

УДК: 577.218+636.082.4:636.4

ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ, АСОЦІЙОВАНИХ З РЕПРОДУКТИВНОЮ ЗДАТНІСТЮ СВИНОМАТОК УКРАЇНСЬКОЇ М'ЯСНОЇ ТА УЕЛЬСЬКОЇ ПОРІД

М.В. Драгулян, науковий співробітник

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

С.О. Костенко, кандидат біологічних наук, доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування України

О.В. Сидоренко, кандидат сільськогосподарських наук

Інститут розведення та генетики тварин НААН України

Досліджено генотипи генів: ESR (рецептора естрогена), NCOA1 (коактиватора A1 ядерних рецепторів), PRLR (рецептора пролактину), FSHR (рецептора фолікулостимулюючого гормону) свиноматок уельської і української м'ясної порід. Виявлено, що у свиноматок уельської породи частота алеля В гена ESR становить 0,40, у української м'ясної - 0,48. Свиноматки уельської породи характеризувались нижчою частотою генотипу BB гена ESR порівняно зі свиноматками української м'ясної породи (відповідно 0,02 та 0,10). Дослідження частот генотипів та алелів гена NCOA1 у свиней української м'ясної та уельської порід виявили досить високі частоти бажаного з точки зору підвищення багатоплідності алеля A1 (відповідно 0,62 та 0,66). Генотип A1A1 у свиноматок української м'ясної породи зустрічався на 9% рідше, ніж у свиноматок уельської породи ($p < 0,001$). Частота алеля А гена PRLR у свиноматок уельської породи - 0,53, української м'ясної - 0,58, а генотипу AA відповідно 0,34 та 0,52. Породи свиней за геном FSHR виявились поліморфними. Розподіл частот бажаного алеля С гена FSHR у свиней української м'ясної та уельської порід був майже однаковим (відповідно 0,75 та 0,73). Частоти генотипу CC гена FSHR у свиноматок уельської породи становили 0,57, української м'ясної - 0,56. Фактичні частоти генотипів статистично вірогідно відрізнялися від теоретично очікуваних.

Ключові слова: генетичні маркери, репродуктивні якості, свиня свійська, ген рецептора естрогена, ген рецептора пролактину, ген коактиватора A1 ядерних рецепторів, ген фолікулостимулюючого гормону, *ESR*, *NCOA1*, *PRLR*, *FSHR*, свиноматка, українська м'ясна порода, уельська порода.

Вивчення популяційно-генетичної структури порід свиней м'ясного напрямку продуктивності за молекулярно-генетичними маркерами залишається одним із головних програм на Україні [2]. Аналіз поліморфізму генів, що асоційовані з господарсько-корисними ознаками свиней надає значну частину інформації, не тільки про стан генофонду, але й про видо- та породоспецифічні особливості генетичних структур тварин. Проведення аналізу молекулярно-генетичної структури порід за генами, що асоційовані з відтворною здатністю свиноматок може дати інформацію не лише про генетичну мінливість, але й про причини, що її зумовлюють.

Найчастіше використовують гени-маркери, що впливають на багатоплідність: ген (*ESR*) естрогенового рецептора, який стимулює розвиток вторинних статевих ознак [9, 10]; ген (*NCOA1*) коактиватор A1 ядерних рецепторів, що взаємодіє з рецептором естрогена та стимулює його транскрипційну активність [6]; ген (*PRLR*) рецептора пролактину, що стимулює лактацію свиноматок [3]; ген (*FSHR*) рецептора фолікулостимулюючого гормону, що регулює ріст та дозрівання фолікулів [8]. На цьому етапі розвитку генетики недостатньо вивчені біологічні відмінності уельської породи та української м'ясної, створеної відтворним схрещуванням великої білої, миргородської, ландрас, уельської, п'єтрен, уессекс-сеудлбекської та української степової білої порід. Застосування цих маркерних генів на практиці дозволить вивчити біологічний та генетичний потенціал порід свиней.

Мета дослідження – вивчити внутрішньопородні особливості поліморфізму генів: *ESR* (рецептора естрогена), *NCOA1* (коактиватору A1 ядерних рецепторів), *PRLR* (рецептора пролактину), *FSHR* (рецептора фолікулостимулюючого гормону).

Матеріал і методика досліджень. Експериментальне дослідження виконували у відділі генетики Інституту розведення і генетики тварин НААН України та на кафедрі генетики, розведення та репродуктивної біотехнології тварин імені М.А. Кравченка НУБіП України. Загальний обсяг проведених досліджень наведено у табл. 1.

1. Матеріал досліджень

Порода	Досліджено свиноматок, гол.
Ген рецептора естрогена (<i>ESR</i>)	
Уельська порода	123
Українська м'ясна порода	73
Коактиватор A1 ядерних рецепторів (<i>NCOA1</i>)	
Уельська порода	123
Українська м'ясна порода	74
Ген рецептора гормону пролактину (<i>PRLR</i>)	
Уельська порода	120
Українська м'ясна порода	73
Фолікулостимулюючий гормон (<i>FSHR</i>)	
Уельська порода	125
Українська м'ясна порода	72

Досліджували біологічний матеріал племінного поголів'я свиноматок української м'ясної та уельської порід, вирощуваного в ДП ДГ «Гонтарівка» Вовчанського району, Харківської обл. Геномну ДНК виділяли із волосяних фолікулів за допомогою реактивів «ДНК-сорб В» за рекомендаціями виробника. Дослідження поліморфізму генів *ESR*, *NCOA1*, *PRLR*, проводили методом ПЛР – ПДРФ. Поліморфізм гена *FSHR* вивчали методом Bi-Passa (без рестрикції). Для ампліфікації генів використовували праймери, показані в табл. 2.

Оптимізовані параметри проведення рестрикційних ділянок генів *ESR*, *NCOA1*, *PRLR* з використанням ендонуклеаз – PvuII, RsaI, AluI. Візуалізацію

довжин рестрикційних фрагментів здійснювали методом електрофорезу в 2%-ному агарозному гелі.

2. Послідовності праймерів

Локуси	Послідовність		Автор
<i>FSHR</i>	F	GCA ACA AAT CTA TTT TAA GGC AAG A	8
	R	GAT GCT CAC CTT CAT GTA GCT G	
<i>NCOA1</i>	F	AGG GGC TAC CCT CCT GTA AG	12
	R	CTT CTC TGC CAG TTC TCC AGT C	
<i>ESR</i>	F	CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG	11
	R	CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG	
<i>PRLR</i>	F	CGT GGC TCC GTT TGA AGA ACC	7
	R	CTG AAA GGA GTG CAT AAA GCC	

Статистичну обробку даних проводили за стандартними методиками з використанням Excel 2003.

Результати та їх обговорення. В результаті молекулярно-генетичного тестування свиноматок української м'ясної та уельської порід було виявлено поліморфізм генів *ESR*, *NCOA1*, *PRLR*, *FSHR*.

Свиноматки уельської породи характеризувались нижчою частотою генотипу *BB* гена *ESR* порівняно із свиноматками української м'ясної породи. Частота бажаного алеля *B* гена *ESR* у свиноматок уельської породи становила $0,40 \pm 0,021$, що на 0,08 менше, ніж у свиноматок української м'ясної породи ($p < 0,001$, табл.3). Обидві породи характеризувались нижчою частотою бажаного алеля *B* та генотипу *BB* гена *ESR* порівняно із літературними даними поліморфізму свиней м'ясного напрямку продуктивності [4, 13, 14].

3. Частоти алелів та генотипів гена *ESR* у свиней української м'ясної та уельської порід

Порода	Кількість голів	Частота								χ^2
		генотип						алель		
		<i>BB</i>		<i>AB</i>		<i>AA</i>		<i>B</i>	<i>A</i>	
Уельська	123	Ф	0,02± 0,019 ***	Ф	0,76± 0,059	Ф	0,22± 0,057	0,40± 0,021 ***	0,60± 0,026	28,02
		О	0,160± 0,051	О	0,480± 0,069	О	0,360± 0,067			
Українська м'ясна	73	Ф	0,10± 0,047	Ф	0,75± 0,068	Ф	0,15± 0,056	0,48± 0,028	0,52± 0,027	18,15
		О	0,230± 0,067	О	0,499± 0,079	О	0,270± 0,070			

Примітка. Бажаний алель виділено жирним шрифтом;

*** $p < 0,01$ порівняно з свиноматками уельської породи.

Аналіз важливих показників генетичної мінливості, розрахований на основі розподілу відповідних генотипів виявив надлишок гетерозигот. Останній був близьким за значенням в обох досліджених породах, що свідчить про їх генетичну консолідацію за геном *ESR* (рис.1).

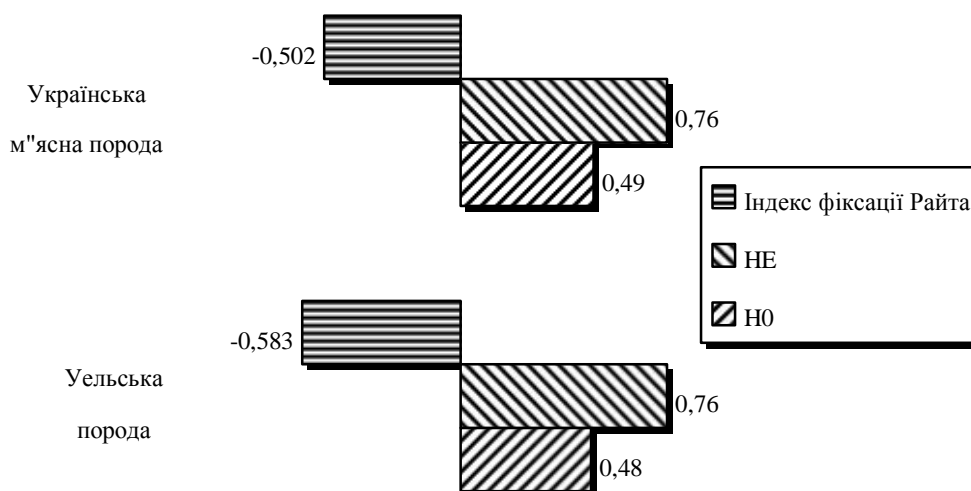


Рис.1 Гетерозиготність свиноматок уельської та української м'ясної порід за геном *ESR*

Дослідженням частот генотипів і алелів гена *NCOA1* у свиней української м'ясної й уельської порід виявлено досить високі частоти, як бажаного з точки зору підвищення багатоплідності генотипу *A1A1*, так й бажаного алеля *A1*. Генотип *A1A1* у свиноматок української м'ясної породи зустрічався на 9% рідше, ніж у свиноматок уельської породи ($p < 0,001$) (табл.4). Треба відзначити, що у досліджених порід порівняно із результатами інших дослідників нами виявлено найбільшу частоту генотипу *A2A2*, [1, 12].

4. Частоти алелів та генотипів гена *NCOA1* у свиней української м'ясної та уельської порід

Порода	К-ть, голів	Частота								χ^2
		генотип						алель		
		<i>A1A1</i>		<i>A1A2</i>		<i>A2A2</i>		<i>A1</i>	<i>A2</i>	
Уельська	123	Ф	0,57± 0,069 ***	Ф	0,20± 0,065	Ф	0,23± 0,058	0,66± 0,020	0,34± 0,027	35,99
		О	0,44± 0,069	О	0,45± 0,069	О	0,12± 0,043			
Українська м'ясна	74	Ф	0,46± 0,079	Ф	0,36± 0,076	Ф	0,18± 0,062	0,62± 0,020	0,38± 0,030	3,69
		О	0,38± 0,079	О	0,47± 0,078	О	0,14± 0,052			

Примітка. Бажаний алель виділено жирним шрифтом;

*** $p < 0,01$ порівняно з свиноматками уельської породи.

Аналіз відповідності отриманих нами частот з розподілом згідно із законом Харді-Вайнберга свідчить про те, що свиноматки уельської породи мають достовірно вищу частоту гетерозигот (рис.2).

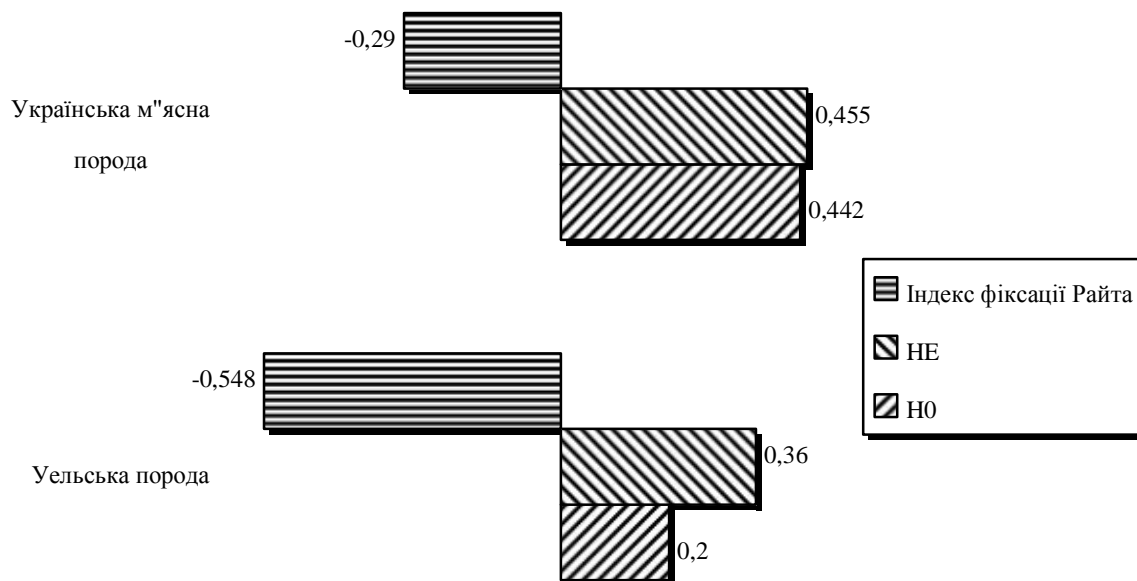


Рис.2 Гетерозиготність свиноматок уельської та української м'ясної породи гена *NCOA1*

Виявлені високі частоти генотипу *AA* у свиней української м'ясної породи, у той час як у свиноматок уельської породи частота генотипу *AA* становила $0,34 \pm 0,043$ (табл.5).

5. Розподіл частот генотипів гена *PRLR* у свиней української м'ясної і уельської порід

Порода	Кількість голів	Частота							χ^2	
		генотип			алель					
		<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>A</i>	<i>B</i>				
Уельська	120	Ф	$0,34 \pm 0,043$ ***	Ф	$0,38 \pm 0,044$	Ф	$0,28 \pm 0,041$	$0,53 \pm 0,016$	$0,47 \pm 0,017$	26,71
		О	$0,28 \pm 0,041$	О	$0,22 \pm 0,038$	О	$0,50 \pm 0,046$			
Українська м'ясна	73	Ф	$0,52 \pm 0,058$	Ф	$0,13 \pm 0,039$	Ф	$0,35 \pm 0,056$	$0,58 \pm 0,019$	$0,42 \pm 0,022$	11,03
		О	$0,33 \pm 0,055$	О	$0,18 \pm 0,045$	О	$0,49 \pm 0,059$			

Примітка. Бажаний алель виділено жирним шрифтом;

*** $p < 0,01$ порівняно з свиноматками уельської породи.

Аналіз показників генетичної мінливості, розрахований на основі розподілу відповідних генотипів, не виявив надлишку гетерозигот (рис.3).

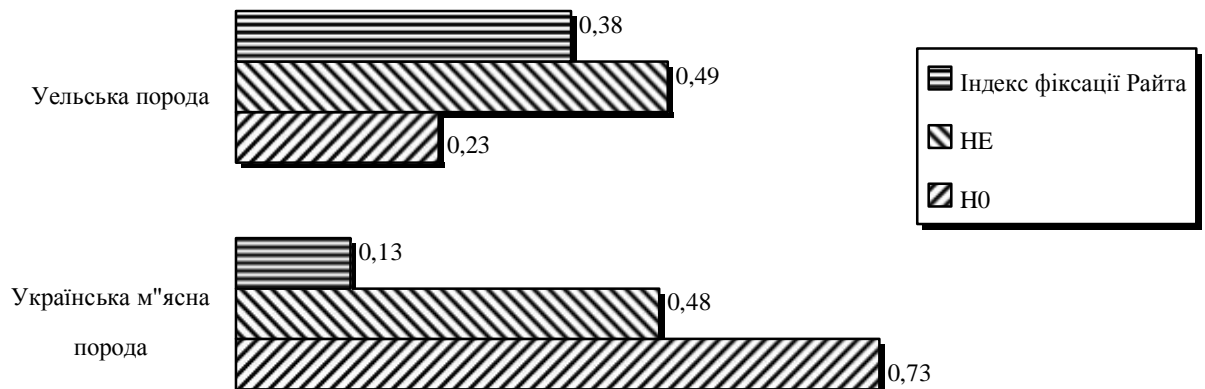


Рис.3 Гетерозиготність свиноматок уельської та української м'ясної породи гена *PRLR*

Породи свиней виявились поліморфними за геном *FSHR*. Розподіл частот алелів та генотипів гена *FSHR* у свиней української м'ясної та уельської порід мав майже однакові значення (табл.6). Аналіз даних зарубіжних дослідників щодо дії алелів гена *FSHR* на багатоплідність свиноматок свідчить, що вона проявляється по різному в оточенні алелів, характерних для порід [4].

6. Розподіл частот генотипів гена *FSHR* у свиней української м'ясної та уельської порід

Порода	Кількість голів	Частота								χ^2
		генотип						алель		
		<i>CC</i>		<i>CT</i>		<i>TT</i>		<i>C</i>	<i>T</i>	
Уельська	120	Ф	0,57± 0,069	Ф	0,33± 0,065	Ф	0,10± 0,042	0,75± 0,015	0,25± 0,026	70,03
		О	0,563± 0,069	О	0,375± 0,067	О	0,063± 0,034			
Українська м'ясна	73	Ф	0,56± 0,069	Ф	0,34± 0,065	Ф	0,10± 0,042	0,73± 0,018	0,27± 0,030	47,98
		О	0,533± 0,078	О	0,394± 0,047	О	0,073± 0,075			

Примітка. Бажаний алель виділено жирним шрифтом

Дослідженні нами популяції характеризувались високою фактичною гетерозиготністю за геном *FSHR* порівняно з очікуваною. Це підтверджує розрахований індекс фіксації Райта. Середні значення *Fis* у обох породах було однаковим ($\sim -0,13$) (рис.4).

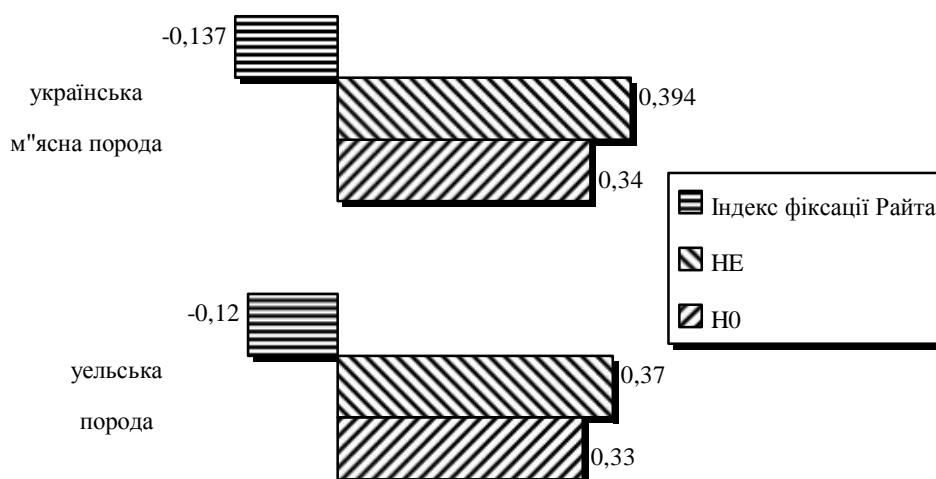


Рис.4 Гетерозиготність свиноматок уельської та української м'ясної породи за геном *FSHR*

Отримані сумарні дані за чотирма генами породної належності свідчать про незначні породоспецифічні особливості генетичної структури досліджених порід м'ясного напрямку продуктивності.

ВИСНОВКИ

З'ясовано, що породи за генами *ESR*, *NCOA1*, *PRLR*, *FSHR* були поліморфними. Частота бажаного алеля *B* гена *ESR* у свиноматок української м'ясної породи становила 0,48, а уельської – 0,38, генотипу *BB* – $0,09 \pm 0,026$ та $0,09 \pm 0,023$, а бажаного алеля *A1* гена *NCOA1* відповідно 0,65 і 0,67, генотипу *A1A1* – $0,46 \pm 0,079$ і $0,57 \pm 0,069$, бажаного алеля *A* та генотипу *AA* гена *PRLR* – 0,47 і 0,42, а частота генотипу *AA* – $0,28 \pm 0,041$ і $0,35 \pm 0,056$, бажаного алеля *C* гена *FSHR* відповідно 0,73 і 0,75, генотипу *CC* – $0,56 \pm 0,069$ та $0,57 \pm 0,069$.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Адаменко В. А. Роль комплекса полиморфных маркеров в характеристике генетического потенциала свиней: автореф. дис. На соискание научной степени канд. биол. наук: спец. 03.02.21 – «Биотехнология» / В.А.Адаменко. — М., 2005. — 24 с.
2. Інститут тваринництва Української академії аграрних наук (УААН) м. Харкова [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.animal.kharkov.ua/index.htm>
3. Епишко О.А. Гены, детерминирующие воспроизводительную функцию свиноматок / О.А. Епишко // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі – 2008. – № 2. – С. 81 – 85.
4. Епишко О.А. Полигенный характер детерминации репродуктивных признаков свиней мясной породы / О.А. Епишко, Т.И. Епишко, Л.А. Калашникова // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2009. – № 2. – С. 42 – 44.

5. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / [Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А., Эрнст Л.К., Брем Г.] – М.: ВИЖ, 2002. – 112 с.

6. Костюнина О.В. Полиморфизм гена *NCOA1* у свиней различных пород / О.В. Костюнина, Н.А. Зиновьева // Международная школа-конференция молодых ученых «Биотехнология будущего». В рамках Международного Симпозиума «ЕС-Россия: перспективы сотрудничества в области биотехнологии в 7-ой Рамочной Программе». — М.: Авиаиздат, 2006. — С. 41–43.

7. Drogemuller C. Candidate gene markers for litter size in different German pig lines / C. Drogemuller, H. Hamann, O. Dist // J. Anim. Sci. — 2001. — № 79. — P. 2565–2570.

8. A missense mutation in the follicle stimulating hormone receptor (*FSHR*) gene shows different allele effects on litter size in Chinese Erhualian and German Landrace pigs / Z. Jiang, O. J. Rottmann, O. Krebs [et all] // Anim. Breed. Genet. — 2002. — № 119. — P. 335–341.

9. Kaminski S. Short communication Relation between *Ava I* polymorphism within the estrogen receptor gene (*ESR*) and meatiness in Polish Large White boars / Stanislaw Kaminski, Anna Ruoe, Pawel Brym // J. Appl. Genet. — 2003. — Vol. 44, №4. — P. 521–524.

10. Downregulation of estrogen receptor alpha and beta expression in carcinogen-induced mammary gland tumors of rats / Jin Seok Kang, Na Jin Jung, Seyl Kim [et all] // Exp Oncol. — 2004. — Vol. 26., № 1. — P. 31–35.

11. Kmieć M. Study on a relation between estrogen receptor (*ESR*) gene polymorphism and some pig reproduction performance characters in Polish Landrace breed / M. Kmieć, J. Dvořák, I. Vrtková // Czech J. Anim. Sci., 2002. — Vol. 47, № 5. — P. 189–193.

12. A meishan positive QTL for prolificacy trails found at the *NCOA1* locus on SSC3 / [Melville J.S., Gibbins1 A.M. V., Robinson1 J. A.B., Gibson J.P. at al.] //

7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 19–23. — 2002. — P. 15–30.

13. Estrogen receptor polymorphism in Landrace pigs and its association with litter size performance / J. L. Nogueraa, L. Varonaa, L. Gomez-Rayaa [et all] // Livestock Production Science. — 2003. — № 82. — P. 53–59.

14. Simultaneous Detection of Malignant Hyperthermia and Genetic Predisposition for Improved Litter Size in Pigs by Multiplex PCR-RFLP / R. Omelka, D. Vašieek, M. Martiniakova, [et all] // Folia biologica (Krakow). — 2004. — Vol. 52, №1-2. — P. 214-220.

**ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С
РЕПРОДУКТИВНОЙ СПОСОБНОСТЬЮ СВИНОМАТОК
УКРАИНСКИЙ МЯСНОЙ И УЭЛЬСКОГО ПОРОД
М.В. Драгулян, С.А. Костенко, О.В. Сидоренко**

Исследованы генотипы генов: ESR (рецептор эстрогена), NCOA1 (коактиватор A1 ядерных рецепторов), PRLR (рецептор пролактина), FSHR (рецептор ФСТ) свиноматок уэльской и украинской мясной пород. Выявлено, что частота аллеля В гена ESR у свиноматок уэльской породы составляет 0,40, у украинской мясной – 0,48. Свиноматки уэльской породы характеризовались низкой частотой генотипа ВВ гена ESR по сравнению со свиноматками украинской мясной породы соответственно 0,02 и 0,10. Исследование частот генотипов и аллелей гена NCOA1 у свиной украинской мясной и уэльской пород обнаружили довольно высокие частоты желаемого с точки зрения повышения многоплодия аллеля A1 (0,62 и 0,66). Генотип A1A1 у свиноматок украинской мясной породы встречался на 9% реже, чем у свиноматок уэльской породы ($p < 0,001$). Частота аллеля А гена PRLR у свиноматок уэльской породы была 0,53, украинской мясной - 0,58, а генотипа AA соответственно 0,34 и 0,52. Породы свиной оказались полиморфными по

гена *FSHR*. Распределение частот желаемого алеля *C* гена *FSHR* у свиной украинской мясной и уэльской пород было почти одинаковым (0,75 и 0,73). Частоты генотипа *CC* гена *FSHR* у свиноматок уэльской породы - 0,57, украинской мясной - 0,56. Фактические частоты генотипов статистически достоверно отличались от теоретически ожидаемых.

Ключевые слова: генетические маркеры, свинья домашняя, украинская мясная порода, уэльская порода ген рецептора эстрогена, ген рецептора пролактина, ген коактиватора A1 ядерных рецепторов, ген фолликулостимулирующего гормона, *ESR*, *NCOA1*, *PRLR*, *FSHR* свиноматка,.

STUDY OF POLYMORPHISM OF GENES ASSOCIATED WITH REPRODUCTIVE ABILITY SOWS UKRAINIAN MEAT AND WALES BREEDS

M.V. Dragulyan, S.A. Kostenko, O. Sidorenko

The genotypes of genes: *ESR* (estrogen receptor), *NCOA1* (nuclear receptor coactivator A1), *PRLR* (prolactin receptor), *FSHR* (FSH receptor) of sows Wales and Ukrainian meat breeds. Found that both sows Welsh breed allele *B* gene *ESR* – 0,40, in the Ukrainian meat – 0,48. Sows Welsh breed characterized by a lower frequency of genotype *BB* *ESR* gene compared with sows Ukrainian meat breed (0,02 and 0,10, respectively). Study the frequency of genotypes and alleles *NCOA1* pigs Ukrainian meat and Welsh breeds found a fairly high frequency desired from the point of view of increasing multiple births *A1* allele (0,62 and 0,66, respectively). *A1A1* genotype sows Ukrainian meat breed met by 9% lower than the Welsh breed sows ($p < 0.001$). The frequency of allele *A* gene *PRLR* sows Welsh breed – 0,53, the Ukrainian meat – 0,58, and genotype *AA* – 0,34 and 0,52, respectively. Pig breeds were polymorphic in gene *FSHR*. Frequency distribution of desired alleles with *FSHR* gene in pigs Ukrainian meat and Welsh rock found almost identical values (0,75 and 0,73,

respectively). *CC* genotype frequency *FSHR* gene sows Welsh breed – 0,57, Ukrainian meat – 0,56. The actual frequency of genotypes was significantly different from the theoretically expected.

Keywords: genetic markers, reproductive quality *Sus scrofa*, the estrogen receptor gene, prolactin receptor gene, the gene A1 coactivator nuclear receptor gene *FSH*, *ESR*, *NCOA1*, *PRLR*, *FSHR*, sow, Ukrainian meat breed, Welsh breed.