

УДК 636.4:636.082:575.827

Зинов'єва Н.А.¹, д. б. н., професор, чл.-кор. РАСГН;**Гладирь О.О.**¹, к. б. н.;**Луговий С.І.**², к. с.-г. н. доцент, Lugovoy79@mail.ru;**Костюніна О.В.**¹, к. б. н.;**Домашова Л.О.**², здобувач ©¹ – Всеросійський інститут тваринництва РАСГН, с. Дубровиці, Росія² – Миколаївський державний аграрний університет, м. Миколаїв, Україна

ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА BF (BF_in1_C79T) У СВИНЕЙ ВЕЛИКОЇ БІЛОЇ ПОРОДИ Різного походження

У статті наведено результати аналізу свиней великої білої породи різного походження за геном пропердину (BF). Встановлено особливості поліморфізму даного гена у свиней англійської та угорської селекції.

Ключові слова: ген пропердину (BF), поліморфізм, свині, велика біла порода.

Вступ. Сукупна кількість поросят, отриманих від однієї свиноматки протягом року є економічно важливою ознакою. Вона визначається, насамперед, кількістю опоросів, яку отримують від свиноматки протягом року, розміром гнізд і збереженістю поросят до відлучення. Однак, як відомо, рівень успадкованості багатьох відтворювальних ознак (у тому числі, розміру гнізда і збереженості поросят) є відносно низьким, на тлі відносно високої генетичної варіанси цих ознак.

Отже, селекційна робота, що спрямована на підвищення багатоплідності свиноматок, а також на підвищення рівня збереженості поросят до відлучення, можлива з використанням сучасних методів селекційно-племінної роботи, зокрема, маркер залежної селекції (т.зв. MAS – marked assisted selection).

В останні роки проводиться постійний моніторинг геному свиней для пошуку хромосомних сегментів (т.зв. QTL – quantitative trait loci), або поліморфних генів, які можуть бути пов'язаними з показниками відтворювальних якостей свиней. Одним з таких генів, для якого нещодавно виявлено вірогідний зв'язок, насамперед, з показником багатоплідності свиней, є ген пропердину (BF).

Ген BF у свиней розташований на р плечі сьомої хромосоми (SSC7) біля центроміри (7 1/2p11–p12) [13]. Основною фізіологічною функцією даного гена є контроль росту епітелію матки [8].

Нуклеотидна послідовність гена BF у свиней була встановлена Peelman et al. [12]. Повний нуклеотидний склад даного гена приведений у GeneBank під номером AL773527 [17]. Він складається з 18 екзонів і 17 інтронів, має довжину 9096 п.н. і розташований на сьомій хромосомі між 27 941 837 і 29 947 932 п.н. [18].

Для гена BF встановлено наявність точкової мутації (SNP), яка

розташована в інтроні 1 і характеризується С/Т нуклеотидною заміною в 79 позиції (BF_in1_C79T). Вперше цей поліморфізм виявили Jiang та Gibson [9], використовуючи метод ПЛР-ПДРФ. Для виділення ділянки гена довжиною в 390 п.н. вищеназвані автори використовували наступні праймери – forward: 5'-ACT GCT ATG ACG GTT ACA CTC TCC G-3'; reverse: 5'-TCC AAG AGC CAC CTT CCT GG-3'.

Ампліфікована ділянка ДНК в подальшому підлягала розщепленню ендонуклеазою рестрикції SmaI. Сайтом рестрикції для неї є нуклеотидна послідовність CCC↑GGG [16]. У випадку розташування на 79 місці нуклеотида С, рестриктаза SmaI розщеплювала фрагмент на дві частини довжиною 237 і 153 п.н., а у випадку заміни його на Т – в гелі формувалася єдина смуга, довжиною 390 п.н.

Встановлено, що даний маркер значно перекривається з QTL регіоном, відповідальним за відтворювальні якості свиней, особливо, за розмір гнізда [7], швидкість овуляції [15] та вік статевого дозрівання [5]. Тому основним завданням нашої роботи було проведення аналізу генетичної розмаїтості свиней великої білої породи різного походження у відношенні гена BF.

Матеріали та методи. Дослідження було проведено на поголів'ї свиней великої білої породи (усього – 74 особини), які утримуються в сільськогосподарському приватному підприємстві (СГПП) «Техмет-Юг» Жовтневого району Миколаївської області. З них, 15 голів належали до тварин англійської селекції (ВБА), а 59 – до тварин угорської селекції (ВБВ). Матеріалом для дослідження були проби тканини (вушні вищипи) свиней.

Лабораторні дослідження виконувалися в умовах лабораторії молекулярної генетики та цитогенетики тварин Центру біотехнології та молекулярної діагностики Всеросійського інституту тваринництва РАСГН.

Виділення ДНК здійснювали шляхом лізису в буфері Кавасакі [10] та перхлоратним методом з модифікаціями, розробленими у Центрі біотехнології та молекулярної діагностики Всеросійського інституту тваринництва РАСГН [1, 2].

Аналіз поліморфізму генетичного маркера BF (BF_in1_C79T) здійснювали методом ПЛР з наступним гідролізом утворених фрагментів ендонуклеазою рестрикції SmaI [9] (ПЛР-ПДРФ) та їх розділенням методом електрофорезу.

Електрофоретичне розділення проводили при напрузі 120...130В в 2,5...3,0% агарозному гелі в буфері TAE з додаванням бромистого димідію до кінцевої концентрації 30 нг/мл.

Візуалізацію продуктів ПЛР-ПДРФ здійснювали в ультрафіолетовому світлі з використанням транслюмінатора UVT1 Biometra. Документацію результатів проводили за допомогою цифрової відеокамери з використанням програмного забезпечення BioTestD.

Весь статистичний аналіз проведений на підставі загальноприйнятих методик [3] з використанням програми GenAIEx [11].

Результати дослідження. В таблиці 1 наведено частоти генотипів та окремих алелей SNP BF_in 1_C79T, характерних для свиней великої білої породи різного походження в СГПП «Техмет-Юг».

Як бачимо, серед 74 проаналізованих особин не було виявлено жодної

тварини з генотипом СС.

Таблиця 1

Частоти генотипів та окремих алелей гену ВF у свиней великої білої породи різного походження

Походження	n	Частота генотипів			Частота алелей	
		СС	СТ	ТТ	С	Т
ВБА	15	0	6	9	0,200	0,800
ВБВ	59	0	12	47	0,102	0,898

В цілому, частота алелі С серед свиней великої білої породи англійської селекції була майже вдвічі вище, ніж у тварин угорської селекції. Але, оскільки, саме алель Т пов'язана із багатоплідністю свиноматок, то можна відмітити, що тварини угорської селекції більшою мірою відповідають вимогам MAS-селекції.

При цьому, аналіз молекулярної мінливості (AMOVA) не підтвердив вірогідної різниці у відношенні частот генотипів за частотою SNP BF_in 1_C79T серед свиней великої білої породи англійської та угорської селекції ($F_{st} = 0,060$; $p = 0,159$).

В табл. 2 наведено показники фактичної (H_o) та очікуваної (H_e) гетерозиготності за SNP BF_in 1_C79T серед свиней великої білої породи англійської та угорської селекції. Як бачимо, відмічається деяке збільшення частоти гетерозиготних особин як серед тварин англійської, так й угорської селекції, ніж це очікується при генетично-рівноважному стані обох популяцій тварин. Індeksi інбридингу мають негативне значення, але це відхилення не вірогідне (критерій Хі-квадрат; в обох випадках $p > 0,05$).

Таблиця 2

Показники генетичного різноманіття гену ВF у свиней великої білої породи різного походження

Походження	n	H_o	H_e	F_{is}	χ^2
ВБА	15	0,400	0,320	-0,250	0,94
ВБВ	59	0,203	0,183	-0,113	0,76

У 2005 році В. Buske із співавторами [4] привели результати дослідження, які показують наявність зв'язку між поліморфізмом точкової мутації BF_in1_C79T і багатоплідністю свиней. При цьому, алель Т розглядається ними як сприятлива і та, що пов'язана з підвищенням кількості народжених поросят, тоді як алель С, навпаки, обумовлювала зниження багатоплідності.

Однак, Х. Wang із співавторами [14] встановили, що у свиней пекінської чорної породи (Beijing Black Pig) відмічалася тенденція до підвищення багатоплідності (за результатами першого опоросу) у свиноматок з генотипом СС по SNP BF_in1_C79T. Тоді як у більш дорослих свиноматок найвищі показники багатоплідності відзначалися серед гетерозиготних особин (з генотипом СТ).

Наразі, в світі триває вивчення гена ВF свиней. Зокрема, у 2010 році, при прямому секвенуванні ділянки гена ВF свиней довжиною 733 п.н., що містила екзони 15-17, Chen та Liu [6] виявили А/С нуклеотидну заміну в позиції 45 екзона

16 (BF_ex16_A45C).

Висновки.

Частота алелі T, яка, за даними літературних джерел, асоційована із багатоплідністю свиноматок, у свиней великої білої породи, які утримуються в СГПП «Техмет-Юг» Жовтневого району Миколаївської області відносно висока – 0,800...0,899.

Проте, тварини різного походження (англійської та угорської селекції) мають відмінності за даним показником, що дає підставу для проведення селекційних заходів, спрямованих на його підвищення. При цьому, популяції, які вивчалися, характеризуються деяким перевищенням частоти гетерозиготних особин.

У перспективі заплановані подальші дослідження щодо виявлення та аналізу характеру зв'язку між генотипом тварин та показниками їх відтворювальних якостей.

Література

1. Гладырь Е. А. / Е. А. Гладырь, Н. А. Зиновьева, А. Н. Попов, Н. С. Марзанов, Л. К. Эрнст, Г. Брем. Методические рекомендации по определению вариантов каппа-казеина и бета-лактоглобулина крупного рогатого скота методом ПЦР-ПДРФ анализа // Дубровицы, 2001. — 15 с.
2. Зиновьева Н. А. / Н. А. Зиновьева, А. Н. Попов, Л. К. Эрнст, Н. С. Марзанов, В. В. Бочкарев, Н. И. Стрекозов, Г. Брем. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве // Дубровицы, 1998. — 47 с.
3. Ли Ч. Введение в популяционную генетику. — М.:, 1978. — 356 с.
4. Buske B., C. Brunsch, K. Zeller, P. Reinecke & G. Brockmann Analysis of properdin (BF) genotypes associated with litter size in a commercial pig cross population // J. Anim. Breed. Genet. 122 (2005) 259—263.
5. Cassady J.P., Johnson R.K., Pomp D., Rohrer G.A., van Vleck L.D., Spiegel E.K., Gilson K.M. (2001) Identification of quantitative trait loci affecting reproduction in pigs. J. Anim. Sci., 79, 623—633.
6. Chen Yu zhen, Liu Yu. 2010. Polymorphisms of BF Gene in Guizhou White Pigs. China Animal Husbandry and Veterinary, 37, 92—94.
7. de Koning D.J., Rattink A.P., Harlizius B., Groenen M.A.M., Brascamp E.W., van Arendonk J.A.M. (2001) Detection and characterization of quantitative trait loci for growth and reproduction traits in pigs. Livestock Prod. Sci., 72, 185—198.
8. Hasty L.A., Brockman W.W., Lambris J.D., Lyttle C.R. (1993) Hormonal regulation of complement factor B in human endometrium. Am. J. Reprod. Immunol., 30, 63—67.
9. Jiang Z.H., Gibson J.P. (1998) Rapid communication: a PCR-RFLP marker at the porcine complement factor B gene locus shows between-population frequency variation. J. Anim. Sci., 76, 1716—1717.
10. Kawasaki E. S. Sample preparation from blood, cells and other fluids // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications / Eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. — San Diego, 1990. — P. 146—152.

11. Peakall R., Smouse P. GENAIEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. — 2006. — № 6. — P. 288—295.
12. Peelman, L. J., M. Mattheeuws, A. Van Zeveren, A. van de Weghe, and Y. Bouquet. 1996. Conservation of the RD-BF-C2 organization in the pig MHC class-III region: Mapping and cloning of the pig RD gene. *Anim. Genet.* 27 : 35—42.
13. Ponsuksili S., Wimmers K., Yerle M., Schellander K. (2001) Mapping of 93 porcine ESTs preferentially expressed in liver. *Mamm. Genome*, 12, 869—872.
14. Wang X. P., Wang L. X., et al. Analysis of PRLR and BF genotypes associated with litter size in Beijing black pig population // *J. Agricultural Sciences in China*, 2008, 7 (11) : 1374—1378.
15. Wilkie P.J., Paszek A.A., Beattie C.W., Alexander L.J., Wheeler M.B., Schook L.B. (1999) A genomic scan of porcine reproductive traits reveals possible quantitative trait loci (QTLs) for number of corpora lutea. *Mamm. Genome*, 10, 573—578.
16. <http://molbiol.edu.ru/re/SacII.html>
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100124383>
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AL773527>

Summary

Zinov'eva N., Gladyr' O., Lugovyi S., Kostunina O., Domashova L.
GENETIC POLYMORPHISM OF BF GENE (BF_IN1_C79T) IN LARGE WHITE PIGS OF DIFFERENT ORIGIN

The article contains an results of the analysis of Large White pig different origin by BF gene (properdin).. Specific features of polymorphism of this gene in pigs of English and Hungarian breeding are identified.

Key words: BF gene (properdin), polymorphism, pigs, Large White breed

Рецензент – д.с.-г.н., проф. Щербатий З.Є.