

ÓÆ 636.424.082.12

ВНУТРИПОРОДНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СВИНЕЙ КРУПНОЙ БЕЛОЙ ПОРОДЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТОВ ДНК

Сергей ЛУГОВОЙ, Сергей КРАМАРЕНКО, Вадим ЛИХАЧ
Николаевский национальный аграрный университет, г. Николаев, Украина

Abstract. The genetic diversity and structure of four populations of Large White breed pigs grown in various breeding farms in Ukraine, using 12 microsatellite DNA loci (*SW24*, *S0155*, *SW72*, *SW951*, *S0386*, *S0355*, *SW240*, *SW857*, *SW0101*, *SW936*, *SW911* and *S0228*) were studied. When analyzing intra- and inter-group variability, 158 alleles of the 12 analyzed loci were identified. The total number (*Na*) and effective number (*Ae*) of alleles varied from 6.25 (*Na*) and 3.40 (*Ae*) to 10.25 (*Na*) and 5.63 (*Ae*) alleles per locus. The Hardy-Weinberg equilibrium test (HWE) showed that all of the polymorphic loci deviated from HWE ($p < 0.05$) in at least one population. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) showed that 12.2% of the total genotypic variation was due to differences between populations. Wright's fixation index (*Fst*) per locus varied from 0.037 (*SW72*) to 0.581 (*SW911*), with a mean value of 0.148 ± 0.049 . The mean *Fis* and *Fit* values for all loci were 0.163 ± 0.026 and 0.287 ± 0.047 , respectively. The positive *Fis* value for all loci in the studied populations probably reflects the division of the general population in subpopulations due to the inbreeding accumulated in small groups of individuals.

Key words: Pigs; Large White breed; Intra-breed variability; Genetic diversity; DNA microsatellites.

Реферат. В работе приведены результаты анализа генетического разнообразия и структуры четырех популяций свиней крупной белой породы, разводимых в различных племенных хозяйствах Украины, с использованием 12 локусов микросателлитов ДНК (*SW24*, *S0155*, *SW72*, *SW951*, *S0386*, *S0355*, *SW240*, *SW857*, *SW0101*, *SW936*, *SW911* и *S0228*). При анализе внутри- и межгрупповой изменчивости было идентифицировано 158 аллелей 12 использованных локусов. Абсолютное число аллелей (*Na*) и эффективное число аллелей (*Ae*) варьировало от 6,25 (*Na*) и 3,40 (*Ae*) до 10,25 (*Na*) и 5,63 (*Ae*) аллелей на локус. Результаты проверки на равновесие Харди-Вайнберга свидетельствуют о том, что для всех полиморфных локусов имеет место отклонение от равновесного состояния ($p < 0,05$) минимум в одной из популяций. Результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) показывают, что 12,2% общей генотипической изменчивости определяется различиями между популяциями. Коэффициент фиксации Райта (*Fst*) для различных локусов варьировал от 0,037 (*SW72*) до 0,581 (*SW911*), со средним значением $0,148 \pm 0,049$. Средние оценки *Fis* и *Fit* для всех использованных локусов составляют $0,163 \pm 0,026$ и $0,287 \pm 0,047$, соответственно. Положительное значение *Fis* для всех локусов в исследованных популяциях, вероятно, отражает подразделенность общей популяции на субпопуляции вследствие повышения инбредности в малочисленных группах особей.

Ключевые слова: Свиньи; Крупная белая порода; Внутрипородная изменчивость; Генетическое разнообразие; Микросателлиты ДНК.

ВВЕДЕНИЕ

Для изучения динамики популяционно-генетических процессов в популяциях домашних животных могут использоваться преимущества методов молекулярно-генетического анализа. В странах ЕС уже действует программа PiGMa, координирующая проект по оценке генетического разнообразия европейских пород и линий свиней. Основным инструментом в работах европейских исследователей являются высокополиморфные генетические маркеры – микросателлиты ДНК (МС-ДНК). В геноме свиней насчитывается около 65000-100000 микросателлитных локусов. В пилотном исследовании программы PiGMa используется 27 микросателлитных локусов, расположенных на всех хромосомах (Nidup, K., Moran, C. 2011)

Используя панель МС-ДНК, рекомендованную ISAG, уже изучены особенности формирования генетической структуры различных пород свиней Украины, в том числе, и локальных (Топиха, В.С. и др. 2010; Луговой, С.И. 2013; Trasnov, A. et al. 2016). Однако предварительные исследования показывают, что характер селекционной работы в разных хозяйствах может приводить к формированию специфических аллельных паттернов (Луговой, С.И. 2013а; Луговой, С.И. 2013б). Особый интерес представляет изучение пород, широко распространенных не только в Украине, но и в мире, например, свиней крупной белой породы.

Таким образом, основной целью настоящей работы стал анализ особенностей формирования

внутрипородной генетической изменчивости свиней крупной белой породы, разводимых в разных хозяйствах Украины, с помощью локусов МС-ДНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования были использованы данные генетического полиморфизма 12 локусов МС-ДНК (*SW24*, *S0155*, *SW72*, *SW951*, *S0386*, *S0355*, *SW240*, *SW857*, *SW0101*, *SW936*, *SW911* и *S0228*) свиней крупной белой породы из четырех хозяйств, которые находятся в Николаевской (СХЧП «Техмет-Юг», $n = 72$; ТМЮ), Запорожской (ПАО «Племзавод «Степной», $n = 50$; ПС), Херсонской (ООО «Таврийские свиньи», $n = 51$; ТС) и Черниговской (ООО «Агрикор-Холдинг», $n = 33$; АХ) областях Украины. Были использованы животные обоих полов.

Материалом для выделения ДНК были образцы ткани (ушные выщипы) свиней. Все лабораторные исследования проводили в условиях лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики животных Центра биотехнологии и молекулярной диагностики Всероссийского научно-исследовательского института животноводства им. Л.К.Эрнста Россельхозакадемии. Выделение ДНК проводили с помощью колонок фирмы Nexttec и с использованием набора реагентов D1Atom™ DNA Prep100. Анализ ДНК и постановку ПЦР осуществляли, используя методики ВНИИЖ им. Л.К.Эрнста (Зиновьева, Н.А. и др. 1998).

Мультиплексный анализ 12 локусов микросателлитов проводили на генетическом анализаторе ABI Prism 3130x1. Обработку данных капиллярного электрофореза проводили путем перевода длин фрагментов в числовое выражение на основании сравнения их подвижности со стандартом ДНК.

Весь статистический анализ проведен на основании общепринятых методик (Вейр, Б. 1995) с использованием программы GenAlEx (Peakall, R., Smouse, P. 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для проанализированных свиней крупной белой породы число аллелей для локусов МС-ДНК варьировало в достаточно широких пределах – от 4 до 16 аллелей на локус. Наибольшее число аллелей было отмечено для локусов *SW936* (16 аллелей, хозяйство ПС), *SW240* (14 аллелей, хозяйство АХ; 13 аллелей, хозяйство ПС), *SW0355* (13 аллелей, хозяйство ТМЮ), *S0101* (13 аллелей, хозяйство ТМЮ). Всего было зарегистрировано 158 аллелей (т.е., в среднем – 13,2 аллеля на один локус МС-ДНК).

Самый низкий уровень генетического разнообразия (четыре аллеля на локус) зарегистрирован для локусов *S0155* и *S0386* (хозяйство ТС), а также *S0155* (хозяйство АХ).

В среднем, уровень аллельного разнообразия был наивысшим у свиней крупной белой породы, разводимых в СХЧП «Техмет-Юг» и ПАО «Степной» (10,25 и 9,50 аллелей на локус), тогда как в двух других хозяйствах было отмечено на 3-4 аллеля (в среднем на локус) меньше (табл. 1).

Таблица 1. Показатели генетической изменчивости свиней крупной белой породы из разных хозяйств по 12 локусам МС-ДНК

Хозяйство	<i>Na</i>	<i>Ae</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>
ООО «Таврийские свиньи» ($n = 51$)	6,25±0,41	3,40±0,18	0,681±0,022	0,696±0,017	0,021±0,023
ПАО «Племзавод «Степной» ($n = 50$)	9,50±0,80	4,92±0,40	0,626±0,025	0,783±0,016	0,198±0,032
СХЧП «Техмет-Юг» ($n = 72$)	10,25±1,14	5,63±0,73	0,611±0,052	0,793±0,022	0,217±0,080
ООО «Агрикор-Холдинг» ($n = 33$)	7,25±0,64	3,15±0,23	0,621±0,043	0,663±0,026	0,079±0,044

Примечание. *Na* – число аллелей; *Ae* – эффективное число аллелей; *Ho*, *He* – фактическая и ожидаемая гетерозиготность; *Fis* – индекс фиксации.

Показатель эффективного числа аллелей в целом отражает аналогичную закономерность, с учетом того, что его выборочные оценки оказываются практически вдвое ниже, чем абсолютное число аллелей.

Показатель наблюдаемой гетерозиготности варьировал от 0,190 (локус *S0228*, хозяйство АХ) до 0,966 (локус *SW857*, хозяйство АХ). В среднем для всех локусов, наиболее высокая гетерозиготность отмечается для свиней из ООО «Таврийские свиньи» ($Ho = 0,681 \pm 0,022$), хотя и в остальных хозяйствах полученные оценки оказываются несущественно ниже (0,611-0,626).

Показатели ожидаемой гетерозиготности в подавляющем большинстве случаев (в 38 из 45) оказались выше, чем наблюдаемой, что может свидетельствовать об определенном уровне инбредованности исследованных животных. Об этом свидетельствуют и позитивные оценки индекса фиксации, отмеченные для свиней крупной белой породы в четырех хозяйствах. Однако достоверные оценки индекса фиксации отмечаются только для животных, разводимых в СХЧП «Техмет-Юг» ($F_{is} = 0,217 \pm 0,080$) и ПАО «Племзавод «Степной» ($F_{is} = 0,198 \pm 0,032$) (табл. 1).

Существенные отклонения распределения генотипов МС-ДНК от равновесия Харди-Вайнберга отмечаются для локусов *S0355*, *S0101* и *S0228*. Для этих локусов достоверные отклонения были зарегистрированы у животных из всех исследованных хозяйств (табл. 2).

Если рассматривать в разрезе хозяйств, то наибольшее число случаев отклонения от равновесного состояния было отмечено у свиней крупной белой породы, разводимых в ПАО «Племзавод «Степной» (в 10 случаях из 12), СХЧП «Техмет-Юг» (в девяти случаях) и ООО «Агрикор-Холдинг» (в восьми случаях).

Для свиней, разводимых в ООО «Таврийские свиньи», большая часть использованных в анализе локусов МС-ДНК, находятся в состоянии генотипического равновесия.

Таблица 2. Результаты проверки состояния генетического равновесия в популяциях свиней крупной белой породы из разных хозяйств по 12 локусам МС-ДНК

Локус	Хозяйство			
	ООО «Таврийские свиньи»	ПАО «Племзавод «Степной»	СХЧП «Техмет-Юг»	ООО «Агрикор-Холдинг»
<i>SW24</i>	**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	моно
<i>S0155</i>	<i>ns</i>	*	***	<i>ns</i>
<i>SW72</i>	<i>ns</i>	***	***	***
<i>SW951</i>	<i>ns</i>	***	***	**
<i>S0386</i>	<i>ns</i>	***	***	***
<i>S0355</i>	***	*	***	*
<i>SW240</i>	<i>ns</i>	***	***	*
<i>SW857</i>	<i>ns</i>	***	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>S0101</i>	*	***	***	***
<i>SW936</i>	<i>ns</i>	***	***	***
<i>SW911</i>	*	моно	<i>ns</i>	моно
<i>S0228</i>	<i>ns</i>	***	***	***

Примечание. моно – локус мономорфный; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; *ns* - $p > 0,05$.

Характерно, что для свиней из СХЧП «Техмет-Юг» и ПАО «Племзавод «Степной» отмечается значительное число уникальных (т.н., «приватных») аллелей, т.е., аллелей, которые зарегистрированы только у животных из данного хозяйства – 23 и 17 аллелей, соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Список «приватных» аллелей (в п.н.) 12 локусов МС-ДНК у свиней крупной белой породы из разных хозяйств

Локус	Хозяйство			
	ООО «Таврийские свиньи»	ПАО «Племзавод «Степной»	СХЧП «Техмет-Юг»	ООО «Агрикор-Холдинг»
<i>SW24</i>	111, 115, 125	-	103, 117, 121	-
<i>S0155</i>	-	154, 156, 164	150, 152, 168	-
<i>SW72</i>	-	121	99, 119, 125, 133	95
<i>SW951</i>	-	-	98, 106	-
<i>S0386</i>	-	186, 188	-	-
<i>S0355</i>	-	241, 269, 275	239, 255, 263	-
<i>SW240</i>	-	-	115	85, 87
<i>SW857</i>	-	-	-	-
<i>S0101</i>	-	185, 189, 191, 197, 205	201	-
<i>SW936</i>	-	87	115	79, 81
<i>SW911</i>	157, 161, 167, 177	-	165, 181	-
<i>S0228</i>	-	246, 268	250, 252, 274	240
В целом	7	17	23	6

В целом, можно говорить о том, что наиболее типичными для породы в целом (т.е., встречались во всех хозяйствах) оказываются аллели, отмеченные для локусов *SW857*, *SW951*, *S0386*, *SW240* и *SW936*. С другой стороны, наиболее специфичными для отдельных хозяйств оказываются аллели, отмеченные для локусов *S0101* и *SW72* – практически $\frac{1}{3}$ и $\frac{1}{4}$ их аллельного разнообразия было зарегистрировано в одном из исследованных хозяйств (ПАО «Племзавод «Степной» и СХЧП «Техмет-Юг», соответственно).

Наличие специфичных («приватных») аллелей приводит к тому, что повышается разнообразие аллельных профилей как среди животных одного хозяйства, так и для породы в целом. Следствием чего является высокая степень подобия в отношении мультилокусных генотипов для 12 использованных в анализе МС-ДНК среди животных, которые разводятся в хозяйствах ООО «Таврийские свиньи» и ООО «Агрикор-Холдинг» (100% и 84,8% особей по результатам Assignment-теста было отнесено к своей собственной популяции, соответственно).

Тогда как для свиней крупной белой породы, что содержатся в ПАО «Племзавод «Степной» и СХЧП «Техмет-Юг», как и следовало ожидать, данный показатель не превышает 60% (табл. 4).

Таблица 4. Результаты Assignment-теста для свиней крупной белой породы из разных хозяйств на основании мультилокусных генотипов для 12 локусов МС-ДНК

Хозяйство	Отнесено к:	
	собственной популяции	чужой популяции
ООО «Таврийские свиньи»	51 / 100,0%	0 / 0,0%
ПАО «Племзавод «Степной»	30 / 60,0%	20 / 40,0%
СХЧП «Техмет-Юг»	44 / 61,1%	28 / 38,9%
ООО «Агрикор-Холдинг»	28 / 84,8%	5 / 15,2%
В целом	153 / 74,3%	53 / 25,7%

Результаты анализа молекулярной вариации (AMOVA) свидетельствуют о том, что 12,2% ($p < 0,001$) общей генетической изменчивости, отмеченной среди исследованных животных, определяется принадлежностью их к хозяйству (т.е., характером селекционной работы в них) (табл. 5).

Таблица 5. Результаты анализа молекулярной вариации (AMOVA) для свиней крупной белой породы из разных хозяйств для 12 локусов МС-ДНК

Источник изменчивости	SS	df	MS	E(MS)	F-статистики	p
Между популяциями	196,787	3	65,596	0,599	$F_{st} = 0,122$	< 0,001
Между особями	1096,696	202	5,429	1,136	$F_{is} = 0,265$	< 0,001
В пределах особей	650,500	206	3,158	3,158	$F_{it} = 0,355$	< 0,001
Суммарная	1943,983	411		4,892		

Рассматривая в разрезе отдельных локусов МС-ДНК, можно отметить, что наибольший вклад во внутрипородную дифференциацию свиней крупной белой породы вносят локусы *SW911* ($F_{st} = 0,581$), *SW24* ($F_{st} = 0,392$), *S0155* ($F_{st} = 0,169$) и *S0386* ($F_{st} = 0,164$). Для остальных локусов, оценки генетической дифференциации были относительно низки (табл. 6).

Таблица 6. Показатели генетической дифференциации (F-статистики) и потока генов (Nm) между свиньями крупной белой породы из разных хозяйств для 12 локусов МС-ДНК

Локус	F_{is}	F_{st}	F_{it}	Nm
<i>SW24</i>	0,142	0,392	0,478	0,39
<i>S0155</i>	0,097	0,169	0,250	1,23
<i>SW72</i>	0,153	0,037	0,185	6,45
<i>SW951</i>	0,114	0,052	0,160	4,52
<i>S0386</i>	0,168	0,164	0,305	1,27
<i>S0355</i>	0,159	0,084	0,230	2,74
<i>SW240</i>	0,280	0,062	0,325	3,76
<i>SW857</i>	0,060	0,057	0,114	4,15
<i>S0101</i>	0,022	0,041	0,063	5,79
<i>SW936</i>	0,269	0,078	0,326	2,96
<i>SW911</i>	0,163	0,581	0,649	0,18
<i>S0228</i>	0,325	0,053	0,361	4,46
В целом	0,163 ± 0,026	0,148 ± 0,049	0,287 ± 0,047	3,16 ± 0,60

С другой стороны отмечается очень низкий уровень гетерозиготности (на уровне отдельных хозяйств) в отношении таких локусов МС-ДНК, как *S0228*, *SW240* и *SW936*.

Поток генов (*Nm*) между отдельными популяциями в среднем составлял 3,16 голов на одно поколение, т.е., свидетельствовал о достаточно интенсивных процессах обмена животными (прежде всего, используемыми в качестве производителей) между отдельными хозяйствами Украины, специализирующимися на разведении свиней крупной белой породы.

Таким образом, вовлечение в анализ большого числа популяций позволяет получить более полную характеристику механизмов формирования генетического полиморфизма свиней крупной белой породы с помощью микросателлитов ДНК и оценку состояния степени родства между ними, как было уже ранее показано в исследовании Н. Зиновьевой и др. (2012).

ВЫВОДЫ

На основе полиморфизма 12 локусов МС-ДНК отмечается высокий уровень генетического разнообразия свиней крупной белой породы, которые содержатся в различных племенных хозяйствах Украины.

В целом для породы идентифицировано 158 аллелей (в среднем 13,2 аллеля на локус). При этом, наиболее типичными для породы в целом (т.е., встречались во всех хозяйствах) оказываются аллели, отмеченные для локусов *SW857*, *SW951*, *S0386*, *SW240* и *SW936*. С другой стороны, наиболее специфичными для отдельных хозяйств оказываются аллели, отмеченные для локусов *S0101* и *SW72* – практически $\frac{1}{3}$ и $\frac{1}{4}$ их аллельного разнообразия было зарегистрировано в одном из исследованных хозяйств (ПАО «Племзавод «Степной» и СХЧП «Техмет-Юг», соответственно).

Результаты анализа молекулярной вариации (АМОВА) свидетельствуют о том, что 12,2% ($p < 0,001$) общей генетической изменчивости, отмеченной среди исследованных животных, определяется принадлежностью их к хозяйству (т.е., селекционной работой в них).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. ВЕЙР, Б. (1995). Анализ генетических данных: Дискретные генетические признаки. Москва. 400 с. ISBN 5-03-002795-5.
2. ЗИНОВЬЕВА, Н.А. и др. (1998). Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. Дубровицы. 47 с.
3. ЗИНОВЬЕВА, Н.А. и др. (2012). Оценка вклада различных популяций в генетическое разнообразие свиней корня крупной белой породы. В: Сельскохозяйственная биология, № 6, с. 35-42. ISSN 0131-6397.
4. ЛУГОВИЙ, С.І. (2013а). Оцінка внутривидової мінливості української м'ясної породи свиней за локусами мікросателітів ДНК. В: Збірник наукових праць Вінницького НАУ. Серія: Сільськогосподарські науки, вип. 2 (72), с. 109-114. ISSN 2306-7799.
5. ЛУГОВИЙ, С.І. (2013б). Оцінка внутривидової мінливості свиней породи дюрк за локусами мікросателітів ДНК. В: Вісник Житомирського національного агроекологічного університету, вип. № 1 (35), т. 2, с. 105-113. ISSN 2310-9262.
6. ЛУГОВОЙ, С.И. (2013). Характеристика генофонда мясных пород свиней украинского происхождения по локусам микросателлитов ДНК. В: Вестник Казанского ГАУ, вып. 2 (28), с. 126-129. ISSN 2073-0462.
7. ТОПИХА, В.С., ЛУГОВОЙ, С.И., КРАМАРЕНКО, С.С. (2010). Анализ генетического разнообразия свиней крупной белой породы на основе мультилокусных генотипов микросателлитов. В: Вісник аграрної науки Причорномор'я, вип. 1 (52), т. 2, с. 3-11. ISSN 2313-092X
8. NIDUP, K., MORAN, C. (2011). Genetic diversity of domestic pigs as revealed by microsatellites: a mini-review. In: Genomics and Quantitative Genetics, vol. 2, pp. 5-18. ISSN 2157-9903.
9. PEAKALL, R., SMOUSE, P. (2006). GENAIEX 6: genetic analysis in Excel: Population genetic software for teaching and research. In: Molecular Ecology Notes, a 6, pp. 288-295. ISSN 1755-0998.
10. TRASPOV, R. et al. (2016). Population structure and genome characterization of local pig breeds in Russia, Belorussia, Kazakhstan and Ukraine. In: Genetics Selection Evolution, vol. 48, nr 16, pp. 1-9. ISSN 1297-9686.

Data prezentării articolului: 21.02.2017

Data acceptării articolului: 15.03.2017