

УДК 636.4:636.082.11

DOI: 10.33284/2658-3135-102-4-132

Генетический анализ митохондриальной и ядерной ДНК свиней кемеровской породы

Н.А. Акопян¹, В.Р. Харзинова¹, С.М. Чыдым², К.В. Жучаев², О.В. Костюнина¹, Н.А. Зиновьева¹

¹Федеральный научный центр животноводства-ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста (п. Дубровицы, Московская обл.)

²Новосибирский государственный аграрный университет (г. Новосибирск)

Аннотация. Кемеровская порода свиней – одна из локальных пород России. Основываясь на анализе полиморфизма контрольного региона мтДНК и 10 микросателлитных локусов, была проведена оценка уровня генетического разнообразия свиней пород кемеровская (n=33), ландрас (n=26), крупная белая (n=59) и дюрок (n=16). Осуществлённый кластерный анализ указывает на высокую степень генетической консолидированности исследуемых популяций. Полученные данные указывают, что кемеровские свиньи характеризуются относительно невысоким уровнем биоразнообразия. Гаплотипы митохондриальной ДНК свиней кемеровской породы более мономорфны и представлены в меньшем количестве, что, по всей видимости, обусловлено малым размером популяции и подтверждается значением среднего числа парных различий между гаплотипами исследованного фрагмента мтДНК ($H_d=0,1794$). Для свиней пород кемеровская, ландрас, дюрок и крупная белая уровень наблюдаемой гетерозиготности (H_o), рассчитанный с использованием микросателлитных локусов, составил 0,545; 0,555; 0,637 и 0,692 соответственно. Результаты проведённых исследований показывают, что для свиней кемеровской породы наблюдается снижение генетического разнообразия. Генетическое равновесие у всех изученных местных пород свиней смещено в сторону гетерозигот с ранжированием коэффициента инбридинга (F_{is}) 0,148 в КЕМ. Данные, полученные от кемеровских свиней по материнской линии и данных микросателлитов, показывают, что эта порода утратила генетическое разнообразие как в своих митохондриальных, так и в ядерных геномах.

Ключевые слова: свиньи, кемеровская порода, мтДНК, гаплотипы, микросателлиты, STR, генетическое разнообразие

UDC 636.4:636.082.11

Genetic analysis of mitochondrial and nuclear DNA of pigs of Kemerovo breed

**Nare A Akopyan¹, Veronika R Harzinova¹, Syrga M Chydym², Konstantin V Zhuchae²,
Olga V Kostyunina¹, Natalya A Zinovieva¹**

¹Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member LK Ernst
(Dubrovitsy, Moscow region, Russia)

²Novosibirsk State Agrarian University (Novosibirsk, Russia)

Summary. The Kemerovo breed of pigs is one of local breeds of Russia. Based on the polymorphism analysis of the control region of mitochondrial DNA and 10 STR loci of the Kemerovo pigs (n = 33) we compared to the most common breeds of pigs: Landrace (n = 26), Large White (n = 59) and Duroc (n = 16), which allowed to assess the level of diversity of the Kemerovo breed. The values of the molecular dispersion demonstrate that Kemerovo pigs are characterized by a relatively low level of genetic diversity. The performed cluster analysis indicates a high degree of genetic consolidation of the studied populations. The data obtained indicate that Kemerovo pigs are characterized by a relatively low level of biodiversity. The haplotypes of mitochondrial DNA of pigs from the Kemerovo breed are more monomorphic and are represented in smaller numbers, which is most likely due to the small population size and is confirmed by the average number of pair differences between the haplotypes of the studied mtDNA fragment ($H_d = 0,1794$). For pig breeds Kemerovo, Landrace, Duroc and Large White, the level of observed heterozygosity (H_o), calculated using microsatellite loci, was 0.545; 0.555; 0.637 and 0.692, respectively. The results of the studies show that a decrease in genetic diversity is observed for pigs of the Kemerovo breed. The genetic

equilibrium of all the studied local breeds of pigs is shifted towards heterozygotes with a ranking of the inbreeding coefficient (F_{is}) of 0.148 in KEM. The data obtained from maternal lineage of the Kemerovo pigs and data from microsatellites show that this breed has lost its genetic diversity in both its mitochondrial and nuclear genomes.

Key words: pigs, Kemerovo breed, mtDNA, haplotypes, microsatellites, STR, genetic diversity.

Введение.

Определение частоты встречаемости различных генетических сочетаний у свиней имеет большое теоретическое и практическое значение для сохранения и рационального использования аллелофонда отечественных пород. К локальным породам относится кемеровская порода свиней. Утверждена в 1961 году. Классической схемой гибридизации в современном свиноводстве является использование ограниченного числа высокопродуктивных пород, таких как крупная белая, ландрас, дюрок, пьетрен и некоторых других (Михайлова О.А., 2016; Столповский Ю.А., 2013).

В условиях ограниченного генофонда локальных и аборигенных пород для поиска возможных путей его расширения требуется детальное изучение не только отцовской, но материнской наследственности. Применение полиморфизма мтДНК для анализа изменений в структуре популяций позволяет определить направления селекции и исследовать популяционно-генетическую динамику демографических показателей по женской линии (Neigel JE and Avise JC, 1986).

Цель исследования.

Характеристика генетического разнообразия кемеровской породы свиней с использованием анализа полиморфизма D-петли митохондриальной ДНК и микросателлитов.

Материалы и методы исследования.

Объект исследований. Свиньи кемеровской, крупной белой, ландрас и дюрок пород.

Обслуживание животных и экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с инструкциями и рекомендациями Russian Regulations, 1987 (Order No.755 on 12.08.1977 the USSR Ministry of Health and «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1996). При выполнении исследований были предприняты усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшения количества используемых образцов.

Схема эксперимента. Исследования проводили в 2018 году на свиньях кемеровской ($n=33$), крупной белой ($n=59$), ландрас ($n=26$) и дюрок ($n=16$) пород.

Выделение ДНК проводили из проб ткани (ушной выщип) с использованием набора DNA 1-Step Tissue & Cells Nexttec™ в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию фрагмента гипервариабельной области D-петли мтДНК домашних свиней длиной 590 п. о. проводили с использованием разработанной нами методики (Акопян Н.А. и др., 2016). Полиморфизм десяти микросателлитных локусов (SW24, S0155, S0355, S0386, SW72, SW951, S0101, SW240, SW857 и SO005) определяли с использованием генетического анализатора ABI 3130xl по разработанной в лаборатории методике (Харзинова В.Р. и др., 2017).

Оборудование и технические средства. Исследования проводили в лаборатории молекулярных основ селекции ФГБНУ ФНИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Набор DNA 1-Step Tissue & Cells Nexttec™ (Nexttec Biotechnologie, Германия), генетический анализатор ABI 3130xl (Applied Biosystems) Секвенирование очищенных фрагментов проводила компания ООО «Евроген» (Россия).

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ контрольного региона мтДНК. Проведён анализ последовательности контрольного региона (D-петли) мтДНК у свиней исследуемых пород. Большинство мутаций было представлено транзициями, соотношение транзиций к трансверсиям составило $R=1,19$ (табл. 1). Секвенирование и последующий анализ показали наличие 9 гаплотипов в популяции кемеровской породы, 13 гаплотипов – у свиней крупной белой породы, 12 гаплотипов – у ландрас и 10 гаплотипов – у свиней породы дюрок. Самым распространённым у кеме-

ровской породы был гаплотип 1, он встречался во всей выборке у 17 исследованных особей. Как показано в таблице 1, в целом по выборке было выявлено 34 переменных сайта.

Таблица 1. Показатели молекулярного разнообразия исследованных пород свиней
Table 1. Molecular diversity indicators of the studied breeds of pigs

Группа/Group	<i>S</i>	<i>Pi</i>	π	<i>Hd</i>	<i>D</i>	<i>h</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
Крупная белая/ Large White	34	0,01480	0,00034	0,9468	0,430	13	1.48	$p>0.10$
Ландрас/Landrace	30	0,01210	0,00030	0,8738	-0,519	12	3.03	$p>0.10$
Дюрок/ Duroc	15	0,00720	0,00023	0,8667	-0,437	10	6.87	$p>0.10$
Кемеровская/ Kemerovo	2	0,00033	0,00011	0,1794	-1,267	9	1.00	$p<0.05$
Выборка в целом/ Sampling as a whole	38	0,01415	0,00046	0,8739	0,407	44	2.39	$p>0.10$

Примечание: тест Hasegawa M (1985), модель (+I); *S* – число переменных сайтов в исследуемом фрагменте мтДНК; *Pi* – среднее число парных различий между гаплотипами; π – нуклеотидное разнообразие; *Hd* – гаплотипическое разнообразие; *D* – коэффициент теста Tajima.

* $P\leq 0.05$; *h* – количество гаплотипов в выборке.

Note: test Hasegawa M (1985), model (+ I); *S* is the number of variable sites in the mtDNA fragment under study; *Pi* is the average number of pairwise differences between haplotypes; π is the nucleotide diversity; *Hd* — haplotypic diversity; *D* is the coefficient of the Tajima test. * $P\leq 0.05$; *h* is the number of haplotypes in the sample.

Среднее гаплотипическое разнообразие (*Hd*) по выборке в целом составило 0,8739. Меньшее количество гаплотипов в популяции свиней кемеровской породы, по всей видимости, обусловлено малым размером популяции, что подтверждается значением среднего числа парных различий между гаплотипами исследованного фрагмента мтДНК, которое оказалось ниже в сравнении с группами свиней ландрас и дюрок. В генофонде кемеровской породы свиней в процессе восстановления популяций от небольшого количества особей могла произойти утрата ряда гаплотипов, что привело к снижению уровня генетического разнообразия.

Значение нуклеотидного разнообразия π у свиней кемеровской породы составило 0,00011, что свидетельствует о возможной депрессии численности или же об относительно недавнем реформировании популяции. В целом меньшие значения молекулярных показателей, характерных для кемеровской породы, статистически достоверно ($P\leq 0.05$) подтверждают, что генетическое разнообразие в данной популяции снижено.

STR анализ. В таблице 2 представлены популяционно-генетические параметры исследуемых групп свиней, рассчитанные на основании полиморфизма микросателлитов. Варьирование среднего числа аллелей на локус (*Na*) у породы LW составило $5,556\pm 0,852$, примерно такая же закономерность отмечается и в отношении числа эффективных аллелей: LW характеризуются максимальным значением данного показателя ($3,305\pm 0,446$ аллелей на локус), а DU – наименьшим ($2,437\pm 0,470$ аллелей на локус). Наблюдаемый нами уровень гетерозиготности составил 0,545; 0,637; 0,692 и 0,555 для KEM, DU, LW и L соответственно (табл. 2). Популяция кемеровской породы свиней характеризуется относительно невысоким уровнем полиморфизма микросателлитов: среднее число аллелей на локус (*Na*) составляет $5,000\pm 0,645$, среднее эффективное число аллелей на локус (*Ne*) – $3,295\pm 0,384$. По всей видимости, это является следствием локальных особенностей разведения кемеровской породы свиней.

Таблица 2. Генетическое разнообразие изучаемых пород свиней по локусам STR
Table 2. The genetic diversity of the studied pig breeds according to STR loci

Показатель/ Indicator	Порода свиней/ Pig breed			
	дюрок/DU	ландрас/L	крупная белая/LW	кемеровская/ КЕМ
Na (M±m)	4,222±0,722	5,000±0,745	6,222±1,090	5,556±0,648
Na _{≥5} % (M±m)	3,111±0,676	3,111±0,423	3,889±0,512	3,778±0,547
Ne (M±m)	2,405±0,380	2,507±0,398	3,067±0,429	3,406±0,421
Pr (M±m)	0,444±0,338	0,222±0,147	1,000±0,527	0,444±0,242
Ho (M±m)	0,637±0,098	0,555±0,100	0,692±0,062	0,545±0,049
He (M±m)	0,509±0,072	0,518±0,074	0,627±0,045	0,660±0,050
Fis (M±m)	-0,227±0,081	-0,044±0,079	-0,099±0,044	0,165±0,052

Примечание: Na – среднее число аллелей на локус; Ne – среднее эффективное число аллелей на локус; Na_{≥5} % – число информативных аллелей;
Pr – число «приватных» аллелей; Ho – наблюдаемая и
He – ожидаемая степени гетерозиготности; Fis – коэффициент инбридинга.

Note: Na is the average number of alleles per locus; Ne is the average effective number of alleles per locus; Na_{≥5} % - the number of informative alleles; Pr is the number of “private” alleles; Ho is the observed and He is the expected degree of heterozygosity; Fis is the inbreeding coefficient.

Одной из уникальных характеристик аллелофонда популяций является наличие (приватных) уникальных аллелей, специфичных для каждой из исследуемых пород свиней. У кемеровской породы свиней приватные аллели были выявлены с частотой 0,444 на локус. Генетическое равновесие у кемеровской породы свиней смещено в сторону недостатка гетерозигот, коэффициента инбридинга (Fis) 0,165 у КЕМ, можно предположить, что эта особенность – следствие продолжительного разведения «внутри» пород, как и было подтверждено на основе анализа мтДНК.

Коммерческие породы свиней характеризуются незначительным избытком гетерозигот, при этом значения FIS составили -0,154, -0,156 и -0,169 для DU, LW и L пород соответственно. Оптимальным числом кластеров для всей исследуемой выборки оказалось K=6 (ΔK=73,34). Проведённый анализ выявил высокую степень генетической обособленности всех исследуемых пород свиней, о чём свидетельствуют средние значения коэффициента подобия Q в каждой породе (QKEM=0,940±0,013, QDU=0,956±0,017, QLW=0,949±0,016 и QL=0,940±0,016). На основании критерия Q к своей собственной популяции было отнесено 100 % особей по всем исследуемым породам.

В результате проведённых нами исследований, направленных на ДНК идентификацию генотипов кемеровской породы свиней, с последующей характеристикой её генетического разнообразия на основании полиморфизма мтДНК и микросателлитов, было выявлено, что кемеровские свиньи характеризуются относительно невысоким уровнем генетического разнообразия в сравнении с наиболее распространёнными породами – крупная белая, ландрас и дюрок. Кластерный анализ выявил высокую степень генетической консолидированности каждой из исследуемой пород, что свидетельствует об уникальности их аллелофонда.

Выводы.

Изученная популяция кемеровской породы по сравнению с коммерческими породами свиней демонстрирует сниженное генетическое разнообразие в популяции, что позволит скорректировать направление селекционно-племенной работы и увеличить популяционные параметры, характеризующие генетическое разнообразие.

Литература

1. Акопян Н.А., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Исследование последовательности D-петли митохондриальной ДНК у свиней пород крупная белая и ландрас, разводимых в России // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30. № 7. С. 93-95 [Akopyan NA, Kostyunina OV, Zinovieva NA. Study of d-loop sequence of mtDNA of Large White and Landrace breeds of pigs bred in Russia. Siberia. Achievements of Science and Technology of AIC. 2016;30(7):93-95. (In Russ)].
2. Михайлова О.А. История выведения и проблема сохранения редких и исчезающих пород свиней // Свиноводство. 2016. № 1. С. 8-11. [Mikhailova OA. The history of breeding and preservation of rare and endangered breeds of pigs. Pigbreeding. 2016;1:8-11. (In Russ)].
3. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация кемеровской породы свиней на основе STR-анализа / В.Р. Харзинова, К.В. Жучаев, О.В. Костюнина, М.Л. Кочнева, С.М. Чыдым, Н.А. Зиновьева // Достижения науки и техники АПК. 2017. Т. 31. № 6. С. 62-64. [Kharzinova VR, Zhuchayev KV, Kostyunina OV, Kochneva ML, Chydym SM, Zinovieva NA. Molecular-genetic identification and certification of Kemerovo breed of pigs based on STR-analysis. Achievements of Science and Technology of AIC. 2017;31(6):62-64. (In Russ)].
4. Столповский Ю.А. Популяционно-генетические основы сохранения генофондов domesticированных видов животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4-2. С. 900-915. [Stolpovskiy Yu.A. Population genetics studies underlying preservation of domesticated animal species gene pools. Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(4-2):900-915. (In Russ)].
5. Neigel JE, Avise JC. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. Evolutionary Processes and Theory. Karlin S, Nevo E, editors. New York: Academic Press; 1986: 515-534.

References

1. Akopyan NA, Kostyunina OV, Zinovieva NA. Study of d-loop sequence of mtDNA of Large White and Landrace breeds of pigs bred in Russia. Siberia. Achievements of Science and Technology of AIC. 2016;30(7):93-95.
2. Mikhailova OA. The history of breeding and preservation of rare and endangered breeds of pigs. Pigbreeding. 2016;1:8-11.
3. Kharzinova VR, Zhuchayev KV, Kostyunina OV, Kochneva ML, Chydym SM, Zinovieva NA. Molecular-genetic identification and certification of Kemerovo breed of pigs based on STR-analysis. Achievements of Science and Technology of AIC. 2017;31(6):62-64.
4. Stolpovskiy Yu.A. Population genetics studies underlying preservation of domesticated animal species gene pools. Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(4-2):900-915.
5. Neigel JE, Avise JC. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. Evolutionary Processes and Theory. Karlin S, Nevo E, editors. New York: Academic Press; 1986: 515-534.

Акопян Наре Акоповна, младший научный сотрудник, Федеральный научный центр животноводства-ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 142132, Московская область, г. о. Подольск, п. Дубровицы, дом 60, тел.: +79169163070, e-mail: parlenare@gmail.com

Харзинова Вероника Руслановна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный научный центр животноводства-ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 142132, Московская область, г. о. Подольск, п. Дубровицы, дом 60, тел.: +19258790712, e-mail: veronika0784@mail.ru

Чыдым Сырга Мартооловна, аспирант, Новосибирский государственный аграрный университет, 630039, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, e-mail: chydym.syrga@yandex.ru

Жучаев Константин Васильевич, доктор биологических наук, профессор, декан биолого-технологического факультета, Новосибирский государственный аграрный университет, 630039, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, e-mail: nsau@inbox.ru

Костюнина Ольга Васильевна, доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярных основ селекции, Федеральный научный центр животноводства-ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 142132, Московская область, г.о. Подольск, п. Дубровицы, дом 60, тел.: +79037415635, e-mail: kostolan@yandex.ru

Зиновьева Наталья Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, директор, Федеральный научный центр животноводства-ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 142132, Московская область, г.о. Подольск, п. Дубровицы, дом 60, e-mail: zinovieva@mail.ru

Поступила в редакцию 30 октября 2019 г.; принята после решения редколлегии 16 декабря 2019 г.; опубликована 31 декабря 2019 г. / Received: 30 October 2019; Accepted: 16 December 2019; Published: 31 December 2019