

E. Freeman // Holstein world. – 1984. – Vol.81, № 12. – P. 64, 66, 70.

15. Haqeman, W. H. Reproductive performance in genetic lines selected for high or average milk yield / W. H. Haqeman, G. E. Shook, W. I. Tyler // Journal of Pairij Science. – 1991. – S. 4366-4376.

(поступила 14.03.2016 г.)

УДК 636.52/.58:575.113/118

Р.А. КУЛИБАБА

АНАЛИЗ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИИ G2032A MX ГЕНА В ПОПУЛЯЦИЯХ КУР РАЗЛИЧНЫХ ПОРОД УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Институт животноводства Национальной академии аграрных наук
Украины

Проведён анализ встречаемости мутации G2032A MX гена в популяциях кур пород плимутрок белый (линия Г-2), Род-айленд красный (линия 38), полтавская глинистая (линия 14) и борковская барвистая (линия А). Показано, что Мх ген является полиморфным во всех изученных популяциях кур. Частоты аллелей А и G в линии Г-2 составили 0,21 и 0,79, в линии 38 – 0,125 и 0,875, в линии 14 – 0,14 и 0,86, в линии А – 0,375 и 0,625 соответственно.

Ключевые слова: полиморфизм, популяция, полимеразная цепная реакция, рестрикция, аллель, куры.

R.A. KULIBABA

ANALYSIS OF OCCURRENCE OF G2032A MUTATION IN THE MX GENE IN POPULATIONS OF DIFFERENT CHICKENS OF UKRAINIAN SELECTION BREEDS

Institute of Animal Science of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

The analysis of the occurrence of G2032A mutation in the MX gene in populations of White Plymouth Breed of chicken (line G-2), Rhode Island Red (line 38), Poltava Clay (line 14) and Borkovskaya Barvistaya (line A) was studied. It is shown that the MX gene was polymorphic in all studied chicken populations. Frequencies of alleles A and G in the line G-2 were 0.21 and 0.79; line 38 – 0.125 and 0.875; line 14 – 0.14 and 0.86; line A – 0.375 and 0.625 respectively.

Key words: polymorphism, population, polymerase chain reaction, restriction, allele, chicken.

Введение. На современном этапе развития птицеводства к одной из наиболее актуальных проблем относится генетическая резистентность к заболеваниям. Развитие современных молекулярно-генетических технологий позволило оценивать генетическую структуру линий и пород пти-

цы непосредственно на уровне ДНК, что, в свою очередь, привело к интенсификации селекционной работы в целом [1]. Особенно актуально использование методов маркер-ассоциированной селекции в решении вопросов, связанных с генетической устойчивостью к вирусным заболеваниям птицы. К одному из самых перспективных объектов в данном направлении относится белок Mx [2, 3].

Белок Mx является одним из ключевых компонентов, участвующих в ингибировании репликации РНК-содержащих вирусов. Относится к интерферон-индуцируемыми белкам (экспрессия индуцируется интерфероном I) [4]. Белок Mx специфичен к РНК-содержащим вирусам, к наиболее известным и имеющим особенное значение для птицеводства, к представителям которых относятся вирусы гриппа и болезни Ньюкасла [5].

Существуют различные полиморфные варианты белка Mx, некоторые из которых имеют приоритетное значение. Так, например, показано, что наличие серина (S) в положении 631 белка Mx (Ser631) приводит к угнетению противовирусной активности, в то время как наличие аспарагина (N, Asp631) коррелирует с выраженной противовирусной активностью [3]. Выяснено, что вышеописанная мутация (S631N) в белке Mx непосредственно вызвана транзицией гуанина в аденин в положении 2032 (G2032A) Mx гена. Как показали результаты исследований, данная транзигция расположена в сайте рестрикции для RsaI, что дало возможность разработать достаточно простой и удобный метод её определения [6].

Mx-ген содержит в своем составе 13 экзонов и 12 интронов. Кодировать белок размером 705 аминокислот. Структура белка достаточно консервативна у позвоночных. У кур белок Mx расположен преимущественно в цитоплазме. Именно непосредственное взаимодействие молекулы с компонентами инфекционного агента и лежит в основе противовирусной активности протеина [7].

В связи с высоким приоритетом исследований в области генетической резистентности к вирусным заболеваниям, в первую очередь к вирусу гриппа, в различных странах проведены исследования по мониторингу мутации S631N в разных породах кур – от коммерческих высокопродуктивных линий до нативных популяций [8, 9, 10]. Показана высокая вариабельность Mx гена по данной мутации в популяциях кур различных пород разных направлений продуктивности [5, 11]. Определение частоты встречаемости мутации S631N даёт возможность проведения направленной селекционной работы с целью получения потомства с желательными генотипами, изучения связи аллелей Asp631 и Ser631 с показателями продуктивности и, непосредственно, резистентности к заболеваниям. Подобные работы проводятся и на других видах птицы,

что дополнительно подчёркивает актуальность данной работы [7, 12].

Таким образом, учитывая все вышеизложенное, цель наших исследований – анализ встречаемости мутации G2032A Mx гена в популяциях кур украинской селекции.

Материал и методика исследований. Исследования проводили в лаборатории профилактики заболеваний птицы и молекулярной диагностики Государственной опытной станции птицеводства Национальной академии аграрных наук Украины.

Для проведения исследований была использована птица украинской селекции – куры яичного направления продуктивности, линия А, породы борковская барвистая; яично-мясного направления продуктивности – линия 14 породы полтавская глинистая и линия 38 породы Род-айленд красный; мясо-яичного направления продуктивности – линия Г-2 породы плимутрок белый. Кур содержали в виварии лаборатории и на экспериментальной ферме «Сохранение государственного генофонда птицы» Государственной опытной станции птицеводства НААН. В качестве источника ДНК использовали кровь птицы.

Кровь отбирали из гребня с помощью скарификатора на стерильную фильтровальную бумагу. Каждый образец подсушивали, маркировали и индивидуально упаковывали для предотвращения контаминации. Выделение ДНК из опытных образцов проводили с использованием коммерческого набора реагентов «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», Россия). Эффективность выделения ДНК определяли с помощью электрофореза в 0,7%-ном агарозном геле при 200 V в течение 5 мин.

Для проведения амплификации использовали следующие праймеры:

Forward 5'-CCTTCAGCCTGTTTTCTCCTTTAGGAA-3';

Reverse 5'-CAGAGGAATCTGATTGCTCAGGCGTGTA-3' [9].

ПЦР проводили с помощью реагентов DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific) с использованием программируемого термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по соответствующей программе: 1 цикл – денатурация 94 °С 5 мин; 35 циклов – денатурация 94 °С 45 сек, отжиг – 60 °С 45 сек, элонгация – 72 °С 60 сек; 1 цикл – финальная элонгация – 72 °С 10 мин. Объём реакционной смеси составил 20 µL, концентрация праймеров – 0,2 µM соответственно.

Обработку амплифицированных фрагментов эндонуклеазой рестрикции проводили согласно прилагаемой инструкции (FastDigest, Thermo Scientific). Продукты рестрикции разделяли в 3%-ном агарозном геле при напряжении 150 V в течение 40 мин или в 6%-ном полиакриламидном геле при напряжении 300 V в течение 180 мин. Визуализацию проводили с использованием бромистого этидия в ультрафиолетовом спектре. Размер рестрикционных фрагментов определяли с использованием маркера молекулярных масс М-50.

Генотипирование особей проводили посредством сопоставления длин рестриционных фрагментов на электрофореграммах. Генотип А/А (Asn631/Asn631) представлен на электрофореграмме в виде фрагмента размером 100 п.н., G/G (Ser631/Ser631) – 73 и 27 п.н., А/Г (Asn631/Ser631) – 100, 73 и 27 п.н.

На основе полученных данных рассчитывали фактическое (О) и теоретическое (Е) распределение генотипов, частоты аллелей, соответствие генетическому равновесию популяции по Харди-Вайнбергу методом χ^2 , фактическую (Ho) и теоретическую (He) гетерозиготность, эффективное число аллелей (ne), индекс фиксации Райта (Fis) согласно общепринятым методикам [13, 14].

Результаты эксперимента и их обсуждение. В результате исследований выявлен полиморфизм Mx гена во всех опытных популяциях кур. Электрофореграмма продуктов рестрикции представлена на рисунке 1.

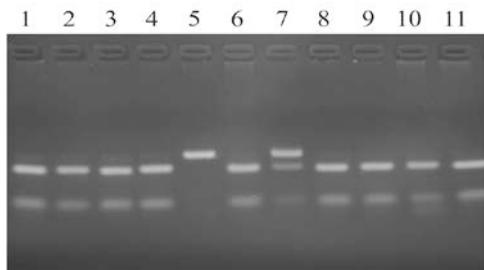


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов рестрикции фрагмента Mx гена. 1-4, 6, 8-11 – генотип G/G; 5 – А/А; 7 – А/Г

В каждой из изученных популяций найдены особи всех возможных по данному полиморфизму генотипов (А/А, А/Г и G/G).

Следует отметить, что в различных публикациях RsaI-полиморфизм Mx гена определяют с использованием электрофореза в полиакриламидном геле, что связано, в первую очередь, с размерами рестриционных фрагментов (100, 73 и 27 п.н.) [7, 9].

Однако некоторые авторы работают и с агарозным гелем, использование которого даёт целый ряд преимуществ (длительность электрофореза, простоту проведения и т. д.) [11]. В результате проведённых нами исследований показано, что использование 3%-ного агарозного геля вполне достаточно для эффективного генотипирования и позволяет с высокой степенью точности определить на электрофореграмме все рестриционные фрагменты. Использование гелей более низких концентраций приводит к ухудшению качества визуализации фрагментов и к появлению возможных ошибок в генотипировании вследствие ухудшения степени расхождения фрагментов.

Несмотря на наличие особей всех возможных генотипов генетическая структура изученных популяций весьма различна (таблица 1).

Таблица 1 – Генетическая структура опытных популяций кур по RsaI-полиморфизму Mx гена (популяции 2014 и 2015 годов)

Порода кур	Генотипы			Аллели		χ^2
	AA	AG	GG	A	G	
Плимутрок белый	0,06	0,29	0,65	0,21	0,79	1,21
Род-айленд красный	0,01	0,23	0,76	0,125	0,875	0,26
Полтавская глинистая	0,04	0,20	0,76	0,14	0,86	2,87
Борковская барвистая	0,15	0,45	0,40	0,375	0,625	0,16

Наибольшее количество особей с генотипом AA (резистентный генотип) обнаружено в популяции яичных кур породы борковская барвистая, наименьшее – Род-айленд красный. При этом наибольшее количество особей с генотипом GG (чувствительный генотип) – в популяциях кур яично-мясного направления продуктивности.

Анализ наблюдаемых и ожидаемых распределений генотипов выявил отсутствие отклонения от состояния генетического равновесия в каждой из изученных популяций, что свидетельствует об отсутствии давления отбора по данному локусу.

Индекс фиксации Райта в линиях Г-2, 14 и А был положительным и составил 0,13; 0,17 и 0,04 соответственно. Достаточно большое значение индекса фиксации в популяции кур породы полтавская глинистая указывает на выраженный эксцесс гомозигот. В свою очередь, в линии 38 наблюдался незначительный эксцесс гетерозигот (-0,05). Наибольшее значение эффективного числа аллелей (1,87), что указывает на наибольший уровень полиморфизма в изученном локусе, наблюдался в популяции кур линии А, наименьший (1,28) – в линии 38. Популяции кур линий Г-2 и 14 занимают промежуточное положение (1,49 и 1,32 соответственно).

В сравнительном аспекте с исследованиями 2013 года [15] по изучению генетической структуры популяций кур пород Род-айленд красный и полтавская глинистая можно отметить, что изученные популяции достаточно стабильны по частотному соотношению аллелей и генотипов между генерациями (рисунок 2).

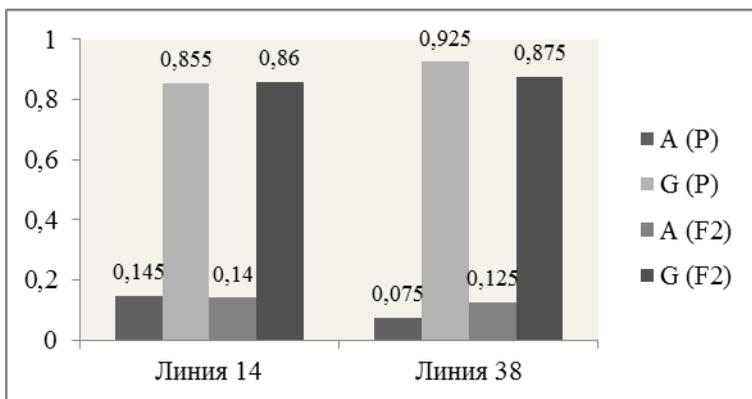


Рисунок 2 – Соотношение частот аллелей в различных генерациях кур пород полтавская глинистая (линия 14) и Род-айленд красный (линия 38)

Полученные данные полностью вписываются в следствие об отсутствии изменений в частотах аллелей в условиях генетического равновесия (популяции 2013 года также находились в равновесном состоянии).

С учётом проведённого сравнительного анализа можно сделать вывод о достаточно стабильной генетико-популяционной структуре опытных линий. Селекционная работа, проводимая с данными породами, основана на оценке особей по фенотипу и, тем самым, вследствие данного ограничения, не приводит к изменению аллельных частот по изученному локусу, что, в свою очередь, указывает на перспективность и целесообразность проведения исследований в области маркер-ассоциированной селекции.

Заключение. Таким образом, в результате проведённых исследований показано, что Mx ген является полиморфным (RsaI-полиморфизм в 13 экзоне) во всех изученных популяциях кур разных направлений продуктивности. Наибольший уровень полиморфизма (по показателю эффективного числа аллелей) определён в линии А. При этом наивысшая частота встречаемости резистентного аллеля А наблюдалась в популяции яичных кур породы борковская барвистая, наименьшая – в популяциях яично-мясных кур пород Род-айленд красный и полтавская глинистая. По распределению частот аллелей и генотипов линии 14 и 38 демонстрируют стабильную генетико-популяционную структуру на протяжении нескольких генераций.

Література

1. Khlestkina, E. K. Molecular markers in genetic studies and breeding / E. K. Khlestkina // *Russ J. Genetics.* – 2014. – Vol. 4(3). – P. 236-244.
2. Association of Mx1 Asn631 variant alleles with reductions in morbidity, early mortality, viral shedding, and cytokine responses in chickens infected with a highly pathogenic avian influenza virus / S. J. Ewald [et al.] // *Immunogenetics.* – 2011. – Vol. 63. – P. 363-375.
3. Associations of chicken Mx1 polymorphism with antiviral responses in avian influenza virus infected embryos and broilers / Y. Wang [et al.] // *Poultry science.* – 2012. – Vol. 91. – P. 3019-3024.
4. Both antiviral activity and intracellular localization of chicken Mx protein depend on a polymorphism at amino acid position 631 / K. Sasaki [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications.* – 2013. – Vol. 430. – P. 161-166.
5. Association of Mx gene genotype with antiviral and production traits in Tolaki chicken / M. Pagala [et al.] // *International journal of poultry science.* – 2013. – Vol. 12(12). – P. 735-739.
6. PCR-RFLP genotyping protocol for chicken Mx gene G/A polymorphism associated with the S631N mutation / L. Sironi [et al.] // *Genetics and molecular research.* – 2010. – Vol. 9(2). – P. 1104-1108.
7. Identification of gene resistance to avian influenza virus (Mx Gene) among wild waterbirds / D. Elfidasari [et al.] // *Makara journal of science.* – 2013. – Vol. 17/1. – P. 6-10.
8. Watanabe, T. Polymorphisms of the chicken antiviral MX gene / T. Watanabe // *Cytogenet genome res.* – 2007. – Vol. 117. – P. 370-375.
9. Analysis on the polymorphism and the genetic effects on some economic traits of mx gene S631N mutation site in chicken / D. Q. Luan [et al.] // *Thai J. Vet. Med.* – 2010. – Vol. 40(3). – P. 303-310.
10. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene / J. Ko [et al.] // *Genome research.* – 2002. – Vol. 12(4). – P. 595-601.
11. Sartika, T. Selection of mx gene genotype as genetic marker for avian influenza resistance in Indonesian native chicken / T. Sartika, S. Sulandari, M. Zein // *BMC Proceedings.* – 2011. – Vol. 5(4). – P. 37.
12. Misrianti, R. Identification of Mx Gene Polymorphism in Indragiri Hulu duck by PCR-RFLP / R. Misrianti // *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering.* – 2015. – Vol. 2(12). – P. 792.
13. Меркурьєва, Е. К. Генетические основы селекции в скотоводстве : учеб. пособие/ Е. К. Меркурьєва. – М., 1977. – 240 с.
14. Nei, M. Estimation of fixation indices and gene diversities / M. Nei, R. K. Chesser // *Ann. Hum. Genet.* – 1983. – Vol. 47. – P. 253-259.
15. Кулібаба, Р. О. Генетична структура курей з різною чутливістю до хвороби Ма-река за локусом Mx-гену / Р. О. Кулібаба, Г. В. Білецька, Т. Е. Ткачик // *Птахівництво : міжвід. тем. наук. зб.* – Харків, 2013. – Вип. 69. – С. 167-173.

(поступила 15.03.2016 г.)