

УДК 636.4:636.082:575.827

Топіха В.С., д. с.-г. н., професор; ©
Крамаренко С.С., к. б. н., доцент;
Луговий С.І., к. с.-г. н., доцент, Lugovoy79@mail.ru
Миколаївський державний аграрний університет

ВПЛИВ АНТРОПОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ НА ДИНАМІКУ ГЕНОФОНДУ СВИНЕЙ ЗА ГЕНОМ ЕСТРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА (ESR)

У статті наведено результати аналізу динаміки генофонду свиней за геном естрогенового рецептора (ESR) залежно від ступеню антропогенного впливу. Встановлено особливості поліморфізму даного гена у свиней в різних регіонах України.

Ключові слова: ген естрогенового рецептора (ESR), поліморфізм, свині.

Вступ. Людина завжди використовувала навколишнє середовище, в основному, як джерело ресурсів, однак протягом дуже тривалого часу його діяльність не робила помітного впливу на біосферу. Лише в кінці минулого століття зміни біосфери під впливом господарської діяльності звернули на себе увагу вчених. У першій половині ХХ століття ці зміни наростали і у даний час лавиною обрушилися на людську цивілізацію. Прагнучи до покращення умов свого життя, людина постійно нарощує темпи матеріального виробництва, не замислюючись про наслідки [21].

Однак, поява новітніх промислових технологій та їхньої продукції, погіршення екологічної ситуації потребують принципової зміни підходу до оцінки біобезпечності окремих регіонів планети. Це обумовлює необхідність додаткового аналізу комплексу живих організмів – мішені їхньої дії.

Наступною проблемою є добір об'єктивних біомаркерів, зміни частоти трапляння яких адекватно би відображали популяційно-генетичні процеси, індуковані новою екологічною ситуацією і дали б змогу прогнозувати їхній напрям.

Одним з таких потенційних маркерів, на думку багатьох вчених [4, 15] може бути генетичний поліморфізм сучасних високополіморфних нейтральних та селекційно-залежних ДНК-маркерів.

Враховуючи вищесказане, метою нашої роботи було вивчення динаміки генофонду свиней за геном естрогенового рецептора (ESR) залежно від антропогенного впливу (наслідки аварії на Чорнобильській АЕС) на ареал їх розведення.

Матеріали та методи. Дослідження було виконано за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень України у рамках проекту Ф43/011 «Дослідження динаміки генофонду домашніх свиней *Sus Scrofa* за антропогенного впливу з використанням нейтральних та селекційно-залежних ДНК-маркерів» (№

державної реєстрації 0111U006972).

Для дослідження нами було використано дані генетичного поліморфізму генетичного маркера ESR_PvuII у свиней великої білої породи, які розводяться у племінних заводах Запорізької (ВАТ «Племзавод «Степной», n = 19), Херсонської (ТОВ «Таврійські свині», n = 19) та Миколаївської областей (СПП «Техмет-Юг», n = 15).

Матеріалом для виділення ДНК були зразки тканини (вушні вищипи) свиней.

Крім власних даних, отриманих під час виконання проекту, нами до аналізу також було залучено дані інших авторів, які вивчали мінливість цього генетичного маркера.

Відповідно до ступеня антропогенного пресу (внаслідок аварії на ЧАЕС в 1986 році) всі популяції свиней нами було поділено на дві групи.

До першої групи увійшли популяції свиней з тих територій, які найбільше постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи – з Київської та Чернігівської областей. А до другої – популяції з територій, які зазнали меншого впливу радіаційного забруднення – із решти регіонів України.

Лабораторні дослідження виконувалися в умовах лабораторії молекулярної генетики та цитогенетики тварин Центру біотехнології та молекулярної діагностики Всеросійського інституту тваринництва РАСГН та лабораторії генетики Інституту свинарства ім. О. В. Квасницького НААНУ.

Виділення ДНК здійснювали шляхом лізису в буфері Кавасакі [16] та перхлоратним методом з модифікаціями, розробленими у Центрі біотехнології та молекулярної діагностики Всеросійського інституту тваринництва РАСГН [3, 5].

Аналіз поліморфізму генетичного маркера ESR_PvuII здійснювали методом ПЛР з наступним гідролізом утворених фрагментів ендонуклеазою рестрикції PvuII [19] (ПЛР-ПДРФ) та їх розділенням методом електрофорезу.

Електрофоретичне розділення проводили при напрузі 120...130В в 2,5...3,0% агарозному гелі в буфері ТАЕ 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 [12] з використанням програми GenAIEx [17].

Результати дослідження. Ген естрогенового рецептора (ESR) свиней розташований на першій хромосомі (SSC1) [22]. Механізм генетичного впливу естрогенового рецептора полягає в контролі вироблення жіночого статевого гормону – естрогену, який визначає відтворювальні якості.

В 1991 році М. Rothschild та співавтори [18] описали наявність однієї точкової мутації (SNP) в третьому інтроні гена естрогенового рецептору свиней (ESR), яка проявляється при дії рестриктази PvuII. Сайтом рестрикції для цієї рестриктази є

ділянка CAG \uparrow CTG [20]. При цьому формувалися дві алелі довжиною 4,3 тис. п. н. та 3,7 тис. п. н.

Однак, умови ПЛР-ПДРФ, які були запропоновані М. Rothschild зі співавторами використовували не дуже вдалий набір праймерів, внаслідок чого продукти рестрикції не дуже легко було інтерпретувати. Тому, в 1997 році Т. Short із співавторами [19] розробили новий набір праймерів, що дав можливість покращити візуалізацію результатів ПЛР-ПДРФ-аналізу. Вони запропонували для аналізу поліморфізму за рестриктазою PvuII праймери:

ESR F: 5'-CCTGTTTTTACAGTGACTTTTACAGAG-3';

ESR R: 5'-CACTTCGAGGGTCAGTCCAAATTAG-3'.

В цьому випадку дві алелі мали наступну довжину: 120 п. н. (алель А) та 65+55 п. н. (алель В). Тварини з генотипом АА мають гіпофункцію, а ВВ – гіперфункцію вироблення естрогену. В гетерозиготному варіанті (АВ) його вироблення має середнє значення.

Наразі, в гені естрогенового рецептора свиней (ESR) встановлено наявність декілька точкових мутацій (SNP). При цьому, найбільш вивченою є SNP ESR_PvuII.

В таблиці 1 наведено вихідні дані для географічної характеристики та проведення аналізу рівня генетичного різноманіття свиней України за геном естрогенового рецептора (ESR).

Таблиця 1

**Частоти генотипів за геном естрогенового рецептора (ESR)
у свиней різних порід**

Область	Поро-да	n	Генотип			Джерело
			АА	АВ	ВВ	
Київська	ВБ	60	0,48	0,27	0,25	О.Коновал, С.Костенко, 2008
?	ВЧ	37	0,54	0,38	0,08	А.Саєнко, В.Балацький, 2009
?	ВБ	50	0,14	0,43	0,43	
?	ВБ	47	0,32	0,57	0,11	
?	ВБ	105	0,60	0,22	0,18	О.Коновал та ін., 2008
Київська	Л	30	0,39	0,42	0,19	О.Сидоренко, 2009
Київська	УМ	16	0,19	0,81	0,00	
Миколаївська	ЧБПП	20	0,50	0,50	0,00	В.Бугаєвський та ін., 2010
Київська	ВБ	62	0,58	0,10	0,32	С.Костенко та ін., 2010
Київська	ВБ	47	0,15	0,60	0,25	
Київська	ВБ	29	0,14	0,76	0,10	С.Костенко, О.Сидоренко, 2010
Київська	Л	7	0,29	0,71	0,00	
Дніпропетровська	УМ	6	0,00	0,83	0,17	
Запорізька	ВБ	100	0,26	0,57	0,17	В.Балацький та ін., 2010
Київська	ВБ	123	0,60	0,22	0,18	О. Коновал та ін., 2008
Херсонська	ВБ	19	0,53	0,42	0,05	власні дані
Миколаївська	ВБ	15	0,53	0,47	0,00	
Запорізька	ВБ	19	0,58	0,26	0,16	
Чернігівська	ВБ	45	матеріали знаходяться на лабораторному аналізі			
Чернігівська	Л	25				
Чернігівська	Д	25				

Як бачимо із даних, що наведено в таблиці 1, оцінку генетичної структури популяцій свиней та рівня поліморфізму їх генофонду на території України проведено дуже нерівномірно. Найкраще вивчено популяції тих господарств, які розташовані на території Київської області. Менш дослідженими є генотипи тварин із господарств, що розташовані в центральних областях України – Дніпропетровській та Запорізькій. Нарешті, в рамках даного проекту вперше системно були досліджені свині із господарств Чернігівської області та господарств, які розташовані в південних областях – Миколаївській та Херсонській.

Найбільш вивченим є генофонд великої білої породи (ВБ). Значно менше даних виявлено щодо генофонду свиней порід ландрас (Л) та українська м'ясна (УМ). Поодинокі дослідження проведені серед свиней порід велика чорна (ВЧ), дюрок (Д), червоно-білопояса (ЧБПП).

В таблиці 2 наведено оцінки частот алелей А та В за геном ESR серед свиней різних порід із різних регіонів України.

Таблиця 2

**Частоти алелей гену естрогенового рецептора (ESR)
у свиней різних порід**

Область	Порода	n	Частота алелі		Джерело
			А	В	
Київська	ВБ	60	0,617	0,383	О.Коновал, С.Костенко, 2008
?	ВЧ	37	0,730	0,270	А.Сасенко, В.Балацький, 2009
?	ВБ	50	0,350	0,650	
?	ВБ	47	0,606	0,394	
?	ВБ	105	0,710	0,290	О.Коновал та ін., 2008
Київська	Л	30	0,617	0,383	О.Сидоренко, 2009
Київська	УМ	16	0,594	0,406	
Миколаївська	ЧБПП	20	0,750	0,250	В.Бугаєвський та ін., 2010
Київська	ВБ	62	0,629	0,371	С.Костенко та ін., 2010
Київська	ВБ	47	0,447	0,553	
Київська	ВБ	29	0,517	0,483	С.Костенко, О. Сидоренко, 2010
Київська	Л	7	0,643	0,357	
Дніпропетровська	УМ	6	0,417	0,583	
Запорізька	ВБ	100	0,545	0,455	В.Балацький та ін., 2010
Київська	ВБ	123	0,711	0,289	О.Коновал та ін., 2008
Херсонська	ВБ	19	0,737	0,263	власні дані
Миколаївська	ВБ	15	0,767	0,233	
Запорізька	ВБ	19	0,711	0,289	
Чернігівська	ВБ	45	матеріали знаходяться на лабораторному аналізі		
Чернігівська	Л	25			
Чернігівська	Д	25			

Частота алелі В коливається у відносно незначних межах – від 0,233 до 0,650. В середньому, частота алелі В для свиней із досліджених популяцій України складає $0,381 \pm 0,012$.

Слід відмітити, що свині із популяцій, розташованих в регіонах зі значним

антропогенним пресом, мають частоту алелі В дещо вище, ніж свині із популяцій, розташованих у відносно чистій зоні.

Так, із 8 популяцій із першої групи, в п'яти частота алелі В переважала середній по Україні показник (62,5%), тоді як із 6 популяцій, що входять до другої групи, лише дві популяції мали оцінки частоти алелі В, що переважали середній по Україні показник (33,3%). Таким чином, можна припустити, що алель В гену ESR може бути пов'язана із підвищенням резистентності до різноманітних факторів антропогенного пресу.

Крім безпосередньо, частоти окремих алелей різних генетичних маркерів, не менш важливе значення має також оцінка генетичного різноманіття популяцій свиней та рівень генетичної рівноваги в них.

В таблиці 3 наведено показники фактичної та очікуваної гетерозиготності, оцінку індексу інбридингу та ступінь відповідності структури досліджених популяцій стану генетичної рівноваги.

Таблиця 3

**Фактична та очікувана гетерозиготність за геном ESR
у свиней різних порід**

Область	Порода	H_o	H_e	F	χ^2	Джерело
Київська	ВБ	0,267	0,477	0,441	11,40	Коновал, С.Костенко, 2008
?	ВЧ	0,378	0,400	0,054	0,06	А.Саєнко, В.Балацький, 2009
?	ВБ	0,420	0,460	0,086	0,30	
?	ВБ	0,574	0,482	-0,191	1,94	
?	ВБ	0,219	0,414	0,471	23,06	О.Коновал та ін., 2008
Київська	Л	0,433	0,481	0,099	0,21	О.Сидоренко, 2009
Київська	УМ	0,813	0,498	-0,632	7,49	
Миколаївська	ЧБПП	0,500	0,385	-0,300	2,22	В.Бугаєвський та ін., 2010
Київська	ВБ	0,097	0,470	0,794	38,95	С.Костенко та ін., 2010
Київська	ВБ	0,596	0,500	-0,192	1,98	
Київська	ВБ	0,759	0,508	-0,493	7,81	С.Костенко, О.Сидоренко, 2010
Київська	Л	0,714	0,495	-0,444	2,16	
Дніпропетровська	УМ	0,833	0,530	-0,571	3,06	В.Балацький та ін., 2010
Запорізька	ВБ	0,570	0,498	-0,144	2,23	
Київська	ВБ	0,220	0,412	0,468	26,65	О.Коновал та ін., 2008
Херсонська	ВБ	0,421	0,398	-0,057	0,14	власні дані
Миколаївська	ВБ	0,467	0,370	-0,261	1,39	
Запорізька	ВБ	0,263	0,422	0,377	2,47	
Чернігівська	ВБ	матеріали знаходяться на лабораторному аналізі				
Чернігівська	Л					
Чернігівська	Д					

Примітка. Жирним курсивом виділені вірогідні оцінки критерію χ^2 , для яких $p < 0,05$.

Оцінки індексу інбридингу свідчать про те, що в різних популяціях свиней із різних регіонів України генетична структура (насамперед, співвідношення частот окремих генотипів) значно коливається від надмірного дефіциту гетерозигот до значного їх надлишку.

Лише у 6 випадках із 18 досліджених популяцій ці відхилення мали високовірогідне значення. Але характерно, що всі ці популяції (за виключенням одної, для якої відсутні дані про територіальну належність) входять до першої групи, тобто розташовані на території, яка зазнала значного антропогенного пресу. Крім того, в п'яти випадках із 6 для таких популяцій відмічається значний дефіцит гетерозигот.

Висновки.

При здійсненні геногеографічної характеристики та аналізу рівня генетичного різноманіття свиней, які розводяться в різних регіонах України, за геном ESR встановлено, що на територіях зі значним антропогенним пресом (внаслідок аварії на ЧАЕС) відмічається збільшення частоти алелі В, яке може бути пов'язаним із підвищенням резистентності особин-носіїв даної алелі до різноманітних факторів антропогенного пресу.

В різних популяціях свиней із різних регіонів України генетична структура (насамперед, співвідношення частот окремих генотипів) значно коливається від значного дефіциту гетерозигот до значного надлишку гетерозигот. Найчастіше генетична рівновага у популяціях свиней порушена внаслідок значного дефіциту гетерозигот.

Література

1. Балацький В. М. Асоціації генів у популяції свиней великої білої породи англійської селекції / В. М. Балацький, Т. В. Овсяник, С. М. Корінний // Свинарство. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. — 2008. — Вип. 56. — С. 41—45. — Режим доступу до журн.:

http://www.nbu.gov.ua/portal/Chem_Biol/Smtnz/2008_56/Article.pdf/10_Balatsky_Ovsyanyk_Korinyu.pdf.

2. Бугаєвський В. М. Селекція на підвищення продуктивності свиней червоної білопоясої породи за допомогою генетичних маркерів плодючості / В. М. Бугаєвський, В. М. Балацький, М. С. Косой, Л. В. Онищенко // Наукові праці: Науково-методичний журнал. — Т. 132. — Вип. 119. Екологія. — Миколаїв: Вид-во ЧДУ ім. Петра Могили, 2010. — С. 62—64 — Режим доступу до журн.:

http://www.nbu.gov.ua/portal/Soc_Gum/Npchdu/Ecology/2010_119/119-15.pdf

3. 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.

4. Глазко Т. Чорнобиль: новий фактор еволюції. Нез'ясовані популяційно-генетичні наслідки / Т. Глазко, В. Глазко // Вісник НАН України. — 2006. — № 4. — С. 39—51.

5. 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.

6. Коновал О. М. Дослідження поліморфізму свиней великої білої породи за генами господарсько-корисних ознак / О. М. Коновал, С. О. Костенко, К. Білек, Ж. Філкукова // Наукові доповіді НАУ, 2008. — № 1(9). — Режим доступу до журн.: <http://www.nbuu.gov.ua/e-Journals/nd/2008-1/08komevt.pdf>
7. Коновал О. М. Молекулярно-генетичний аналіз генів, асоційованих із господарсько-корисними ознаками свині свійської (*Sus Scrofa*) / О. М. Коновал, С. О. Костенко, В. Г. Спиридонов, С. Д. Мельничук // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. — 2008. — № 2. — Т. 6. — С. 240—245.
8. Коновал С. М. Генетична структура української популяції свиней породи велика біла за геном естроген-рецептора / С. М. Коновал, С. О. Костенко, В. Г. Спиридонов, С. Д. Мельничук, І. П. Григорюк // Доповіді Національної академії наук України. — 2008. — № 3. — С. 149—151.
9. Костенко С. О. Генетичний аналіз кнурів-плідників різних порід за геном естроген-рецептора / С. О. Костенко, О. В. Сидоренко // Режим доступу: http://www.btsau.kiev.ua/files/list/edition/ed_mjhxskydsd.pdf
10. Костенко С. О. Генетичний аналіз ліній свиней великої білої породи за генами рецепторів естрогену та меланокортину-4 / С. О. Костенко, О. В. Сидоренко // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. — 2011. — Вип. 160. — Ч. 1. — Режим доступу до журн.: http://www.nbuu.gov.ua/portal/chem_biol/nvnuu_tvpt/2011_160_1/11kso.pdf
11. Костенко С. О. Генетичний моніторинг свиней великої білої породи за генами ESR та MC4R / С. О. Костенко, О. М. Коновал, О. В. Сидоренко, В. Г. Спиридонов // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. НАН України, НААН України, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова; редкол.: В. А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. — К.: Логос, 2010. — Т. 8. — С. 148—154.
12. Ли Ч. Введение в популяционную генетику / Ч. Ли. — М.: 1978. — 356 с.
13. Саєнко А. М. Поліморфізм QTL-генів в породах свиней різного напрямку продуктивності / А. М. Саєнко, В. М. Балацький // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. — 2009. — Вип. 138. — Режим доступу до журн.: http://www.nbuu.gov.ua/portal/chem_biol/nvnuu/2009_138/09sem.pdf
14. Сидоренко О. В. Поліморфізм естроген-рецептора у свиноматок м'ясного напрямку продуктивності / О. В. Сидоренко // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. — 2009. — Вип. 138. — Режим доступу до журн.: http://nbuv.gov.ua/portal/chem_biol/nvnuu/2009_138/09sov.pdf
15. Эрнст Л. К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Л. К. Эрнст, Н. А. Зиновьева. — М.: РАСХН, 2008. — 501 с.
16. 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.
17. 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.

18. Rothschild M.F., Larson R.G., Jacobson C., Pearson P. (1991): PvuII polymorphisms at the porcine estrogen-receptor locus (ESR). Anim. Genet., 22, 448—448.

19. Short T.H., Rothschild M.F., Southwood O.I., McLaren D.G., De Vries A., van der Steen H., Eckardt G.R. Tuggle C.K., Helm J., Vaske D.A., Mileham A.J., Plastow G.S. (1997): Effect of oestrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. J. Anim. Sci., 75, 3138—3142.

20. <http://molbiol.edu.ru/re/PvuII.html>

21. <http://schools.keldysh.ru/sch1952/Pages/Timokhina04/Biolog/03.htm>

22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_214220.1

Summary

Топіха В., Крамаренко С., Лугови С.

INFLUENCE HUMAN PRESSURE ON PIG GENOFOND DYNAMICS OF ESTROGEN RECEPTOR GENE (ESR)

The article contains an results of analysis dynamics of genofond of the pig estrogen receptor gene (ESR), depending on the degree of human impact. The peculiarities of this gene polymorphism in pigs in different regions of Ukraine.

Key words: *estrogen receptor gene (ESR), polymorphism, pig.*

Рецензент - д.с.-г.н., проф. Параняк Р.П.