

ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДНК ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦІ ПОХОДЖЕННЯ УКРАЇНСЬКОЇ СТЕПОВОЇ РЯБОЇ ПОРОДИ СВИНЕЙ

Шаферівський Б.С.

Полтавська державна аграрна академія

Почерняєв К.Ф., кандидат біологічних наук

Інститут свинарства ім. О.В. Квасницького УААН

Шульга Ю.І., кандидат сільськогосподарських наук

Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф.Іванова „Асканія-Нова”
УААН

Поліморфізм мітохондріального геному та літературні дані використані для реконструкції походження української степової рябої породи свиней. В результаті аналізу мітохондріальної ДНК диких свиней та української степової рябої породи визначено 3 гаплотипи. Гаплотип L притаманний великій білій породі європейського типу та диким свиням з Бельгії. Гаплотип С притаманний дикій свині Польщі, Франції і породі ландрас, нарешті гаплотип О – дикій свині Швеції, Італії і породі дюрорк. Оскільки мітохондріальна ДНК успадковується виключно по материнській лінії, зроблено припущення, що внесок в формування генофонду зробили не тільки кнури великої білої, але і свиноматки цієї породи. Гаплотипи О та С імовірно походять від місцевих свиней.

Українська степова ряба порода свиней (УСР) на сучасному етапі розвитку відноситься до локальної, малочисельної породи, яка знаходиться під загрозою зникнення. Головною причиною зникнення чи зменшення місцевих популяцій в тому числі і УСР є зміна соціально-економічних умов. Сьогодні, для успішного господарювання найкраще підходять породи специфічної продуктивності, головними показниками якої є мінімальна затрата високоякісного корму та незначне відкладення жиру.

Зрозуміло, що це значно підвищує рентабельність, але нажаль негативно позначається на якості м'яса, про якість сала мова не йдеться взагалі. Місцеві породи поки ще залишаються носіями таких ознак, як міцність конституції, стійкості до стресу, високої резистентності, пристосованості до умов утримання, здатності ефективно використовувати соковиті та грубі корми та пасовища. Вони мають високу смакову якість м'яса та сала, раннє жировідкладення та раннє статеве дозрівання [1]. Таким чином, місцеві породи є резервом генних комплексів, які на сучасному етапі не потрібні, проте недалекозорість передбачення потреб майбутнього приведе до втрати генофонду [2]. Що стосується саме УСР породи, то

племінним відтворенням її займається тільки один племрепродуктор. На даному етапі генофонд української степової рябої породи ще може бути відтворений, тому питання його дослідження і збереження надзвичайно актуальне.

Робота з виведення УСР породи розпочалася у 1947 році в Українському науково-дослідному інституті тваринництва степових районів ім. М.Ф. Іванова. З рябих поросят, що з'явилися як «мутантні форми» в багатоплідних опоросах маток української степової білої породи, відбирали на розплід кнурів і свинок бажаного типу – з відповідним екстер'єром, міцною конституцією та високою енергією росту [3,4]. До складу ліній та родин зараховували тільки високопродуктивних кнурів та маток після перевірки їх за якістю нащадків. На першому етапі створення ліній застосовували споріднене розведення з суворим бракуванням кволіх, малопродуктивних тварин. Водночас було закладено три лінії кнурів: Рябого, Розбійника і Рідного. Для підвищення скоростиглості УСР породи свиней, особливо при відгодівлі у молодому віці, в кінці 40-х на початку 50-х років проводили ввідне схрещування з кнурами беркширської породи, в результаті чого були виведені лінії Рекорда та Рубіна.

Родоначальник лінії Рижик 5 та родоначальниця родини Радуга 2 походять від кнура Степняка 3025 і свиноматки Ваги 644. Масть у них руда з маленькими чорними плямами. В 1949 році в лінію Рижика прилили кров мангалицької та беркширської порід, щоб підвищити міцність конституції. У 1970-1985 рр. за рахунок об'єднання генотипів УСР (материнська основа) та порід ландрас та дюрк створені лінії м'ясного напрямку продуктивності Реала та Радія [1–3]. Оцінити внесок кожної з порід тільки за літературними даними доволі складно. Для більш об'єктивної оцінки генетичного впливу різних порід на популяцію застосовують генетичні маркери. Спочатку проводять популяційно-генетичні дослідження всіх порід, які залучалися до створення та поліпшення. За визначеними частотами зустрічання алелів маркерних локусів розраховують генетичні дистанції та реконструюють філогенетичні взаємовідносини між породами. Нажаль мікросателітні маркери, які найбільш широко використовують в таких дослідженнях, мають ряд обмежень, пов'язаних з рекомбінаційними процесами та характером мутацій, що визначають їх поліморфізм [4, 5]. Також значний вплив на реконструкцію походження мають ефекти засновника, «шийки пляшки», характерні для популяцій свійських тварин. В якійсь мірі обійти ці обмеження можливо залучивши до аналізу мітохондріальний геном, що локалізований в мітохондріях і успадковується по материнській лінії. Сучасний етап залучення поліморфізму мітохондріальної ДНК (мтДНК) почався в кінці ХХ сторіччя. В 1998 Ursing В.М. та Arnason U визначили повну нуклеотидну послідовність мтДНК свині [8]. Згодом було здійснено філогенетичний аналіз підвидів дикої свині за поліморфізмом мітохондріальних нуклеотидних послідовностей. Було встановлено, що час дивергенції з предкової форми склав приблизно 500 тисяч років [9]. За цей тривалий період, в мітохондріальних геномах різних підвидів диких свиней

за рахунок генотипічної мінливості та ізоляції утворились специфічні гаплотипи. Сьогодні різні автори визначають по меншій мірі 16 різних підвидів дикої свині розповсюдженої у Євразії та Північно-Західній Африці [10], у яких окрім морфологічних, були визначені також відмінності мітохондріального геному [11]. Також було встановлено, що domestикація підвидів диких свиней відбулася дев'ять тисяч років тому в Європі та Азії на різних місцевих популяціях [12]. Накопичені дані про породоспецифічні однонуклеотидні поліморфізми лягли в основу способу визначення породоспецифічних мітохондріальних гаплотипів, здатних стійко успадковуватися по материнській лінії протягом багатьох поколінь [13]. Таким чином, дослідження мітохондріальних геномів дає можливість через ряд поколінь розрізнити в сучасних породах свиней препредкові материнські форми, не звертаючи увагу на міжпородне схрещування та викликані довгою селекцією морфологічні зміни. Що стосується УСР породи, то існує достатньо інформації про використання кнурів різних порід при її створенні та поліпшенні і майже немає ніякої інформації про материнську основу [1,3,6,7]. З огляду на це, **метою роботи** була реконструкція походження української рябої породи свиней з залученням літературних джерел та генетичних даних про поліморфізм мітохондріального геному свиней.

Матеріали і методи. Зразки крові восьми свиноматок основних генеалогічних родин УСР породи були взяті в племзаводі «Асканія-Нова» у 2005 році. Зразки крові чотирьох диких свиней з різних областей України були надані Навчально-науковим інститутом лісового і садово-паркового господарства (ННІ ЛіСПГ) Національного аграрного університету (м. Київ) у 2004-2006 роках.

Виділення ДНК проводили з використанням іонообмінної смоли Chelex 100 [14]. Ампліфікацію фрагменту контролюючого регіону, 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, Росія) та олігонуклеотидних праймерів власного дизайну [8, 9]. Аліквоту продукту ПЛР (5 мкл) гідролізували ендонуклеазою *TasI* (МВІ Fermentas, Литва). Продукти ампліфікації й гідролізу ДНК аналізували в 8% поліакриламідному гелі. Як маркер молекулярної маси використовували ДНК плазмиди pBlueScript, гідролізованої ендонуклеазою *MspI*. Візуалізацію продуктів ампліфікації та рестрикції здійснювали шляхом фарбування бромистим етидієм і фотографуванням на транслюмінаторі в ультрафіолетовому світлі.

Результати досліджень та їх аналіз. В результаті аналізу мітохондріальної ДНК української степової рябої породи та диких свиней було визначено три варіанти гаплотипів які представлені на електрофореграмі (рис. 1).

Заміни в нуклеотидах позиціях некодуючого регіону мітохондріальної ДНК свині, що обумовлюють рестриктний поліморфізм *TasI* (↓AATT), та породи і підвиди диких свиней, що відповідають знайденим гаплотипам, представлені у таблиці 1.

У всіх диких свиней ми виявили гаплотип С, що відповідає гаплотипу диких свиней Польщі. Розповсюдження гаплотипів серед УСР породи представлені на діаграмі (рис.2).

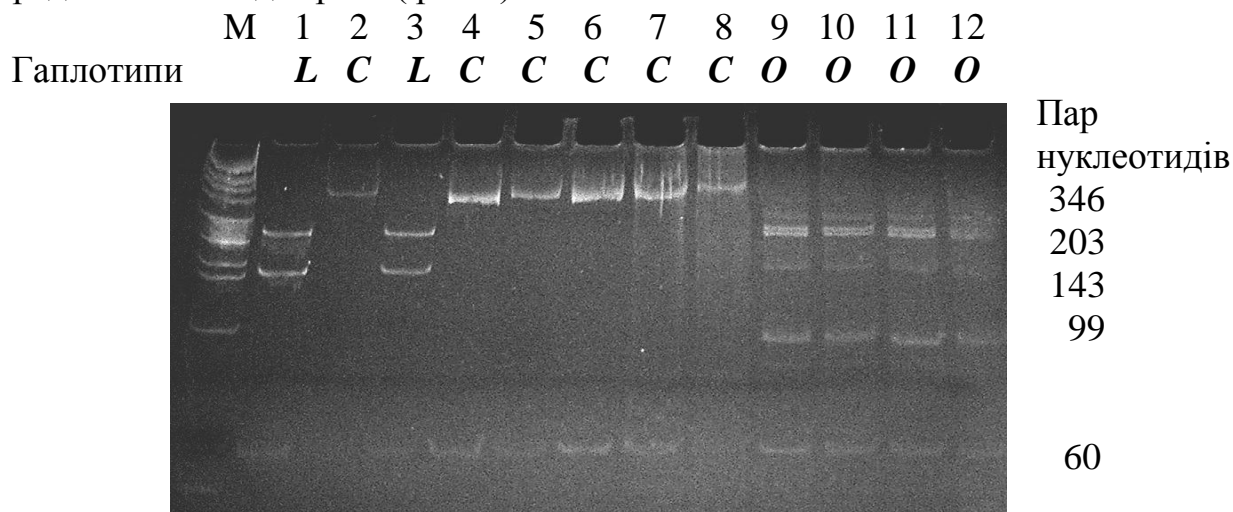


Рис.1 Електрофорез в 8% поліакриламідному гелі продуктів рестрикції *TasI* ампліфікованого в ПЛР фрагменту контролюючого регіону мітохондріальної ДНК диких свиней та української степової рябої породи (УСР). Мітохондріальна ДНК УСР – 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12; мітохондріальна ДНК диких свиней – 5, 6, 7, 8; маркер молекулярної маси ДНК *pBlueScript/MspI* – М. Мітохондріальні гаплотипи: **L** – 1, 3; **C** – 2, 4, 5, 6, 7, 8; **O** – 9,10,11,12.

Як відомо з літературних джерел, для створення УСР породи використовувалися рябі поросята, що відбиралися з гнізд української степової білої породи свиней. Поява рябих поросят пояснювалася виникненням мутацій. Останні дані молекулярної генетики відносно прояву ознаки кольору шкіри та щетини свиней дозволяють припустити, що вони з'явилися внаслідок вищеплення гомозиготних рецесивних особин за локусом КІТ(ген домінантного білого кольору) [14].

1. Варіабельні позиції на ділянці контролюючого регіону мітохондріальної ДНК свиней та поліморфізм довжин рестриктних фрагментів *Tas I*, що дозволяють їх ідентифікувати

Нуклеотидні позиції				Довжини рестриктних фрагментів мітохондріальної ДНК свині в парах нуклеотидів	Відповідність мітохондріальних гаплотипів певним породам свиней за [10, 11, 12, 13].
15580	15616	15714	15758		
С	Т	С	С	346/60/22	C - дика свиня Польща, Франція, порода ландрас
С	Т	С	Т	203/143/60/22	L - дика свиня Бельгія, велика біла порода (європейський тип)
С	Т	Т	Т	203/99/60/44/22	O - дика свиня Швеція, Італія, порода дюрорк

У зв'язку з цим, історія створення української степової білої породи свиней може вважатися особливо важливою для встановлення материнської основи УСР породи. Вона почалося з шести простих маток, відібраних у сусідньому господарстві Дорнбург, які мали усі ознаки простих місцевих свиней, та двох чистопородних кнурів англійської білої породи.

Разом з тим, в працях М.Ф.Іванова відмічається, що не всі місцеві свині однакові: деякі з них відрізнялися дещо кращими формами і дещо більшим розміром. Можливо, деякі з них несли відбитки культурної породи, колись у невеликій кількості прилітої до предків цих свиней. Ці свині і були взяті М.Ф.Івановим для гібридизації з метою отримання нової породи [6].

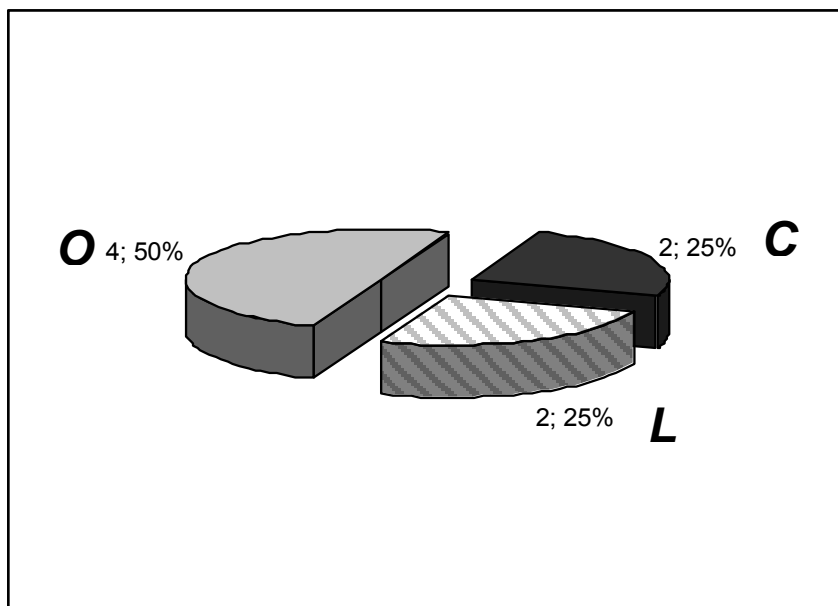


Рис.2 Діаграма розповсюдження гаплотипів свиней серед української степової рябої породи свиней.

З отриманих результатів дослідження поліморфізму мітохондріальної ДНК витікає висновок, що внесок в УСБ, а далі в УСР породу зробили не тільки кнури великої білої, а і свиноматки цієї породи. Можливо це відбулось ще до початку робіт по створенню порід, на що вказує М.Ф. Іванов згадуючи про покращених місцевих свиней півдня України. Це знайшло підтвердження встановленням гаплотипу *L* у досліджуваних тварин УСР породи. Як відомо з літературних джерел, він притаманний як великій білій породі європейського типу, так і диким свиням з Бельгії.

Інша частина материнської основи створення УСБ, а потім і УСР породи представлена гаплотипами *C* (дика свиня Польща, Франція, ландрас) та *O* (Дика свиня Швеція, Італія, дюрк). Оскільки мітохондріальна ДНК передається виключно по материнській лінії, а відомостей про використання свиноматок для поліпшення УСБ та УСР порід не знайдено, що дає нам змогу припустити, що гаплотипи *O* та *C* походять від диких свиней. Можливо дикі свині з гаплотипом *C* і є предковою формою свиней, одомашнених на території України, а згодом з переселенцями північних та центральних районів потрапили до Херсонщини. Ця теза знайшла

підтвердження в тому, що серед досліджених нами диких свиней був знайдений тільки гаплотип **C**. Пояснення зустрічі гаплотипу **O** серед свиней УСР породи знаходимо в іншому літературному джерелі [2]. В ньому стверджується, що для початку виведення УСБ породи були куплені три коротковухі місцеві матки та дві матки довговухі, помісі від схрещування місцевих та чухонських свиней, що були завезені в Каховській район Херсонської області Лук'янівським сільськогосподарським училищем. Свині чухонської породи були менш розповсюджені на території Російської імперії, але мали вищі показники продуктивності, чим коротковухі свині. Вважається, що вона походить від дикої свині середньої та північної Європи [6].

Таким чином з використанням поліморфізму мтДНК вдалось реконструювати походження української степової рябої породи свиней, зокрема материнської основи.

Висновки. Серед свиней української степової рябої породи зустрічаються три різні мітохондріальні гаплотипи.

1. Найчастіше зустрічається гаплотип **O**, характерний для дикої свині Швеції та Італії, що вказує на підтвердження теорії використання завезених довговухих чухонських свиней в створенні УСБ породи.

2. Поява гаплотипу **L** великої білої породи свиней європейського типу вказує на те, що для поліпшення місцевих свиней УСР та УСБ порід використовувалися не тільки завезені кнури, а і свиноматки великої білої породи.

3. Поява гаплотипу **C**, характерного для диких свиней Польщі, серед УСР породи та диких свиней, вказує на те, що в породотворчому процесі приймали участь місцеві свині, предками яких є дикі свині, що мешкали на території України.

Бібліографія

1. Програма селекції з локальними та зникаючими генотипами свиней України на 2003-2012 роки. /Мельник Ю.Ф., Литовченко А.М., Рибалко В.П. та ін.- Полтава, 2003. – 100 с.
2. Герасимов В.І., Березовський М.Д., Нагаєвич В.М., та ін. Мировой генофонд свиней. – Харків: Еспада, 2006.- 520 с.
3. Шульга Ю.І., Явищенко В.Р. Еволюція української степової рябої породи свиней // Збірник наукових праць до 75-річчя з дня заснування закладу. Нова Каховка, «ПІЕЛ».- 2006, С.110-115.
4. Kimura M, Ohta T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1978. – **75**. – P.2868–2872. Ellegren H., Moore S., Robinson N., Byrne K., Wayne W., and Sheldon B. Microsatellite evolution—a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep // Mol. Biol. Evol. – 1997. – **14**. – P.845–860.
5. Порода свиней. По материалам ВСХВ 1954 и 1955 годов.-М: Издательство Министерства сельского хозяйства СССР, 1956.- 120с.

6. Роде О. Свиноводство.-С.-Петербург: Издание А.Ф. Девриена, 1884. – 454с.
7. Иванов М.Ф. Сочинения. Работы по свиноводству 1915-1936. – М.: Сельхозгиз. – 1938. –Т.2. – 137 с.
8. Ursing B.M., Arnason U. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig // J.Mol.Evol. – 1998. - V.47. P.302-306
9. Kim K-1., Lee J-H., Li K., Zhang Y-P., Lee S-S., Gongora J., Moran C. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism // Anim. Genet. – 2002 – V.33. P. 19-25.
10. Giuffra E., Kijas J. M. H., Amarger V., Carlborg O. Jeon J.-T., Andersson L. The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression // Genetics. - 2000. - V. 154. P. 1785-1791.
11. Okumura N, Kurosawa Y, Kobayashi E, Watanobe T, Ishiguro N, Yasue H, Mitsuhashi T. Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs // Anim. Genet. – 2001. - V.32. P. 139-147.
12. M.Fang, F. Berg, A.Ducos and L.Andersson.Mitochondrial haplotypes of European wild boars with 2n=36 are closely related to those of European domestic pigs with 2n=38// Animal genetics.- 2006.- 37.- P.459-464.
13. Почерняев К.Ф. Спосіб визначення мітохондріальних гаплотипів свиней / Деклараційний патент України №А61D7/00 з пріоритетом від 16.05.2005, бюлетень №5.
14. Почерняев К.Ф. Визначення гаплотипів свиней з використанням методу породоспецифічного ПЛР-ПДРФ мітохондріальної ДНК // Ветеринарна біотехнологія. – 2005. - №6. – С.138 – 143.
15. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material // BioTechniques. – 1991. – №10. – P. 506.
16. Andersson L. Molecular Basis for the Dominant White Phenotype in the Domestic Pig // Genome Research. – 1998. - V. 8. – P. 826-833.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ УКРАИНСКОЙ СТЕПНОЙ РЯБОЙ ПОРОДЫ СВИНЕЙ

Б.С. Шаферивский, К.Ф. Почерняев, Ю.И. Шульга

Полиморфизм митохондриального генома и литературные данные были использованы для реконструкции происхождения украинской степной рябой породы свиней. В результате анализа митохондриальной ДНК дикого кабана и животных украинской степной рябой породы определено 3 гаплотипа. Гаплотип L характерный для крупной белой породы европейского типа и дикому кабану Бельгии. Гаплотип С – дикому кабану Польши, Франции и породе ландрас. Гаплотип О – дикому кабану Швеции, Италии и породе дюрок. Поскольку митохондриальная ДНК наследуется исключительно по материнской линии, сделано предположение, что вклад в

УСР сделали не только хряки крупной белой, но и свиноматки этой породы. Гаплотипы O и C возможно происходят от местных свиней.

USING POLYMORPHISM OF MITOCHONDRIAL DNA FOR RECONSTRUCTION OF ORIGIN IN THE UKRAINIAN STEPPE SPOTTED PIG BREED

B.S. Shaferivsky, K.F. Pochernyaev, Yu.I. Shulga.

Polymorphisms of mitochondrial genome and literary date have been used for reconstruction of origin in the Ukrainian steppe spotted pig breed. 3 haplotypes have been determined as a result of mitochondrial DNA analysis in the Wild boar and the Ukrainian steppe spotted pigs. Haplotype L is typical of the Large white breed of the European type and of the Wild boar of Belgium. Haplotype C is typical of the Wild boar of Poland and France and of the Landrace breed. Haplotype O is typical of the Wild boar of Sweden, Italy and Duroc breed. As far as the mitochondrial DNA is inherited with maternal line only it has been proposed that not only Large white boars but also Large white sows made a contribution to the Ukrainian steppe spotted pig breed. Haplotype O and haplotype C may originate from local pigs.