in population was also established.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сметанин В.Т. Локальная популяция свиней селекции Днепропетровского СХИ, ее продуктивность, структура и генетические особенности // Наук.-техн. Бюл. Ин-ту тваринництва УААН. – Харків. – 2005. – 91. – С. 86–91.
2. Сметанин В.Т. Изменчивость и ее сохранение в локальных популяциях // Вісн. Дніпропетр. ДАУ. – 2006. – 2. – С. 148–151.
3. Kolacz R., Swynar P., Filistowicz M. Genetic progress and health implications in swine breeding // Med. Wet. – 2009. – 65. – P. 435–438.
4. Meijerink E., Neuenschwander S., Fries R. et al. A DNA polymorphism influencing α -(1,2) fucosyltransferase activity of the pig *FUT1* enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to *Escherichia coli* F18 adhesion // Immunogen. – 2000. – 52. – P. 129–136.
5. Rampoldi A., Jacobsen M.J., Bertschinger H.U. et al. The receptor locus for *Escherichia coli* F4ab/F4ac in the pig maps distal to the *MUC4-LMLN* region // Mamm. Genome. – 2011. – 22. – P. 122–129.
6. Armas Y. de, Capy V., González E. et al. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100 // Rev. Esp. Patol. – 2006. – 39. – P. 171–174.
7. Wenzel J.W. Phylogenetic analysis : The basic method // Techniques in Molecular Systematics and Evolution / Eds R. DeSalle, G. Giribet, W. Wheeler. – Basel, 2002. – P. 4–28.
8. Patent US № 6596923 B1. Methods and compositions to identify swine genetically resistant to F18 *E. coli* associated diseases / B.T. Bosworth, P. Vögeli. Publ. date : Jul. 22, 2003.
9. Patent US № 7785778 B2. Porcine polymorphisms and methods for detection them / C.B. Jorgensen et al. Publ. date : Aug. 31, 2010.
10. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. – 2011. – 28. – P. 2731–2739.
11. Коновалова Е.Н., Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А. Исследования гена рецептора *E. coli* F18 во взаимосвязи с хозяйственно-полезными признаками свиней // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных : Материалы Междунар. науч. конф. – Дубровицы, 2003. – С. 112–117.
12. Лобан Н.А., Василюк О.Я. Карта генетического профиля свиней белорусской крупной белой породы // Вест. Белорус. с.-х. академии. – 2010. – № 2. – С. 116–121.
13. Коновал О.М., Костенко С.О., Білек К., Філкукова Ж. Дослідження поліморфізму свиней великої білої породи за генами господарсько корисних ознак // Наук. доп. НАУ [електронний ресурс]. – Київ, 2008. – № 1 (9) – 15 с.
14. Buske B., Sternstein I., Reissmann M. et al. Analysis of association of *GPX5*, *FUT1* and *ESR2* genotypes with litter size in a commercial pig cross population // Arch. Tierz. – 2006. – 49. – P. 259–268.
15. Filistowicz M., Jasek S. Preliminary study on the effect of *FUT1* and *MUC4* loci on the fertility of sows and on breeding success of piglets. Acta fytotechnica et zootechnica // Mimoriadne číslo Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae. – 2006. – P. 23–26.
16. Klukowska J., Urbaniak B., Switonski M. High frequency of M307^a mutation at *FUT1* locus, causing resistance to oedema disease, in an autochthonous polish pig breed, the zlotnicka spotted // J. Anim. Breed. Genet. – 1999. – 116, № 6. – P. 519–524.
17. Vrtkova I., Matousek V., Stehlik L. et al. Genomic markers important for health and reproductive traits in pigs // J. Res. Pig Breed. – 2007. – 1, № 2. – P. 4–6.
18. Bao W.B., Wu S.L., Musa H.H. et al. Genetic variation at the alpha-1-fucosyltransferase (*FUT1*) gene in Asian wild boar and Chinese and Westerncommercial pig breeds // J. Anim. Breed. Genet. – 2008. – 125. – P. 427–430.
19. Yan X.M., Ren J., Guo Y.M. et al. Research on the genetic variations of α 1-fucosyltransferase (*FUT1*) gene in 26 pig breeds // Yi Chuan Xue Bao. – 2003. – 30. – P. 830–834.
20. Patent WO 2004048606 A2. Porcine polymorphisms and methods for detecting them / C.B. Jorgensen et al. Publ. date : Jun. 10, 2004.
21. Matoušek V., Kernerová N., Vrtková I. The variability of chosen genes and their associations with performance traits in sows of prestige black-pied breed // Res. Pig Breed. – 2011. – 5, № 2. – P. 13–20.

Поступила 28.12.12