

С.А. КОСТЕНКО¹, Е.В. СИДОРЕНКО²

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЭСТРОГЕН-РЕЦЕПТОРА НА СПЕРМОПРОДУКТИВНОСТЬ ХРЯКОВ РАЗНЫХ ПОРОД

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования
Украины

²Институт разведения и генетики животных Национальной академии
аграрных наук Украины

Введение. При интенсивном промышленном производстве свинины возникают трудности реализации репродуктивных качеств свиной, поскольку воспроизводительные показатели имеют низкую наследуемость ($h^2 = 0,1-0,36$) [1, 2, 3], их сложно повышать традиционными методами разведения [4]. Использование в качестве генетических маркеров генов, ассоциированных с хозяйственно-полезными признаками, в селекции животных позволяет ускорить отбор животных по этим показателям. Выявлено, что отбор животных по генотипу генов, которые связаны с репродуктивными качествами, позволяет до 18 % [5] увеличить многоплодие свиноматок и до 16,8 % воспроизводительную функцию хряков-воспроизводителей [3, 4, 6].

Поэтому в настоящее время в свиноводстве при отборе животных в родительское стадо актуальной является не только традиционная, но и маркер-ассоциированная селекция (MAS). Одним из маркеров репродуктивных качеств, который используют в свиноводстве, является ген рецептора эстрогена (ESR).

В организме самок эстрогены регулируют рост и развитие яичников, созревание ооцитов, изменение структуры матки в зависимости от физиологического состояния, приживаемость эмбрионов, усиливают развитие молочной железы, стимулируют биосинтез белков, жиров и гликогена. В организме самцов эстрогены принимают участие в работе придаточных половых желез и при проявлении половых рефлексов [7].

Действие эстрогена в организме самок и самцов происходит через эстроген-рецептор (ESR). Это один из первых генов, который использовали в качестве маркерного в 1991 году М. Rothschild с коллегами. Они обнаружили точечную мутацию ESR T > G (1665), что и обуславливает полиморфизм (наличием аллелей A и B или C и D) и выявили связь этой мутации (аллель B в генотипе) с многоплодием свиноматок [8].

По данным М. Rothschild, носители аллеля B имеют лучшие пока-

затели многоплодия [8], влияние разных аллелей на репродуктивные качества хряков на нынешнее время до конца не изучено. По данным И.П. Шейко, хряки генотипа ВВ положительно влияют на производительность покрытых ими самок [4].

Применение искусственного осеменения приводит к увеличению количества потомков у самцов по сравнению с самками: так, за одним производителем может быть закреплено 200 самок [9]. В этой связи при подборе родительских пар к воспроизводительным качествам производителей следует выдвигать более суровые требования.

Поэтому цель нашей работы заключается в генетическом анализе хряков-производителей по гену рецептора эстрогена и установлении связи между носителями разных генотипов с качеством спермопродукции.

Материал и методика исследований. Исследовали племенных хряков крупной белой породы ($n = 28$), породы ландрас ($n = 7$) и синтетического кросса alba ($n = 12$), которые содержатся в СВАО «Агрокомбинат «Калита» Киевской области (хозяйство № 1), украинской мясной породы селекции ДСАУ, которые содержатся в ООО «Луговске» Днепропетровской области ($n=6$, хозяйство №2), и крупной белой породы, содержащихся в ООО «Шпили» Киевской области ($n = 6$, хозяйство № 3).

Генетический анализ проводили в отделе генетики Института разведения и генетики животных НААН Украины. Геномную ДНК выделяли из волосяных фолликулов с помощью комплекта реактивов «ДНК-сорб В» (Амплисенс, Россия). В пробирку 1,5 мл вносили 15-25 волосяных фолликулов, лизис проводили 2 часа. Последующее выделение ДНК осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя. Генетический анализ свиней проводили методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция, полиморфизм длин рестриктивных фрагментов) по методике, разработанной Украинской лабораторией качества и безопасности продукции агропромышленного комплекса НУ-БИП Украины [10]. После амплификации гена ESR в полученный продукт вносили рестриктазу Pvu II при 37°C на протяжении 12-16 часов. Рестрикционные фрагменты разделяли в 4%-ном агарозном геле (Хеликон, Россия). Визуализацию электрофореграмм проводили на трансиллюминаторе в УФ свете. После действия рестриктазы генотип АА давал фрагмент размером 120 п.н, ВВ – 65 и 55 п.н., а генотип АВ – 120, 65 и 55 п.н., соответственно.

Качество спермопродукции хряков оценивали с помощью материалов первичного зоотехнического учёта. Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью программы Excel 2007.

Работа проведена при поддержке Государственного фонда фунда-

ментальных исследований Украины.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Частоты генотипов гена ESR, обнаруженные у хряков, размещены в таблице 1. На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов ПЦР-ПДРФ, полученная при анализе полиморфизма гена ESR у свиней.

Таблица 1 – Частоты генотипов и аллелей гена рецептора эстрогена у хряков

Порода	№ хоз-ва	Кол-во животных, гол.	Генотипы		Алели	χ^2
Крупная белая	3	6	AA AB BB	0±0,00 0,67±0,19 0,33±0,19	A 0,33±0,08 B 0,67±0,06	1,48
Крупная белая	1	29	AA AB BB	0,14±0,06 0,76±0,08 0,10±0,06	A 0,48±0,03 B 0,52±0,03	46,38***
Ландрас		7	AA AB BB	0,29±0,17 0,71±0,17 0±0,00	A 0,64±0,05 B 0,36±0,07	21,66***
Alba		12	AA AB BB	0,08±0,08 0,75±0,13 0,17±0,11	A 0,46±0,05 B 0,54±0,05	12,21**
Украинская мясная, селекц. ДСАУ	2	6	AA AB BB	0±0,00 0,83±0,15 0,17±0,15	A 0,42±0,08 B 0,58±0,07	6,64**

*** $p < 0,01$ **** $p < 0,001$ (разница между фактическим и ожидаемым распределением в соответствии с законом Харди-Вайнберга)

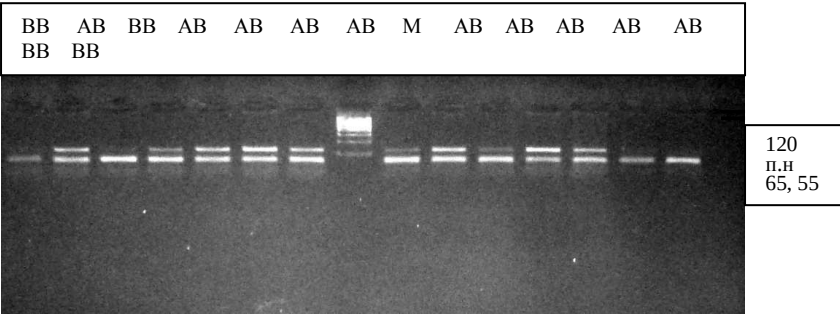


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-ПДРФ при анализе полиморфизма гена рецептора эстрогена у свиней

По результатам наших исследований, среди хряков крупной белой породы, которые воспроизводятся в Иванковском районе Киевской области, не обнаружены носители генотипа АА. Частота хряков с генотипом ВВ составляла 0,17, гетерозиготных (АВ) – 0,83, частота носителей аллеля В – 0,58. Частота желательного генотипа ВВ у хряков этой породы, которая содержится в СВБТ «АК «Калита», составила 0,10, генотипа АВ – 0,76, аллеля В – 0,52. По данным Калайчаковой О., у хряков крупной белой породы частота носителей генотипа АВ составляла 0,46, генотипа ВВ – 0,21, аллеля В – 0,44 [11].

У хряков породы ландрас мы не обнаружили носителей генотипа ВВ. Подобные данные были получены в исследованиях М. Кміеас, проведённых в Польше [12]. Сравнивая полученные нами данные с показателями, установленными О. Кайлачаковой (Россия) [11], R. Omelka et al. (Польша) [13], И.П. Шейко (Беларусь) [14], В. Santana (Бразилия) [15], следует отметить, что для породы ландрас в целом характерна низкая частота носителей, желательных для воспроизводительных качеств аллеля В и генотипа ВВ.

Популяция породы ландрас Германии вообще оказалась мономорфной, в ней не были обнаружены носители аллеля В [16]. Среди исследованных польских и чешских свиней породы ландрас не нашлось животных-носителей генотипа ВВ, а частота генотипа АА равнялась 0,88 и 0,97, соответственно [12, 13, 17]. Несколько выше была частота аллеля В в популяции породы ландрас в Бразилии (0,19) [15], Испании (0,07-0,13) [18], России (0,082) [11].

Частота гетерозигот (АВ) из исследованных нами животных составила 0,71, носителей аллеля В – 0,36. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о высоком генетическом потенциале изученной нами популяции породы ландрас по гену ESR. Анализ соответствия полученных нами частот с распределением согласно закону Харди-Вайнберга свидетельствует о том, что хряки пород крупная белая и ландрас имеют достоверно высокую частоту гетерозигот ($p < 0,001$).

Частота носителей генотипа ВВ синтетического кросса алба составляет 0,17, гетерозиготных животных – 0,75, носителей аллеля В – 0,54. Среди хряков украинской мясной породы селекции ДСАУ мы не обнаружили носителей генотипа АА, частота гомозиготных животных ВВ составляла 0,17, гетерозиготных АВ – 0,83, носителей аллеля В – 0,58. Анализ соответствия полученных нами частот с распределением согласно закону Харди-Вайнберга свидетельствует о том, что хряки синтетического кросса алба и украинской мясной породы селекции ДСАУ имеют достоверно высокую частоту гетерозигот ($p < 0,01$).

Объясняя высокую частоту гетерозиготных носителей (АВ), можно допустить, что в хозяйствах происходит отбор носителей аллеля В. Другим предположением может служить то, что аллель А также явля-

ется хозяйственно ценной.

Поскольку искусственное осеменение применяют только в СВАТ «АК «Калита» мы проанализировали показатели спермопродукции хряков-производителей в зависимости от их генотипа (таблица 2).

Таблица 2 – Качество спермопродукции хряков в зависимости от генотипа гена *ESR*

Гено- типы	Коли- чество живот- ных, гол.	Объем эякулята, мл	Концентра- ция спермиев в эякуляте, млрд./мл	Количество спермиев в эякуляте, млрд.	Активность спермиев, баллы
Крупная белая					
<i>AA</i>	4	237,34 ± 43,79	0,33 ± 0,03	59,25 ± 7,91	7,94 ± 0,06
<i>AB</i>	21	262,93 ± 12,85	0,33 ± 0,02	69,25 ± 5,13*	7,89 ± 0,06
<i>BB</i>	2	299,95 ± 34,70	0,35 ± 0,03	82,00 ± 2,73*	7,95 ± 0,03
Ландрас					
<i>AA</i>	2	256,84 ± 12,40	0,53 ± 0,07	110,53 ± 15,91	8,00 ± 0,01
<i>AB</i>	5	254,81 ± 8,23	0,57 ± 0,09	112,33 ± 16,05	7,95 ± 0,03
<i>BB</i>	0	-	-	-	-
Синтетический кросс <i>alba</i>					
<i>AA</i>	1	228,75	0,48	90,02	8
<i>AB</i>	9	242,52±11,18**	0,54 ± 0,03	104,46±5,85**	7,97 ± 0,02
<i>BB</i>	2	311,30±24,8**	0,54 ± 0,08	132,30 ± 4,8**	8,0 ± 0,01

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

У хряков крупной белой породы наибольший объем эякулята мы наблюдали у носителей генотипа *BB* – 299,95 мл, у животных с генотипами *AA* и *AB* – 237,34 и 262,93, соответственно. По этому показателю носители генотипа *BB* превосходили аналогов с генотипом *AA* на 62,61 мл. Концентрация спермиев в эякуляте у хряков с генотипом *BB* составляет 35,40 млрд./мл, у носителей генотипов *AA* и *AB* – 32,74 и 33,37, соответственно. Животные с генотипом *BB* превосходили носителей генотипа *AA* на 2,66 млрд./мл. Количество спермиев в эякуляте у носителей генотипа *BB* – 82,0 млрд., у аналогов с генотипами *AA* и *AB* – 59,25 и 69,25, соответственно. По этому показателю носители генотипа *BB* статистически достоверно превосходили ($p < 0,05$) гетерозиготных хряков (*AB*) на 12,75 млрд. Активность спермы у гомозиготных животных (*AA*) составила 7,94 балла, носителей генотипа *BB* – 7,95 балла, гетерозиготные животные незначительно уступали (7,89 балла).

У хряков породы ландрас – носителей генотипов *AA* и *AB* – объем эякулята оказался почти на одном уровне – 256,84 мл и 254,81 мл, соответственно. Концентрация спермиев в эякуляте у животных с генотипом *AA* составила 0,53 млрд./мл, что уступает гетерозиготным носителям (*AB*) на 0,04 млрд./мл. Количество спермиев в эякуляте хряков с

генотипом АА составляет 110,53 млрд., что также меньше чем у гетерозиготных носителей на 1,8 млрд. Активность спермиев была более высокой в носителей генотипа АА – 8,0 баллов.

Объём эякулята у гетерозиготных носителей (АВ) синтетического кросса алба составляет 242,52 мл, что статистически достоверно ($p < 0,01$) меньше, нежели у животных с генотипом ВВ на 68,78 мл. Концентрация спермиев в эякуляте у носителей генотипов АВ и ВВ была на одном уровне и составляла 0,54 млрд./мл. Количество спермиев в эякуляте у носителей генотипа АВ составило 104,46, что статистически достоверно ($p < 0,01$) меньше на 27,84 млрд., чем у гомозиготных носителей генотипа ВВ. Лучшие показатели активности спермиев выявлены у носителей генотипа ВВ – 8 баллов, у животных с гетерозиготными генотипами – 7,95. Таким образом, по нашим данным, носители генотипов ВВ и АВ превосходят аналогов с генотипом АА по качеству спермопродукции.

Терман А. с соавторами [19], исследуя связь между спермопродуктивностью и генотипом по гену ESR у хряков, принадлежащим семи разным породам, помесям и линиям, выявили, что животные с генотипом ВВ (у автора – DD) превосходят аналогов с другими генотипами по концентрации спермиев. Гетерозиготы характеризовались лучшими показателями концентрации спермиев по сравнению с гомозиготами АА (СС). Таким образом, можно сделать вывод, что наличие аллеля В даёт преимущества животным в концентрации спермиев. В то же время А. Терман было выявлено превосходство носителей генотипа АА (СС) по количеству и процентному содержанию живых спермиев и объёму эякулята.

Сравнивая полученные нами данные по показателям спермопродуктивности хряков с результатами исследований А. Терман, следует отметить, что изученные нами животные характеризуются лучшими показателями по объёму эякулята, но уступают по концентрации спермиев.

Учитывая различия, выявленные нами между породными группами (таблица 2), можно предположить, что существуют породные и линейные генотипические особенности, обусловленные полиморфизмом других генов. Так, в исследованиях М. Кмеис и А. Терман (2004, 2006) установлена связь между генотипами гена PRLR и качеством спермы у польских хряков породы ландрас [20, 21]. Гетерозиготные (АВ) хряки характеризовались большим объёмом эякулята, высшим процентом подвижных сперматозоидов ($p < 0,01$) и концентрацией спермиев в эякуляте. Наибольшую концентрацию спермиев в эякуляте наблюдали у хряков с генотипом ВВ.

Епишко О.А. с коллегами, исследуя хряков породы дюрок ($n = 70$) по генам ESR, PRLR, FSHB, RYR1, установили мономорфность исследу-

дованных животных по генам ESR, FSHB, RYR1 и ассоциировали полиморфизм по гену PRLR с показателями спермопродукции. Исследователи показали, что хряки с генотипом AA превосходили животных с генотипом BB по объёму эякулята на 35 мл, или на 27 % ($p < 0,05$), и выживаемостью спермиев на 20,2 часа, или на 19,5 % ($p < 0,05$), также наблюдали тенденцию к увеличению концентрации спермиев на 16,7 млн./мл, или на 4,8 % [22].

Также было отмечено позитивное влияние полиморфизма гена ESR в геноме хряка (генотипы BB и AB) на качество его спермопродукции, эффективность его использования и производительность осеменённых свиноматок. Установлено, что хряки с генотипом BB позитивно влияют на производительность покрытых ими самок в сопоставлении с влиянием аналогичного материнского генотипа. Наиболее высокое многоплодие (13 поросят) отмечено у родителей с сочетанием генотипов BB x BB [4].

Заключение. Таким образом, выявив генотипы гена ESR у хряков крупной белой, синтетического кросса alba и породы ландрас, мы установили достоверно высокую частоту гетерозигот во всех исследованных породных группах животных. Оценка влияния генотипа на качество спермопродукции свидетельствует о том, что аллель В гена ESR дает преимущества его носителям по количеству спермиев в эякуляте.

Литература

1. Полиморфизм гена эритропоэтинового рецептора (EPOR) и плодовитость свиноматок белорусской мясной породы / В. А. Дойлидов [и др.] // Проблемы интенсификации производства продуктов животноводства : тез. докл. междунар. науч.-практ. конф. (9-10 окт. 2008 г.). – Жодино, 2008. – С. 38-40.
2. Влияние гена эстрогенового рецептора на продуктивность свиноматок белорусской мясной и крупной белой пород / И. П. Шейко [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2007. – Т. 42, ч. 1. – С. 159-165.
3. Лобан, Н. А. Комплексная оценка продуктивности свиноматок белорусской крупной белой породы селекционно-генетическими методами / Н. А. Лобан, О. Я. Василюк, А. С. Чернов // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2008. – Т. 43, ч. 1. – С. 88-93.
4. Селекция на повышения многоплодия свиноматок крупной белой породы методом молекулярной генной диагностики / И. П. Шейко [и др.] // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі – 2006. – № 3. – С. 77-81.
5. Епишко, О. А. Гены, детерминирующие воспроизводительную функцию свиноматок / О. А. Епишко // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі – 2008. – № 2. – С. 81-85.
6. Епишко, О. А. Полигенный характер детерминации репродуктивных признаков белорусской мясной породы / О. А. Епишко, Т. И. Епишко, Л. А. Калашникова // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2009. – № 2. – С. 42-44.
7. Полиморфизм гена эстрогенного рецептора свиноматок различных пород, разводимых в РУСП «СГЦ «Заднепровский» / Т. И. Епишко [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2005. – Т. 40, ч. 1. – С. 59-63.
8. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in

pigs / M. Rothschild [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA– 1996. – № 93 – P. 201-205.

9. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / В. А. Яблонський [та ін.] ; за ред. А. Яблонський, С. П. Хомин. – Вінниця : Нова книга, 2006 – 592 с.

10. Ідентифікація алейних варіантів генів *ESR* та *MC4R*, які впливають на господарсько-корисні ознаки свині свійської *Sus scrofa*, L. / О. М. Коновал [и др.]. – К. : Видавничий центр НУБіП України. – 2008. – 24 с.

11. Калайчакова, О. Популяционно-генетический анализ гена *ESR* свиней / О. Калайчакова // Животноводство России. – 2008. – Спецвып. Свиноводство. – С. 19.

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

13. Simultaneous Detection of Malignant Hyperthermia and Genetic Predisposition or Improved Litter Size in Pigs by Multiplex PCR-RFLP/ R. Omelka [et al.] // Folia biologica (Krakow). – 2004. – Vol. 52, № 1-2. – P. 113-115.

14. Шейко, И. П. Разработка методов молекулярной генной диагностики и их использование в свиноводстве Беларуси / И. П. Шейко, Н. А. Лобан, О. Я. Василюк // Весті Національної Академії Наук Беларусі. – 2005. – № 1. – С. 62-66.

15. Association of the estrogen receptor gene *Pvu II* restriction polymorphism with expected progeny differences for reproductive and performance traits in swine herds in Brazil / B. A. Santana [et al.] // Genetics and Molecular Biology. – 2006. – Vol. 29, № 2. – P. 273-277.

16. Drogemuller, C. Candidate gene markers for litter size in different German pig lines1 / C. Drogemuller, H. Hamann, O. Distl // J. Anim. Sci. – 2001. – № 79. – P. 2565-2570.

17. Goliasova, E. Impact of the *ESR* gene on litter size and production traits in Czech Large White pigs / E. Goliasova, J. Wolf // Anim. Gen. – 2004. – Vol. 4. – P. 293-297.

18. Estrogen receptor polymorphism in Landrace pigs and its association with litter size performance. / J. L. Noguera [et al.] // Livestock Production Science. – 2003. – № 82 – P. 53-59.

19. Terman, A. Estrogen receptor gene (*ESR*) and semen characteristics of boars / A. Terman, M. Kmiec, D. Polasik // Arch. Tierz.. – 2006. – Bd. 49, № 1. – P. 71-76.

20. Kmiec, M. Prolactin receptor gene polymorphism in Polish Landrace boars / M. Kmiec, A. Terman // Animal Science Papers and Reports. – 2004. – Vol. 22, № 4. – P. 529-532.

21. Kmiec, M. Associations between the prolactin receptor gene polymorphism and reproductive traits of boars / M. Kmiec, A. Terman // J. Appl Genet. – 2006. – Vol. 47, № 2. – P. 139-141.

22. Епишко, О. А. Влияние комплексных генотипов генов *ESR*, *PRLR*, *FSHRβ* и *гуг1на* продуктивность свиноматок и хряков-производителей пород белорусская мясная и дюрок / О. А. Епишко // Проблемы интенсификации производства продуктов животноводства : тез. докл. междунар. науч.-практ. конф. (9-10 окт. 2008 г.). – Жодино, 2008. – С. 49-51.

(поступила 9.03.2011 г.)