

Dudka O. I. The influence of inbreeding on the reproductive qualities of pigs
*The influence of inbreeding on the reproductive capacity of sows Ukrainian Steppe White (USW) and Motley (USM) breeds was studied. The cases of distant (IV-V, V-V, V-VI) inbreeding in the studied herds are in the range: 0.7 ... 8.0%, mild (III-III, III-IV) – 73.5 ... 90.2, close (II-III, II-II, III-II) – 8.4 ... 22.5 and close (I-II, II-I, II-II) – 0.7 ... 5.0%. It has been established that the index of prolificacy of sows USW breed, which have mild and distant degrees of inbreeding, increases in comparison with outbreed and inbreed animals by 2.8 and 3.7% ($P \geq 0.95$). With a further increase in the level of inbreeding, the prolificacy decreases by 8.9 ... 11.1% and the litter of pigs by 4.5 ... 5.7%. In the herd of USW with increasing degree of kinship, the reproductive qualities of sows are increased, and the optimum prolificacy and the litter of pigs are reached with inbreeding coefficients of 12.5% and 3.12%, respectively. Increasing the indexes of all features of inbreed and outbreed animals is 0.6 animals ($P \geq 0.999$) and 6.1 ($P \geq 0.95$) and 7.9 ($P \geq 0.99$) kg, respectively. The combination of inbred boars with sows of a different stepwise-inbred coefficient in the USW breed herd ensured the maximum level of prolificacy: $VIV-III \times \text{♀}IV-IV$ and $III-III$, respectively 14 and 15 animals, with a predominance of outbreeds by 1.3 ... 4.3 animals or 21.5 ... 40.2%. In the herd of the USM breed in the combinations $\text{♂}III-III$ and $IV-IV \times IV-III$ – 12.0 and 12.5 animals, respectively and 2.1 and 2.6 animals, or 21.2 and 26.3%.
Keywords: pigs, breed, reproductive qualities of sows, related breeding, degree and coefficient of inbreeding, outbreeding.*

УДК 577.21; 636.082.12

ПАНЕЛЬ ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ Y-ХРОМОСОМИ КНУРА

Почерняєв К.Ф. доктор сільськогосподарських наук
k.f.pochernyaev@gmail.com

Корінний С.М. кандидат сільськогосподарських наук
korinny_sergey@ukr.net

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН
36013, м. Полтава, вул. Шведська могила, 1.

Найбільш точні результати генетичних досліджень можна отримати залучивши до аналізу нуклеотидні послідовності, які успадковуються за Менделем, так і ті, що не рекомбінують – мітохондріальної ДНК, (материнське успадкування) та Y-хромосомальної ДНК (батьківське успадкування). Значні можливості Y-хромосоми як об'єкту досліджень пов'язані з її гаплотипністю. В інших хромосомах відбувається обмін інформацією між гомологічними ділянками під час мейозу, тоді, як лише мутації впливають на мінливість Y-хромосоми і вона передається з покоління в покоління у вигляді одного гаплотипу. Для генетичної експертизи у світовій практиці частіше використовують ДНК-маркери, поліморфізм яких обумовлений різною кількістю тандемних повторів – мікросателіти. За останнє десятиліття Y-хромосомні мікросателіти, які мають батьківське успадкування, дали змогу виявити значні відмінності між статями в демографічній історії та популяційних процесах людини. Проте, за деякими винятками, генетичні дані щодо дослідження батьківських ліній були відсутні для більшості інших видів ссавців. На думку М. Р. Greminger et al. (2010), цей дефіцит може бути пов'язаний з труднощами розроблення Y-специфічних генетичних маркерів у сільськогосподарських видів тварин та загальним низьким рівнем поліморфізму, що спостерігаються на Y-хромосомі. На цю проблему

вказує і O. Ramirez et al. (2009). Незважаючи на це, через величезну значущість Y-хромосомних маркерів для аналізу *Sus scrofa*, генетичні дослідження у цьому напрямку продовжуються. Після визначення специфічних для Y-хромосоми кнура мікросателітів, L. Iacolina et al. (2016) стало можливим за рахунок адаптації до наявного в системі НААН обладнання та реактивів створити панель олігонуклеотидних праймерів для аналізу мікросателітних ДНК-маркерів локалізованих на ділянці Y-хромосоми кнура. Для цього була розроблена панель 4 пар праймерів для аналізу Y-хромосомних мікросателітів, яка дозволяє виконувати аналіз без капілярних сиквенаторів та значних витрат на реактиви. Ампліфікація Y-хромосомних мікросателітів свині YLI01, YLI05, YLI10 дозволила отримати специфічні ПЛР-продукти. Ампліфікація мікросателіту YLI03 продемонструвала у можливному діапазоні розмірів алелей наявність двох фрагментів ДНК. Найбільш імовірним поясненням цього є локалізація цього мікросателіту на ділянці Y-хромосоми, що рекомбінує і тому мікросателіт YLI03 має свого гомолога на X-хромосомі. Дослідженням встановлений певний діапазон розмірів алелів мікросателітів Y-хромосоми кнура: YLI01 від $(GT)_8$ до $(GT)_{22}$, YLI03 від $(CA)_2TA(CA)_{10}$ до $(CA)_2TA(CA)_{19}$, YLI05 від $(CA)_2C(CA)_9$ до $(CA)_2C(CA)_{22}$ та YLI10 від $(GT)_{12}$ до $(GT)_{20}$. Розроблену панель 4 пар праймерів для аналізу Y-хромосомних мікросателітів доцільно залучити до генетико-популяційних досліджень свиней та визначення можливості її використання для ідентифікації тварин, підтвердження походження, аналізу належності до певних порід та ліній.

Ключові слова: свиня, мікросателіт, ПЛР, *Sus scrofa*, YLI01, YLI03, YLI05, YLI10, Y-хромосома.

Ефективність племінної та селекційної роботи в значній мірі залежить від можливості ідентифікації племінних тварин, встановлення їх походження, точності у записах родоводів. Такі дослідження, за звичай, проводяться за допомогою мікросателітного аналізу батьків і нащадків. По іншому, мікросателіти мають назву короткі тандемні повтори (англ. *short tandem repeats*, STR).

Хід проведення визначення походження (батьківства – материнства) нащадків, проведення генетичної експертизи походження племінних тварин, ембріонів, клонів, ідентифікації особин, дослідження генеалогічної чистоти ліній та родин тварин виду *Sus scrofa* описані у Інструкції з геномного типування в свинарстві для проведення генетичних досліджень за ДНК-маркерами. Практичне виконання цього дослідження, ускладняється рядом причин: підвищенням собівартості оцінених племінних тварин, через вартість генетичної експертизи походження, затрати на проведення якої держава не відшкодовує; обмеженою кількістю установ (лабораторій генетичного контролю) здатних проводити генетичну експертизу походження; короткий термін (1–3 роки) використання плідників, що приводить до відсутності біологічного матеріалу батьків при проведенні генетичної експертизи походження нащадків. Іншим ускладненням є висока собівартість обладнання – капілярних сиквенаторів для електрофоретичного фракціонування мікросателітів.

Подолати, у певній мірі деякі з цих ускладнень, можливо залучивши до арсеналу генетичної експертизи походження племінних тварин ДНК-маркери, що успадковуються без змін по батьківській лінії, а проведення такого дослідження не потребує капілярних сиквенаторів. Таким чином, розроблення панелі праймерів для аналізу Y-хромосомних мікросателітів, що дозволяють аналізувати їх на наявному в системі НААН обладнанні та реактивах було метою даної роботи.

Матеріали і методи. Біоінформаційні дослідження мікросателітів *Sus scrofa* LI01 YLI03 та YLI05, YLI10 виконано з використанням нуклеотидних по-

слідовностей GenBank: KX519700.1 та LT634572.1. Для конструювання системи праймерів за термодинамічними характеристиками, була використана комп'ютерна програма FastPCR [1].

Для молекулярно-генетичних досліджень були використані зразки сперми 3 кнурів великої білої породи ТОВ Експерт-Агротрейд, Дніпропетровська обл. Виділення ДНК з сперми виконували з використанням іонообмінної смоли Chelex-100 згідно Walsh P.S. et al. (1991) [2]. Ампліфікацію ДНК за допомогою ПЛР проводили з використанням рекомбінантної Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), відповідно до інструкцій виробника. Для аналізу Y хромосомних мікросателітів були використані праймери синтезовані (Metabion international AG, ФРН), табл.1.

1. Нуклеотидна послідовність праймерів для ампліфікації Y-хромосомних мікросателітів свині

Назва	Нуклеотидна послідовність 3'-5'	Розміри в парах нуклеотидів за послідовністю GenBank: LT634572.1, у дужках вказані розміри прототипу [3]
YLI01mF	cacatacatgtgtatttttacg	112 (249)
YLI01mR	tttagggccacacctacag	
YLI10mF	gcataggggaactgactctgag	84 (240)
YLI10mR	ttcccatggtttacacatgac	
YLI03mF	tccgtcaaacgtgaaataagc	140 (190)
YLI03mR	gcttatcaactcatgggtgtg	
YLI05mF	gcaaagggtcaaacctccaca	107 (233)
YLI05mR	gcaagaatacccctctgtatt	

Ампліфікацію проводили на програмованому термостаті Терцик-2 (ДНК-технології, РФ). Продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу у 8% денатуруючому поліакріламідному гелі за температури 50°C в камері вертикального електрофорезу omniPAGE Maxi 20 × 20см (Cleaver Sci. Ltd Великобританія) в буфері 1 × TBE. Як маркер молекулярної маси використовували ДНК *pUC19/Msp I* (Thermo Fisher Scientific) та алейну драбину D8S1179 (ТАПОТИЛИ, РФ). Після закінчення електрофорезу гель фарбували розчином бромистого етидію (10 мг/см³) і фотографували результати електрофорезу системою гель-документації MicroDOC Gel Documentation Digital camera with UV Transilluminator (Cleaver Sci. Ltd Великобританія). Розмір ПЛР-продуктів визначали за допомогою програми Fragment Size Calculator [3].

Результати й обговорення. Виконані біоінформаційні дослідження дозволили отримати структуру праймерів, що дозволяють отримувати ПЛР-продукт меншого у порівнянні з прототипом розміром табл.1.

Ампліфікація Y-хромосомних мікросателітів свині YLI01 рис.1 та YLI05, YLI10 рис.2 дозволила отримати специфічні ПЛР-продукти. Ампліфікація мікросателіту YLI03 продемонструвала у можливому діапазоні розмірів алелей наявність двох фрагментів ДНК.

У тварин великої білої породи було визначено алель мікросателіту YLI01 розміром 84 п.н., що відповідає мікросателітній нуклеотидній послідовності з вісьма тандемними повторами (GT)₈. За наявною в GenBank нуклеотидною послідовністю KX519700.1 раніше було відомо мікросателітний алель з двадцять двома тандемними повторами (GT)₂₂. Таким чином, наші дослідження встановили певний діапазон, від (GT)₈ до (GT)₂₂ можливих алелів цього локусу.

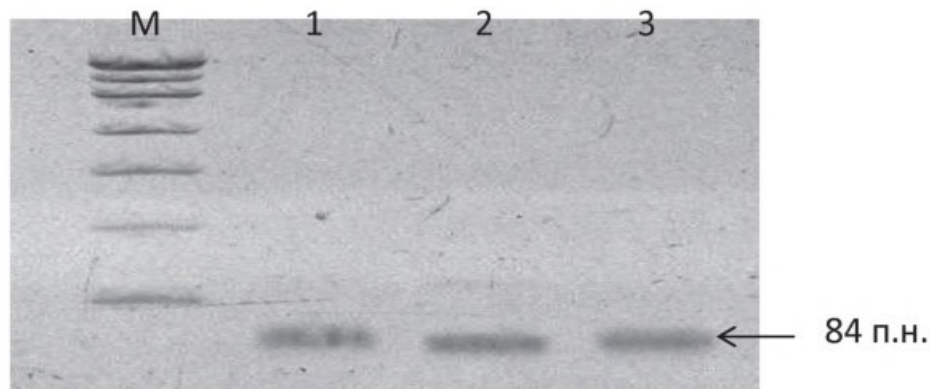


Рис. 1. Електрофорез у 8 % поліакриламідному гелі продуктів ПЛР-ампліфікації мікросателітів Y-хромосоми кнур: М – маркер молекулярної маси ДНК pUC19/Msp I; 1-3 мікросателіт YLI01m.

За наявною в GenBank нуклеотидною послідовністю LT634572.1 для мікросателіту YLI03 раніше було відомо алель з тандемним повтором $(CA)_2TA(CA)_{16}$. У тварин великої білої породи для цього мікросателіту було визначено два алеля мікросателіту розміром 128 п.н. та 146 п.н., що може відповідати тандемними повторами $(CA)_2TA(CA)_{10}$ і $(CA)_2TA(CA)_{19}$. Найбільш імовірним поясненням цього є локалізація цього мікросателіту на ділянці Y-хромосоми, що рекомбінує і тому мікросателіт YLI03 має свого гомолога на X-хромосомі. Включати мікросателіт YLI03 до панелі праймерів, на нашу думку можливо, за аналогією залучення мікросателіту DYS385 до набору AmpFLSTR Yfiler PCR Amplification Kit, який має також два алеля та успішно використовується у криміналістиці.

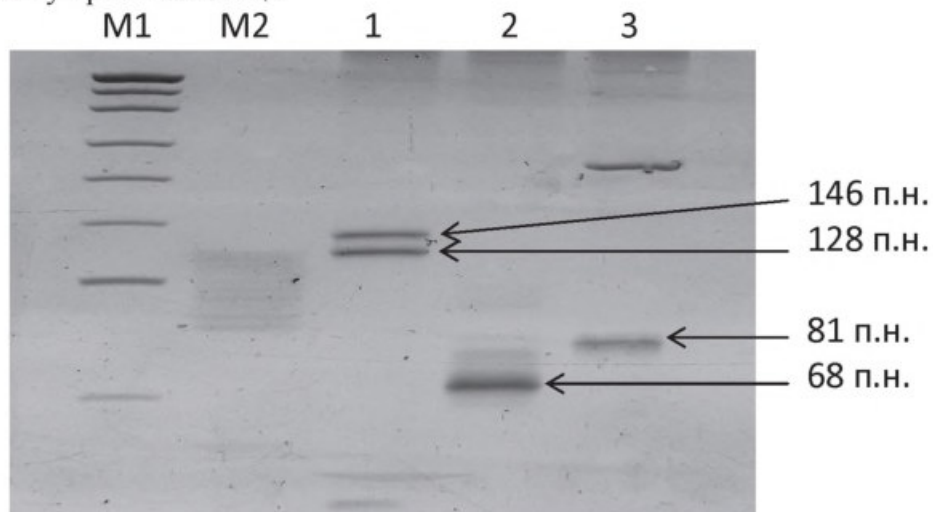


Рис. 2. Електрофорез у 8 % поліакриламідному гелі продуктів ПЛР-ампліфікації мікросателітів Y-хромосоми кнур: M1 – маркер молекулярної маси ДНК pUC19/Msp I; M2 – алельна драбина мікросателіту D8S1179; 1-3 мікросателіти YLI03m, YLI10m та YLI05m відповідно.

Алель мікросателіту YLI05 розміром 81 п.н., що відповідає нуклеотидній послідовності тандемного повтору $(CA)_2C(CA)_9$, було визначено у кнур великої білої породи. За наявною в GenBank нуклеотидною послідовністю LT634572.1 раніше було відомо мікросателітний алель розміром 107 п.н. з тандемними повторами $(CA)_2C(CA)_{22}$. Таким чином, наші дослідження встановили певний діапазон, від $(CA)_2C(CA)_9$ до $(CA)_2C(CA)_{22}$ можливих алелів цього локусу.

Для мікросателіту YLI10 також було знайдено відмінність за кількістю тандемних повторів від наявної в GenBank нуклеотидної послідовності LT634572.1. Так, на відміну описаного Iacolina et al. (2016) [4] алеля розміром 84 п.н., що містив тандемний мотив $(GT)_{20}$, нами було визначено алель розміром 68 п.н. який має дванадцять динуклеотидних повторів $(GT)_{12}$.

За останнє десятиліття Y-хромосомні мікросателіти, які мають батьківське успадкування, дали змогу виявити значні відмінності між статями в демографічній історії та популяційних процесах людини. Проте, за деякими винятками, генетичні дані щодо дослідження батьківських ліній були відсутні для більшості інших видів ссавців. На думку M. P. Greminger et al. (2010) [5], цей дефіцит може бути пов'язаний з труднощами розроблення Y-специфічних генетичних маркерів у сільськогосподарських видів тварин та загальним низьким рівнем поліморфізму, що спостерігаються на Y-хромосомі. На цю проблему вказує і O. Ramirez et al. (2009) [6]. Окрім мікросателітів на Y-хромосомі ведуть пошук і інших ДНК маркерів, зокрема одонуклеотидних поліморфізмів SNP (англ. *Single-nucleotide polymorphism*). Детальний аналіз ділянки Y-хромосоми, що не рекомбінує, загальною довжиною 11369 п.н. 25 європейських та 25 азійських порід свиней, визначив усього 33 поліморфні сайти, в тому числі тільки 28 SNPs. Два гаплотипи гена sry зустрічалися з відносно невисокою частотою. Їх було ідентифіковано винятково у кнурів порід темворс, ретінто та у трьох китайських місцевих порід Huai, Sahwutou та Xiaomeishan. Інший незвичайний гаплотип виявлено винятково також у тварин китайських місцевих порід свиней Bamajiang, Hangjiang та Longling і двох європейських локальних порід – мангалиця та старовинної шведської породи Linderödssvin [7]. Таким чином, на відміну від людини, у свині SNPs на ділянці Y-хромосоми, що не рекомбінує, також має дуже незначний рівень поліморфізму [8].

Висновки. Розроблено панель 4 пар праймерів для аналізу Y-хромосомних мікросателітів дозволяє виконувати аналіз без капілярних сиквенаторів та значних витрат на реактиви.

Ампліфікація Y-хромосомних мікросателітів свині YLI01, YLI05, YLI10 дозволила отримати специфічні ПЛР-продукти. Ампліфікація мікросателіту YLI03 продемонструвала у можливому діапазоні розмірів алелей наявність двох фрагментів ДНК. Найбільш імовірним поясненням цього є локалізація цього мікросателіту на ділянці Y-хромосоми, що рекомбінує і тому мікросателіт YLI03 має свого гомолога на X-хромосомі.

Дослідженням встановлений певний діапазон розмірів алелів мікросателітів Y-хромосоми кнура: YLI01 від $(GT)_8$ до $(GT)_{22}$, YLI03 від $(CA)_2TA(CA)_{10}$ до $(CA)_2TA(CA)_{19}$, YLI05 від $(CA)_2C(CA)_9$ до $(CA)_2C(CA)_{22}$ та YLI10 від $(GT)_{12}$ до $(GT)_{20}$.

Перспективи подальших досліджень або рекомендації виробництву. Розроблену панель 4 пар праймерів для аналізу Y-хромосомних мікросателітів доцільно залучити до генетико-популяційних досліджень свиней та визначення можливості її використання для ідентифікації тварин, підтвердження походження, аналізу належності до певних порід та ліній.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A.H. 2014. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Methods Mol Biol.* 1116:271-302.
2. Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques.* 10(4):506-13.
3. Fragment Size Calculator. Accessed May 15 19. <http://biotools.nubic.northwestern.edu/SizeCalc.html>

4. Iacolina, L., Brajković, V., Canu, A., Šprem, N., Cubric-Curik, V., Fontanesi, L., et al. 2016. Novel Y-chromosome short tandem repeats in *Sus scrofa* and their variation in European wild boar and domestic pig populations. *Anim. Genet.* 47(6):682-690.
5. Greminger, M.P., Krützen, M., Schelling, C., Pienkowska-Schelling, A., Wandeler, P. 2010. The quest for Y-chromosomal markers – methodological strategies for mammalian non-model organisms. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3):409-420.
6. Ramírez, O., Ojeda, A., Tomàs, A., Gallardo, D., Huang, L. S., Folch, J. M. et al. 2009. Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. *Mol. Biol. Evol.* 26(9):2061-2072.
7. Cliffe, K.M., Day, A.E., Bagga, M., Siggins, K., Quilter, C.R., Lowden, S., et al. 2010. Analysis of the non-recombining Y chromosome defines polymorphisms in domestic pig breeds: ancestral bases identified by comparative sequencing. *Anim Genet.* 41(6):619-29.
8. Почерняев, К.Ф. 2009. Консервативність транслюємої ділянки гену SR_Y домашніх та диких свиней. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. 138:265-9.

Почерняев К.Ф., Коринный С.Н. Панель праймеров для анализа микросателлитных локусов Y-хромосомы хряка

*Наиболее точные результаты генетических исследований можно получить, используя для анализа нуклеотидные последовательности, которые наследуются по Менделю, так и те, которые не рекомбинируют – митохондриальной ДНК, (материнское наследование) и Y-хромосомальной ДНК (отцовское наследования). Значительные возможности Y-хромосомы как о «объекта исследований связаны с ее гаплоидностью. В других хромосомах происходит обмен информацией между гомологичными участками во время мейоза, тогда как только мутации влияют на изменчивость Y-хромосомы, и она передается из поколения в поколение в виде одного гаплотипа. Для генетической экспертизы в мировой практике чаще используют ДНК-маркеры, полиморфизм которых обусловлен разным количеством tandemных повторов – микросателлиты. За последнее десятилетие Y-хромосомные микросателлиты, которые имеют отцовское наследования, позволили выявить значительные различия между полами в демографической истории и популяционных процессах человека. Однако, за некоторыми исключениями, генетические данные по исследованию родительских линий отсутствовали для большинства других видов млекопитающих. По мнению M. P. Greminger et al. (2010), этот дефицит может быть связан с трудностями разработки Y-специфических генетических маркеров в сельскохозяйственных видов животных и общим низким уровнем полиморфизма, которые наблюдаются на Y-хромосоме. На эту проблему указывает и O. Ramirez et al. (2009). Несмотря на это, из-за огромной значимости Y-хромосомных маркеров для анализа *Sus scrofa*, генетические исследования в этом направлении продолжаются. После определения специфических для Y-хромосомы хряка микросателлитов, L. Iacolina et al. (2016) стало возможным за счет адаптации к имеющемуся в системе НААН оборудования и реактивов создать панель олигонуклеотидных праймеров для анализа микросателлитных ДНК-маркеров, локализованных на участке Y-хромосоме хряка. Для этого была разработана панель 4 пар праймеров для анализа Y-хромосомных микросателлитов, которая позволяет выполнять анализ без капиллярных сиквенаторов и значительных затрат на реактивы. Амплификация Y-хромосомных микросателлитов свиньи YLI01, YLI05, YLI10 позволила получить специфические ПЦР-продукты. Амплификация микросателлитов YLI03 продемонстрировала в возможном диапазоне размеров аллелей наличие двух фрагментов ДНК. На-*

иболее вероятным объяснением этого является локализация этого микросателлитов на участке Y-хромосомы, рекомбинируют и поэтому микросателлитов YLI03 имеет своего гомолога на X-хромосоме. Исследованием установлен определенный диапазон размеров аллелей микросателлитов Y-хромосомы хряка: YLI01 от $(GT)_8$ до $(GT)_{22}$, YLI03 от $(CA)_2TA(CA)_{10}$ до $(CA)_2TA(CA)_{19}$, YLI05 от $(CA)_2C(CA)_9$ до $(CA)_2C(CA)_{22}$ и YLI10 от $(GT)_{12}$ до $(GT)_{20}$. Разработанную панель 4 пар праймеров для анализа Y-хромосомных микросателлитов целесообразно использовать в генетико-популяционных исследований свиней и определения возможности ее использования для идентификации животных, подтверждение происхождения, анализа принадлежности к определенным породам и линиям.

Pochernyaev K.F., Korinnyi S.M. Primer's panel for analysis of the boar Y-chromosome microsatellite loci

The most accurate results of genetic studies can be obtained using the analysis of nucleotide sequences, which are inherited by Mendel, and the ones which do not recombine – mitochondrial DNA (maternal inheritance) and Y-chromosomal DNA (paternal inheritance). Significant capabilities of the Y chromosome as an object of research are related to its haploidy. In other chromosomes, information is exchanged between homologous sites during meiosis, whereas only mutations affect the variability of the Y chromosome and it gets inherited from generation to generation as a single haplotype. For genetic examination, DNA markers are more commonly used in world practice, the polymorphism of which is due to different numbers of tandem repeats – microsatellites. In the last decade, Y-chromosomal microsatellites, which have some paternal inheritance, have revealed significant differences between the genders in demographic history and human population processes. However, with some exceptions, genetic data on the study of parental lines was absent for most other mammal species. According to MP Greminger et al. the deficiency it may be due to the difficulty of developing Y-specific genetic markers in agricultural species of animals and the overall low level of polymorphism that are observed on the Y chromosome. This problem was indicated by O. Ramirez et al. (2009). Despite this, due to the enormous significance of Y-chromosomal markers for the analysis of Sus scrofa, genetic studies are being continued in this direction. After identifying microsatellites specific to the Y chromosome of the boar, L. Iacolina et al. (2016) it became possible due to adaptation to the equipment available in the NAAS scientific laboratories and reagents to create a panel of oligonucleotide primers for the analysis of microsatellite DNA markers localized in the boar Y-chromosome region. As a result, a panel of 4 primer pairs was developed for the analysis of Y-chromosomal microsatellites, which allows performing the analysis without capillary sequencing and significant costs for reagents. Amplification of Y-chromosomal microsatellites of the pig YLI01, YLI05, YLI10 allowed us to obtain specific PCR products. Amplification of microsatellites YLI03 demonstrated the presence of two DNA fragments in a possible range of sizes of alleles. The most likely explanation for this is the localization of this microsatellites at the site of the Y chromosome, recombines, and therefore, the YLI03 microsatellites have their homologue on the X chromosome. The study established a certain range of sizes of alleles of the boar Y chromosome microsatellites: YLI01 from $(GT)_8$ to $(GT)_{22}$, YLI03 from $(CA)_2TA(CA)_{10}$ to $(CA)_2TA(CA)_{19}$, YLI05 from $(CA)_2C(CA)_9$ to $(CA)_2C(CA)_{22}$ and YLI10 from $(GT)_{12}$ to $(GT)_{20}$. The developed panel of 4 pairs of primers for the analysis of Y-chromosomal microsatellites should be used in genetic population studies of pigs and determine the possibility of its use for identification animals, confirmation of origin, analysis of affiliation to certain breeds and lines.