

points. The highest average daily gains, comparatively with average for all estimated boars were in posterities of a boar Tsukat 7931 (758 g), they have reached the plan live mass for the shortest period 183 days at the expenditure of 3,24 food units on 1 kg of a gain of live mass.

УДК 577.21; 636.4.082

Почерняєв К.Ф., кандидат біологічних наук
Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН
Ломако Д.В., кандидат сільськогосподарських наук
Полтавська державна аграрна академія

ГЕНЕТИЧНЕ РІЗНОМАНІТТЯ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ ГЕНОМІВ СВИНЕЙ ВЕЛИКОЇ ЧОРНОЇ ПОРОДИ

Рецензент – кандидат біологічних наук В.М. Балацький

Оцінка генетичного різноманіття мітохондріальних геномів популяції свиней великої чорної породи було досліджено методом ПЛР-ПДРФ. Використаний підхід дозволяє одночасно визначати однонуклеотидні поліморфізми мітохондріального геному свині 15558 C>T, 15580T>C, 15616C>T, 15714T>C та 15758T>C. Серед досліджених представниць різних родин ідентифіковано шість мітохондріальних гаплотипів. Гапloidне різноманіття цієї породи найвище серед шести малочислених порід свиней України (H=0,325). Це вказує на значну ступінь генетичної ерозії великої чорної породи в Україні.

Ключові слова: свині, велика чорна порода, генетичне різноманіття, генетична ерозія, ПЛР, ПДРФ, мітохондріальна ДНК, однонуклеотидний поліморфізм.

Постановка проблеми. Велику чорну породу свиней за класифікацією ФАО відносять до міжнародних транскордонних порід, які зустрічаються більше ніж у одній країні. Через це, її не варто відносити до локальних порід свиней України. З історії породи відомо, що за часів Радянського Союзу вона завезена з Німецької Демократичної Республіки у 1947 році по репарації. Спочатку тварини були розміщені в Ставропольському краї, а згодом переведені до племзаводу «Большевик» Тульської області. За рахунок завезення в Україну з цього господарства цілого стада, було створено племзавод «Краматорський», нині – племзавод «Червона Зірка» Костянтинівського району Донецької області. Вже на 1 січня 1964 року загальне поголів'я племінних тварин у господарствах України склало 5559 голів [1]. У Німеччині, звідки були вивезені тварини, що дали початок популяції свиней в Україні, ця порода мала назву Корнуельська, оскільки перші тварини великої чорної породи завезені в 1896 р. у Західну Пруссію з графства Корнуел. В НДР у 1946 році вона розводилась у 31 господарстві та налічувала всього 33 племінні кнурі та 177 свиноматок [2]. У популяціях, що підлягали різкому зменшенню чисельності і пройшли через «шийку пляшки», як правило, спостерігається зменшення генного різноманіття. У таких стадах, для планування селекційно-племінної роботи, в тому числі і обґрунтування завезення племінних тварин, необхідно визначати генетичне різноманіття. Цей показник, можна визначати шляхом дослідження генетичних маркерів як ядерного, так і мітохондріального геномів.

До пріоритетних досліджень і розробок управління генетичними ресурсами тварин ФАО відносить розробку й застосування методів молекулярно-генетичного і фе-

нотипового опису, а також накопичення знань, пов'язаних з породою та особливості її розведення. Крім того, наголошується на необхідності розробки методів оцінки ступеня генетичного «розбавлення» (ерозії) породи. Об'єднання результатів таких досліджень з регулярною інвентаризацією надасть інформацію про статус ризику та заходи для запобігання зниження генетичного різноманіття [3]. З огляду на це, метою даної роботи було визначення генетичного різноманіття мітохондріального геному свиней великої чорної породи.

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми. Маркери мітохондріального геному успадковуються по материнській лінії завдяки передачі мітохондріальної ДНК (мтДНК) свинці від матері, бабки, прабабки і так далі. Кнурцю мітохондріальна ДНК теж передається від матері, але на далі не успадковується нащадками. Мінливість мітохондріальної ДНК забезпечує не комбінаційна мінливість, а тільки мутаційна. Так, за 500 тисяч років еволюції у різних підвидів дикої свині, завдяки мутаціям, накопичився внутрішньовидовий поліморфізм мітохондріальної ДНК. Під час одомашнювання різних підвидів диких свиней у різних місцевостях, яке відбувалося приблизно 9 тисяч років по тому, характерні поліморфізми мітохондріальної ДНК перейшли до порід свійських свиней. Низку однонуклеотидних поліморфізмів мітохондріальної ДНК вже встановлено серед найбільш поширених євро-американських та азійських порід домашніх та підвидів диких свиней [4, 5, 6, 7]. Вони визначались методом сиквенсу, що вимагає обладнання і реагентів високої вартості. Спрощений підхід з використанням методу ПЛР-ПДРФ аналізу, розроблений в Інституті свинарства дозволяє визначати 5 з 27 однонуклеотидних поліморфізмів визначених сиквенсом. Він дозволяє розрізнити 18 варіантів (гаплотипів) мітохондріальної ДНК [8].

Мета досліджень та методи їх проведення. Зразки крові 26 голів свиней основних родин великої чорної породи були відібрані у племінному заводі «Терни» агрофірми «Низи» Недригайлівського району Сумської області. Виділення ДНК проводили з використанням іонообмінної смоли «Chelex-100» [9]. Ампліфікацію фрагменту D-петлі, що знаходиться між позиціями 15534 та 15962 мітохондріального геному, проводили на програмованому термостаті ТЕРЦИК-2 (ДНК-Технологии, Росія) з використанням набору реагентів «ТАПОТИЛИ» (ГосНИИ генетики микроорганизмов, Росія) та олігонуклеотидних праймерів власного дизайну [10]: МІТPRO2F: САТАСАААТАТGTGACCCCAA, МІТPROR: GTGAGCATGGGCTGATTAGTC. Аліквоту продукту ПЛР (5 мкл) гідролізували ендонуклеазою *TasI* (МВІ Fermentas, Литва).

Продукти ампліфікації й гідролізу ДНК аналізували у 8% поліакриламідному гелі. Як маркер молекулярної маси використовували ДНК плазмиди *pBR322*, гідролізованої ендонуклеазою *MspI*. Візуалізацію продуктів ампліфікації та рестрикції здійснювали шляхом фарбування гелів бромистим етидієм і фотографуванням на транс-ілюмінаторі в ультрафіолетовому світлі. Даний підхід дозволяє одночасно визначати однонуклеотидні поліморфізми мітохондріального геному свині 15558 Т > А, 15580 С > Т, 15616 Т > С, 15714 С > Т та 15758 С > Т. Оцінку гаплотипного різноманіття мітохондріальних генів свиней проводили з використанням програми GENALEX 6 [11].

Результати досліджень. Популяція свиней племзаводу формувалась з тварин племзаводів «Большевик» Тульської області та «Красная звезда» Донецької області. На час проведення дослідження в господарстві налічувалося 12 основних кнурів-плідників 7 генеалогічних ліній та 136 основних свиноматок, які відносилися до 4 генеалогічних родин: Ками, Ветки, Ліри та Грації.

Використання методу ПЛР-ПДРФ дозволило визначити у вибірці основних свиноматок великої чорної породи шість мітохондріальних гаплотипів (таб.1).

1. Характеристика мітохондріальних гаплотипів свиней великої чорної породи

Варіабельні нуклеотидні позиції мітохондріального геному свині					Довжина рестриктних фрагментів <i>TasI</i> ділянки D-петлі мітохондріального геному свині у парах нуклеотидів, що визначають гаплотип	Відповідність мітохондріальних гаплотипів певним породам свиней за літературними джерелами [4,5,6,7]
15558	15580	15616	15714	15758		
T	T	V*	V	V	383/23/22	B1 миргородська, полтавська м'ясна
V	T	V	V	V	383/45	B2 унікальний гаплотип
T	V	T	V	V	346/60/22	C гемпшир, європейський материнський тип ландрасу, європейська дика свиня
T	V	T	T	T	203/180//23/22	J1 мейшан, уельс, та азійський материнський тип 1 великої білої
V	V	T	T	T	203/180/45	J2 унікальний гаплотип
T	T	V	T	T	203/136/44/23/22	N велика біла азійський материнський типу 2

Примітка: * V може бути A, C, G але не T.

Ці гаплотипи зустрічаються і в інших породах свиней. Найбільшу частку (0,54) мав гаплотип **C** властивий породам гемпшир, європейському материнському типу породи ландрас та європейській дикій свині. Гаплотип **J1** притаманний породам уельс, мейшан та азійському материнському типу 1 великої білої, зустрічався з частотою 0,12. Частота гаплотипу **N**, що зустрічається у свиней великої білої породи і визначає азійський материнський тип 2, у свиней великої чорної породи склала 0,08. Достатньо значну частку (0,19) мав гаплотип **B1**, найпоширеніший серед тварин миргородської породи (рис. 1). Поясненням поширення гаплотипу **B1** серед тварин цього стада можливо є те, що у господарстві в минулому існував племінний завод з розведення миргородської породи. Інші два гаплотипи утворилися шляхом мутації, що призвела до зникнення сайту рестрикції *Tas I* (\downarrow AATT) в позиції 15558 мітохондріального геному свині, умовно названі **B2** та **J2**, зустрічались у дослідженій вибірці тварин з частотою 0,04.

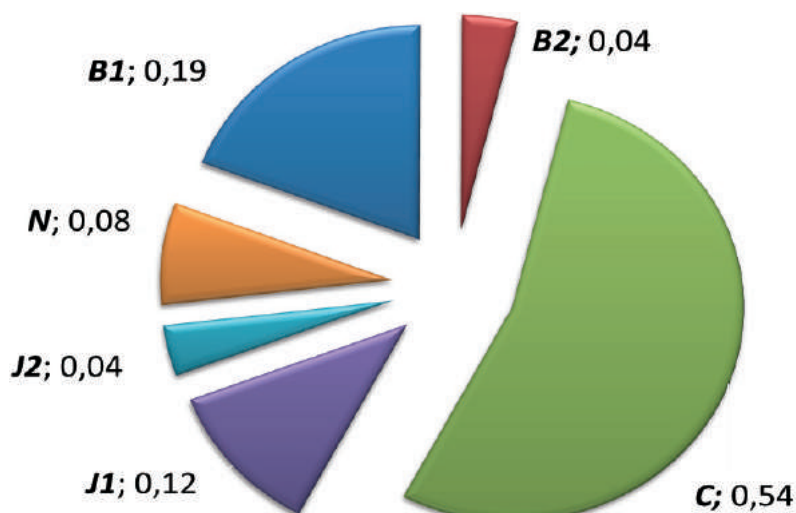


Рис 1. Діаграма частот зустрічання різних мітохондріальних гаплотипів серед свиней великої чорної породи

Генеалогічні (формальні) лінії не мають великого самодостатнього значення у генетичному удосконаленні порід та інших популяцій сільськогосподарських тварин,

дають комплексне часове і просторове уявлення про їхню загальну структуру й повинні оцінюватись за числом виділених з них заводських та індивідуальних ліній і можливістю повторення вдалих генеалогічних поєднань [12]. Провідною теоретичною і практичною метою розведення за лініями є фенотипова і генотипова диференціація порід на якісно специфічні консолідовані групи, їх структуризація як складних біологічних систем, забезпечення необхідного рівня внутріпородної міжгрупової мінливості [12]. Аналіз відповідності гаплотипів певним родинам свиноматок визначив значну гетерогенність. Іншими словами, у тварин однієї родини було знайдено різні гаплотипи, що виключає можливість їхнього походження від однієї родоначальниці.

Таким чином, одним із шляхів рішення проблем, що виникають при розведенні свиней за генеалогічними родинами, може стати залучення даних, щодо поліморфізму мітохондріальної ДНК. Виявлені серед тварин великої чорної породи шість мітохондріальних гаплотипів, з одного боку, дозволяють проводити паспортизацію родин і чіткий генетичний контроль походження та гомогенності родин. Молекулярно-генетичні маркери, що стійко успадковуються в ряді поколінь доцільно використовувати також для захисту інтелектуальної власності селекціонерів при створенні, апробації і використанні спеціалізованих материнських ліній.

З іншого боку, наявність серед даної популяції структурованої на чотири генеалогічні родини шести мітохондріальних гаплотипів свідчить про процеси міграції до стада гаплотипів інших родин, а, можливо і порід. Оцінка ступеня генетичної ерозії породи, згідно доповіді комісії з генетичних ресурсів у галузі продовольства і сільського господарства ФАО, віднесена до пріоритетних досліджень і розробок управління генетичними ресурсами тварин. Станом на 2010 рік в Україні нараховувалося всього 2305,00 племінних свиней великої чорної породи. Незважаючи на це, у цієї породи знайдено значне гаплотипне різноманіття ($H=0,325$), яке виявилось найвищим серед шести малочисельних порід свиней України (рис. 2) [13]. Це свідчить про те, що в українській популяції великої чорної породи відбуваються процеси генетичної ерозії породи.

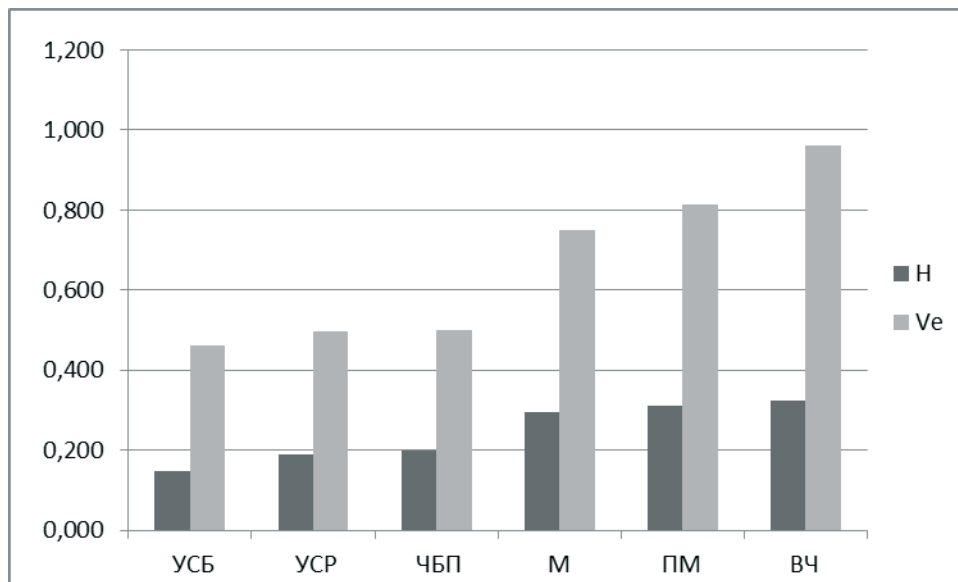


Рис. 2. Діаграма гаплотипного різноманіття мітохондріальних геномів свиней шести малочисельних порід України

Однією з причин цього явища, на нашу думку, є домінування чорного кольору щетини, який визначається алелями гену рецептору меланокортину 1 (MC1R) [14] над іншими кольоровими варіантами забарвлення – чорно-рябим, червоним, червоно-чорно-рябим та чорнопоясним.

Що стосується присутності мітохондріальних гаплотипів властивих породам свиней з білим кольором щетини, то при схрещуванні гібридів F1 біло-щетинних та

чорно-щетинних свиней завжди буде відбуватися розщеплення з утворенням однієї четвертої частини нащадків гомозиготних чорно-щетинних тварин, а при схрещуванні таких гібридів з чистопорідними тваринами великої чорної породи – у половини. Мітохондріальні маркери стійко успадковуються в ряді поколінь і можуть свідчити про інтрогресію, яка траплялась за всі часи існування породи.

Висновки.

1. ПЛР-ПДРФ аналіз поліморфізму ділянки D-петлі мітохондріальної ДНК великої чорної породи свиней визначив 6 мітохондріальних гаплотипів, що утворюють характерний порідний патерн мітохондріальних гаплотипів – гаплогрупу.

2. У свиноматок великої чорної породи знайдено мітохондріальний гаплотип **B1**, який зустрічається тільки у свиней миргородської та полтавської м'ясної порід, що вказує на можливу інтрогресію генів названих порід до популяції племінного заводу "Терни".

3. Знайдені унікальні мітохондріальні гаплотипи **B2** та **J2**, які зустрічаються тільки у свиней великої чорної породи, можуть бути породоспецифічними генетичними маркерами.

4. Дані поліморфізму мітохондріального геному в якійсь мірі можуть усунути сформоване формальне відношення до генеалогічних родин у свинарстві та спланувати селекційні заходи впорядкування структури породи.

5. Незважаючи на критичний стан великої чорної породи у зв'язку з скороченням чисельності популяція має значне гаплідне різноманіття ($H=0,325$), що було найвищим серед шести малочисельних порід свиней України і вказує на генетичну ерозію породи.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Програма селекції з локальними та зникаючими генотипами свиней України на 2003-2012 роки / Мельник Ю.Ф. та інші. – Полтава: ПОКППІТ «Освітінфоком». – 2003. – 104 с.

2. Руководство по разведению животных / Ред. Харинг Ф. М.: «Колос». – 1965. – Т.Ш. – Кн.2. – 424 с.

3. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by B. Rischkowsky, D.Pilling / FAO. - 2007. – Rome // «Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства» / FAO, 2010. ВИЖ РАСХН, 2010. Москва /Перевод с англ.

4. Giuffra E. The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression / E.Giuffra, J.M.H.Kijas, V.Amarger, O.Carlborg Jeon J.-T., Andersson L. // Genetics. – 2000. – V. 154. – P. 1785-1791.

5. Kim K-I. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism / K-I.Kim, J-H. Lee, K. Li, Y-P. Zhang, S-S.Lee, J. Gongora, C. Moran // Anim. Genet. – 2002 – V.33. – P. 19-25.

6. Okumura N. Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs / N. Okumura, Y. Kurosawa, E. Kobayashi, T. Watanobe, N. Ishiguro, H. Yasue, T.Mitsuhashi // Anim. Genet. – 2001. – V.32. – P. 139-147.

7. Fang M. Mitochondrial haplotypes of European wild boars with $2n=36$ are closely related to those of European domestic pigs with $2n=38$ / M.Fang, F.Berg, A.Ducos L.Andersson // Animal genetics. – 2006. – V.37. – P.459-464.

8. Почерняєв К.Ф. Спосіб визначення мітохондріальних гаплотипів свиней / Деклараційний патент України №A61D7/00 з пріоритетом від 16.05.2005, бюлетень №5.

9. Walsh P.S. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material / P.S.Walsh, D.A.Metzger, R.Higuchi // BioTechniques. – 1991. – №10. – P. 506.

10. Почерняев К.Ф. Визначення гаплотипів свиней з використанням методу породо-специфічного ПЛР-ПДРФ мітохондріальної ДНК / К.Ф. Почерняев // Ветеринарна біотехнологія. – 2005. - №6. – С.138 – 143.

11. Peakall R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall and P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – 6. – P. 288 – 295.

12. Буркат В.П. Генезис понять і методів та сучасний селекційний контекст розведення тварин за лініями / В.П.Буркат, Ю.П.Полупан // Розведення і генетика тварин. – К.: Аграрна наука, 2005. – Вип. 38. – С.3 – 36.

13. Почерняев К.Ф. Оцінка генетичної різноманітності локальних порід свиней України за поліморфізмом мітохондріальної ДНК / Почерняев К.Ф. // Свинарство / Редкол: В.М.Волощук (відп. ред.) та ін. – Полтава, 2012. – Вип. 60. – С.71-76.

14. Kijas J. M. H. Melanocortin Receptor 1 (MC1R) Mutations and Coat Color in Pigs / J.M.H.Kijas, R.Wales, A.Törnsten, P.Chardon, M.Moller, L.Andersson // Genetics – 1998. – V.150. – P.1177-1185.

Почерняев К.Ф., Ломако Д.В. Генетическое разнообразие митохондриальных геномов свиней крупной черной породы.

Оценка генетического разнообразия митохондриальных геномов крупной черной породы свиней была проведена методом ПЦР-ПДРФ. Такой подход позволяет одновременное определение однонуклеотидных полиморфизмов митохондриального генома свиней: 15558S>T, 15580T>C, 15616S>T, 15714T>C и 15758T>C. Среди изученных представителей различных семейств определили шесть митохондриальных гаплотипов. Гаплоидное разнообразие этих свиней является самым высоким среди шести украинских малочисленных пород ($H=0,325$). Это указывает на значительную степень генетической эрозии крупной черной породы в Украине.

Ключевые слова: свиньи, великая черная порода, генетическое разнообразие, генетическая эрозия, ПЛР, ПДРФ, митохондриальная ДНК, однонуклеотидный полиморфизм.

K.F. Pochernyaev., D.V. Lomako. Genetic diversity of mitochondrial genomes the Large Black pig breed

The estimation of genetic diversity of mitochondrial genomes of a the Large Black was carried out by PCR-RFLP. This approach allows the simultaneous determination of single nucleotide polymorphisms of the mitochondrial genome of pigs: 15558A>T, 15580T>C, 15616S>T, 15714T>C and 15758T>C. Among the studied representatives of different families it was identified six mitochondrial haplotypes. Haploid diversity these pigs is the highest among the six Ukrainian of little numeral breeds ($H=0,325$). This indicates a significant degree of genetic erosion of the Large Black breed in Ukraine.