



УДК 636.92 : 575.174

Поліморфізм за геном прогестеронового рецептора (PGR) та його зв'язок із багатоплідністю у кролиць каліфорнійської породи

Г.А. Коцюбенко, А.О. Погорелова, О.С. Крамаренко
nastyusha.pogorelova@list.ru

Миколаївський національний аграрний університет,
вул. Георгія Гонгадзе, 9, м. Миколаїв, 54020, Україна

Сучасні генетичні підходи до вдосконалення порід засновані на поглибленій оцінці генотипу сільськогосподарських тварин і генетичного різноманіття популяцій за допомогою маркерних технологій. Визначення генотипів тварин було проведено за допомогою методу ПЛР-ПДРФ. Ділянку довжиною 558 п.н. промоторного регіона гена прогестеронового рецептора (PGR) було досліджено у 60 особин каліфорнійської породи із груп з високим та низьким рівнем багатоплідності. Встановлено, що у особин із групи багатоплідних кролиць переважали особини із гетерозиготним генотипом (0,700), тимчасом як серед тварин із низькими показниками багатоплідності – особини із генотипом AA. Крім того, кролиці I-ої групи характеризувалися дуже високим рівнем фактичної гетерозиготності ($H_o = 0,700$), що значно переважає очікувану гетерозиготність ($H_e = 0,455$). Серед тварин, що мали низький рівень багатоплідності, відмінності між оцінками фактичної та очікуваної гетерозиготності менш суттєві (0,400 та 0,320, відповідно). Таким чином, в обох групах спостерігається надлишок гетерозиготності, що супроводжується негативними оцінками індексу фіксації. Використання методу ПЛР-ПДРФ для гена PGR (рестриктаза Eco31I) дозволило встановити два генотипа AA та GA; генотип AA мав один бенд довжиною 558 п.н., а гетерозиготний генотип GA – три бенди довжиною 558, 416 та 112 п.н. Було відмічено наявність поліморфізму $2464G > A$ для гена PGR кролиць із різних груп; частота алеля G складала 0,350 у тварин із високим рівнем багатоплідності та 0,200 – із низьким. Незалежно від групи, відмічається переважання за кількістю отриманих кроленят для кролиць генотипу GA над особинами, що мали генотип AA. Більш суттєвою ця різниця була для кролиць із I-ої групи (9,1 та 7,0 кроленят відповідно). Встановлено різницю за рівнем багатоплідності для тварин із генотипами AA та GA із груп як багатоплідних, так і малоплідних кролиць.

Ключові слова: поліморфізм, ген прогестеронового рецептора (PGR), багатоплідність, кролі, каліфорнійська порода, генотип, лінія, праймер, рестриктаза Eco31I, маркер, ампліфікація, гетерозиготність, генетична рівновага, частота алеля, група.

Полиморфизм по гену прогестеронового рецептора (PRG) и его связь с многоплодием у крольчих калифонийской породы

А.А. Коцюбенко, А.А. Погорелова, А.С. Крамаренко
nastyusha.pogorelova@list.ru

Николаевский национальный аграрный университет,
ул. Георгия Гонгадзе, 9, г. Николаев, 54020, Украина

Современные генетические подходы к совершенствованию пород основаны на углубленной оценке генотипа сельскохозяйственных животных и генетического разнообразия популяций с помощью маркерных технологий. Определение генотипов животных было проведено с помощью метода ПЦР-ПДРФ. Участок длиной 558 п.н. промоторной региона гена прогестеронового рецептора (PGR) было исследовано в 60 особей калифорнийской породы из групп с высоким и низким уровнем многоплодия. Установлено, что у особей из группы многоплодных крольчих преобладали особи с гетерозиготным генотипом (0,700), тогда как среди животных с низкими показателями многоплодия – особи с генотипом AA. Кроме того, крольчихи I-й группы

Citation:

Kotsyubenko, G.A., Pogorelova, A.A., Kramarenko, O.S. (2017). Progesterone receptor (PRG) gene polymorphism and association with litter size in the california rabbit breed. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 19(74), 76–79.

характеризувались очень высоким уровнем фактической гетерозиготности ($H_o = 0,700$), что значительно превышает ожидаемую гетерозиготность ($H_e = 0,455$). Среди животных которых имели низкий уровень многоплодия, различия между оценками фактической и ожидаемой гетерозиготности менее существенные (0,400 и 0,320 соответственно). Таким образом, в обеих группах наблюдается избыток гетерозиготности, что сопровождается негативными оценками индекса фиксации. Использование метода ПЦР-ПДРФ для гена *PGR* (рестриктаза *Eco31I*) позволило установить два генотипа *AA* и *GA*; генотип *AA* имел один бэнд длиной 558 п.н., а гетерозиготный генотип *GA* – три бэнды длиной 558, 416 и 112 п.н. Было отмечено наличие полиморфизма $2464G > A$ для гена *PGR* крольчих из разных групп; частота аллеля *G* составляла 0,350 в животных с высоким уровнем многоплодия и 0,200 – с низким. Независимо от принадлежности к группе, отмечается преобладание по количеству полученных крольчат для крольчих генотипа *GA* над особями, которые имели генотип *AA*. Более существенной эта разница была для крольчих с I-й группы (9,1 и 7,0 крольчат, соответственно). Установлено разницу по уровню многоплодия для животных с генотипами *AA* и *GA* из групп как много-, так и малоплодных крольчих.

Ключевые слова: полиморфизм, ген прогестеронового рецептора (*PGR*), многоплодие, кролики, калифорнийская порода, генотип, линия, праймер, рестриктаза *Eco31I*, маркер, амплификация, гетерозиготность, генетическое равновесие, частота аллеля, группа.

Progesterone receptor (*PRG*) gene polymorphism and association with litter size in the california rabbit breed

G.A. Kotsyubenko, A.A. Pogorelova, O.S. Kramarenko
nastyusha.pogorelova@list.ru

Mykolayiv State Agrarian University,
Georgy Gongadze Str., 9, Mykolaiv, 54020, Ukraine

*Modern approaches to genetic improvement of species based on genotype-depth evaluation of farm animals and genetic diversity of populations using marker technology. Determination of genotype of animals was carried out using PCR-RFLP. A 558-bp sequence of the rabbit progesterone receptor promoter region (*PGR*) gene was obtained for 60 animals of the California breed from High Litter Size (HLS) and Low Litter Size (LLS) groups. Found that in individuals with multiple groups rabbit dominated by individuals with heterozygous genotype (0.700), while in animals with low levels litter size – individuals with genotype *AA*. In addition, the rabbit and the second group were characterized by very high actual heterozygosity ($H_o = 0,700$), which significantly exceeds the expected heterozygosity ($H_e = 0,455$). Among the animals that had low bahatoplidnosti differences between actual and expected assessments heterozygosity less significant (0.400 and 0.320, respectively). Thus, in both groups, there is an excess of heterozygosity, accompanied by negative assessments fixation index. PCR-RFLP for *PGR* gene (using the *Eco31I* restriction endonuclease) revealed two genotypes of *AA* and *GA*, and the genotype *AA* yielding a single 558 bp band, and the heterozygote genotype *GA* yielding all the three bands of 558, 416 and 142 bp. The $2464G > A$ SNP for *PGR* gene was not fixed in the HLS and LLS groups, the allele *G* frequency being 0.350 in the HLS and 0.200 in the LLS group. Whatever belong to a group marked predominance on the number of rabbits for a rabbit genotype *GA* on individuals who had genotype *AA*. More significant, the difference was for the rabbit of the I-th group (9.1 and 7.0 rabbits, respectively). The difference in litter size between the *AA* and *GA* genotypes was found for rabbits from as the HLS, as LLS group.*

Key words: polymorphism, the Progesterone Receptor (*PGR*) gene, litter size, rabbits, California breed, genotype, line, primer, restrikytaza *Eco31I*, marker, amplification, heterozygosity, genetic equilibrium, allele frequency, group.

Вступ

Значна роль у забезпеченні людства продовольством, хутряними виробами та пуховою сировиною відведена кролівництву. В Україні на сьогодні чимала частка поголів'я кролів сконцентрована в приватних селянських господарствах і сягає 1,2–1,3 млн маточного і ремонтного поголів'я, а решта – на фермерських господарствах та племінних суб'єктах різних форм власності й господарювання. За результатами державної атестації, племінну базу кролівництва в Україні на сьогодні становить три репродуктори з розведення порід кролів (Honchar et al., 2013).

Сучасні генетичні підходи до вдосконалення порід засновані на поглибленій оцінці генотипу сільськогосподарських тварин і генетичного різноманіття популяцій за допомогою маркерних технологій (Lehkobyт and Beketov, 2010; Zhvakyna and Lehkobyт, 2015). В останні роки як генетичні маркери при аналізі генетичного поліморфізму кролів різних порід використовуються маркери біохімічного поліморфізму систем білків крові (Markovych et al., 2012), ISSR-маркери

(Shevchenko and Kopylov, 2011) та QTL-локуси (Shevchenko et al., 2013; Kopylov et al., 2014).

Ген прогестеронового рецептора (*PGR*) розташований у 1-й хромосомі кролів та має довжину 71875 п.н. (GenBank NC_013669). Він є членом суперродини інтрацелюлярних рецепторів, які забезпечують нуклеарні ефекти стероїдних гормонів. У кролів він існує лише в одній ізоформі (PR-B), мінливість експресії якої відмічається під час перших діб вагітності у яйцепроводі кролиць (Gutierrez-Sagal et al., 1993). Встановлено наявність $A \rightarrow G$ заміна у промоторній ділянці гена *PGR* (позиція 2464), яка пов'язана із репродуктивними ознаками кролиць (Peiró et al., 2010).

Таким чином, головною метою нашого дослідження став аналіз поліморфізму гена *PGR* та його зв'язку із багатоплідністю кролиць породи каліфорнійська.

Матеріал і методи досліджень

Для аналізу було використано кролиць каліфорнійської породи, що утримувалися індивідуально в меха-

нізованому кролятику у двохярусних металевих клітках. Всіх тварин було розподілено у дві групи, відповідно до рівня багатоплідності. У I-у групу включено кролиць із високою кількістю (7–10) кроленят в гнізді ($n = 30$), а у II-у групу – кролиць із низькою кількістю (3–6) кроленят ($n = 30$).

Визначення генотипів тварин було проведено за допомогою методу ПЛР-ПДРФ. Було використано праймери, що запропоновано в роботі R. Peiró із спів-авторами (Peiró et al., 2010). Після обробки продукту ампліфікації (довжиною 558 п.н.) рестриктазою *Eco31I* формуються такі бенди: 416 та 112 п.н. (генотип GG), 558 п.н. (генотип AA) та 558, 416 та 112 п.н. (генотип GA). Всі лабораторні дослідження було проведено на підставі методики (Shevchenko et al., 2013) в лабораторії Полтавського інституту свинарства агропромислового виробництва НААН України.

Для тварин різних груп було розраховано частоти генотипів та алелів, а також основні показники генетичного різноманіття – фактична і очікувана гетерозиготність (H_o та H_e , відповідно) та індекс фіксації (Fis). Ступінь відповідності розподілу генотипів стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом було перевірено за допомогою критерію Хі-квадрат Пірсона. Всі розрахунки було проведено з використанням загальноприйнятих методик (Veut, 1995).

Результати та їх обговорення

В табл. 1 наведено розподіл частот генотипів та алелів гену *PGR* у кролів каліфорнійської породи різних груп. Встановлено, що у особин із групи багатоплідних кролиць переважали особини із гетерозиготним генотипом (0,700), тимчасом як серед тварин із низькими показниками багатоплідності – особини із генотипом AA. Для досліджених тварин не було відмічено жодної особини із генотипом GG (табл. 1).

Особини із різних груп також відрізнялися і за частотою алеля G гену *PGR* – його частота серед особин

із високими та низькими показниками багатоплідності складала 0,350 та 0,200, відповідно.

Таблиця 1

Частоти генотипів та алелів за генотипом *PGR* у кролів каліфорнійської породи різних груп

Група	Частоти генотипів			Частоти алелів	
	AA	GA	GG	A	G
I	0,300	0,700	0	0,650	0,350
II	0,600	0,400	0	0,800	0,200
Разом	0,450	0,550	0	0,725	0,275

Крім того, кролиці I-ої групи характеризувалися дуже високим рівнем фактичної гетерозиготності ($H_o = 0,700$), що значно переважає очікувану гетерозиготність ($H_e = 0,455$). Серед тварин, що мали низький рівень багатоплідності, відмінності між оцінками фактичної та очікуваної гетерозиготності менш суттєві (0,400 та 0,320, відповідно). Таким чином, в обох групах спостерігається надлишок гетерозиготності, що супроводжується негативними оцінками індексу фіксації (табл. 2).

Хоча в цілому розподіл генотипів за генотипом *PGR* у кролів із двох груп вірогідно не відхилявся від стану генетичної рівноваги Харді-Вайнберга (в обох випадках: $P > 0,05$).

Таблиця 2

Показники генетичного різноманіття за генотипом *PGR* у кролів каліфорнійської породи різних груп

Група	H_o	H_e	Fis	χ^2	p
I	0,700	0,455	-0,538	2,90	0,089
II	0,400	0,320	-0,250	0,63	0,429
Разом	0,550	0,399	-0,379	2,88	0,090

Характерно, що незалежно від групи, відмічається переважання за кількістю отриманих кроленят для кролиць генотипу GA над особинами, що мали генотип AA (рис. 1). Хоча більш суттєвою ця різниця була для кролиць із I-ої групи (9,1 та 7,0 кроленят, відповідно).

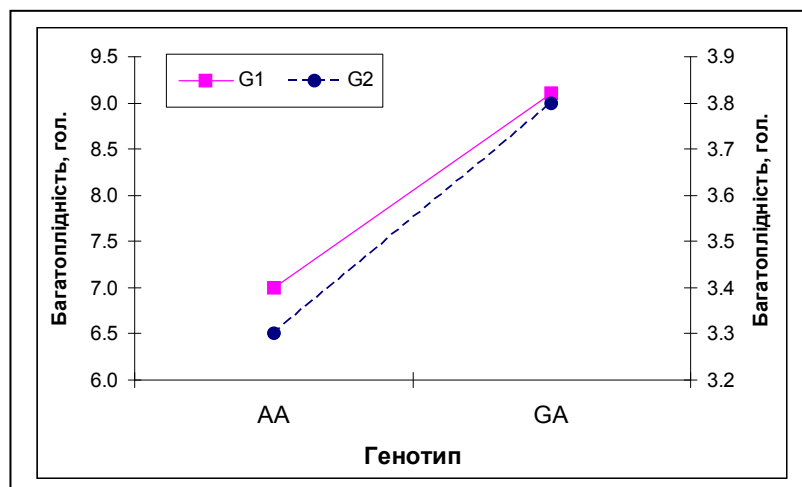


Рис. 1. Показники багатоплідності кролиць каліфорнійської породи різних груп залежно від генотипу за генотипом *PGR*: G1 – I-а група (ліва вісь ОУ); G2 – II-а група (права вісь ОУ).

Раніше вже було встановлено, що у кролів новозеландської білої породи частота алеля G гену *PGR* складала 0,433. При цьому співвідношення генотипів в цій популяції також відповідало стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом (Shevchenko et al., 2013). Серед чотирьох порід (та синтетичних ліній) кролів, досліджених в Єгипті, також було відмічено дуже низькі частоти для генотипу GG (0–0,12), тимчасом як особини з гетерозиготним генотипом переважали у вибірках (0,680–0,880), а частота алеля G варіювала в межах 0,380–0,540 (El-Aksher et al., 2016).

З іншого боку, також було показано, що рівень багатоплідності кролиць мав тісний зв'язок із певними генотипами (або алелями) за геном *PGR*. Так, суттєві відмінності за частотою алеля G відмічено при аналізі генетичної структури кролів, що належали до багата малоплідних ліній – 0,750 та 0,290, відповідно (Peiró et al., 2008). Крім того, у кролів новозеландської білої породи також було встановлено вірогідний вплив генотипу кролиць на рівень їх багатоплідності (Shevchenko et al., 2013).

Висновки

Встановлено, що кролиці каліфорнійської породи, що характеризуються високим та низьким рівнем багатоплідності, відрізнялися як відносно розподілу частот генотипів за геном *PGR*, так й за частотою алеля G (0,350 та 0,200, відповідно). Кролиці I-ої групи характеризувалися дуже високим рівнем фактичної гетерозиготності ($H_o = 0,700$), що значно переважає очікувану гетерозиготність ($H_e = 0,455$). Незалежно від групи, відмічається переважання за кількістю отриманих кроленят для кролиць генотипу GA над особинами, що мали генотип AA.

Перспективи подальших досліджень. На підставі виявлення зв'язку багатоплідності у кролиць за геном прогестеронового рецептора доведена доцільність його використання у перспективі при відборі кролиць у основне стадо в ранньому віці. Нами планується проведення досліджень його впливу на продуктивність кролів.

Бібліографічні посилання

Honchar, O., Shevchenko, Y., Havrysh, O. (2013). Seleksiya u krolivnytstvi: vse avtomatyzovano. Ahrobiznes s'ohodni. 5, 51 (in Ukrainian).

- Lehkobyat, A.P., Beketov, S.V. (2010). DNK-metody y perspektyva ykh yspol'zovanyya v zverovodstve. Krolykovodstvo y zverovodstvo. 3, 22–24 (in Russian).
- Zhvakyina, A.R., Lehkobyat, A.P. (2015). Perspektivy yspol'zovanyya henetycheskykh markerov produktyvnosti v selektsyonnoy rabote s krolykami. Doklady Rossyyskoy akademyy sel'skokhozyaystvennykh nauk. 4, 55–57 (in Russian).
- Markovych, L.H., Tynaeva, E.A., Kulykova, N.Y. (2012). Perspektivy yspol'zovanyya henetycheskykh markerov v selektsyy pushnykh zverey y krolykov. Dostyazheniya nauky y tekhniki APK. 4, 57–59 (in Russian).
- Shevchenko, Y.A., Kopylov, K.V. (2011). Vyznachennya DNK-polimorfizmu kroliv za ISSR-markeramy. Biologiya tvaryn. 13(1/2), 384–391 (in Ukrainian).
- Shevchenko, Y.A., Kopylov, K.V., Fedota, O.M. (2013). Henetychna otsinka kroliv novozelands'koyi biloyi porody za polimorfnyimi variantami S34T hena MSTN ta G2464A hena PGR. Rozvedennya i henetyka tvaryn. 47, 93–102 (in Ukrainian).
- Kopylov, K.V., Kopylova, E.V., Shel'ov, A.V. (2014). Henetycheskaya struktura populyatsyy po polimorfnyim varyantom hena MSTN y khozyaystvenno-byolohycheskiye osobennosti krolykov. Ékologicheskaya henetyka. 12(1), 73–78 (in Russian).
- Gutierrez-Sagal, R., Perez-Palacios, G., Langley, E. (1993). Endometrial expression of progesterone-receptor and uteroglobin genes during early-pregnancy in the rabbit. Mol. Reprod. Dev. 34(3), 244–249.
- Peiró, R., Herrler, A., Santacreu, M.A. (2010). Expression of progesterone receptor related to the polymorphism in the gene in the rabbit reproductive tract. J. Anim. Sci. 88(2), 421–427.
- Veyr, B. (1995). Analiz henetycheskikh dannykh: Dyskretnye henetycheskiye priznaky. M.: Myr (in Russian).
- El-Aksher, S.H., Sherif, H.S., Khalil, M.H. (2016). Polymorphism of progesterone receptor gene in Moshtohor line rabbits and their parental lines using PCR-RFLP technique. Anim. Biotech. 25(32), 25–31.
- Peiró, R., Merchan, M., Santacreu, M.A. (2008). Identification of single-nucleotide polymorphism in the progesterone receptor gene and its association with reproductive traits in rabbits. Genetics. 180(3), 1699–1705.

Стаття надійшла до редакції 14.02.2017