

УДК 636.4:636.082.4:575.174.015.3

## МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ПРОФИЛИ КАК КРИТЕРИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСТОПОРОДНОСТИ И ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОДБОРОВ РОДИТЕЛЬСКИХ ПАР В СВИНОВОДСТВЕ\*

Н.А. ЗИНОВЬЕВА<sup>1</sup>, В.Р. ХАРЗИНОВА<sup>1, 2</sup>, Т.И. ЛОГВИНОВА<sup>1, 2</sup>,  
Е.А. ГЛАДЫРЬ<sup>1, 2</sup>, Е.И. СИЗАРЕВА<sup>3</sup>, Ю.И. ЧИНАРОВ<sup>2</sup>

Разработаны подходы к использованию микросателлитов для определения чистопородности племенных свиней и оценки степени гетерогенности подборов родительских пар. На основании анализа микросателлитных профилей по породной принадлежности были дифференцированы 100 % племенных свиней пород дюрок, крупная белая (йоркшир) и ландрас; использование групп крови позволило корректно дифференцировать соответственно 91,7; 66,7 и 8,3 % свиней этих пород. AFLP-маркеры (amplified fragments lengths polymorphism) оказались непригодны для проведения породной дифференциации свиней. Установлено повышение продуктивных показателей (доля живых поросят при рождении, число поросят к отъему, сохранность к 21-м сут и к отъему, масса одного поросенка при рождении, на 21-е сут и к отъему, молочность, масса гнезда к отъему) при снижении их вариабельности с увеличением генетического сходства родителей, оцененного по микросателлитам.

Ключевые слова: генетические маркеры, микросателлиты, чистопородное разведение, породы свиней, гетерогенность подборов.

Keywords: genetic markers, microsatellites, pure breeding, pig breeds, heterogeneity of parents' pairs.

Развитие технологий геномного анализа обусловило проведение исследований, направленных на разработку методических приемов и алгоритмов использования молекулярно-генетической информации в селекции животных.

Одна из актуальных задач в свиноводстве — разработка приемов контроля чистопородности племенных животных. Современные технологии промышленного производства свинины основаны на получении эффекта гетерозиса от скрещивания специализированных пород (1). Известно, что эффект гетерозиса по воспроизводительным качествам будет наивысшим при сочетании чистых линий (2). В то же время необходимы новые методы оценки гетерогенности подборов родительских пар, направленных на обеспечение стабильной передачи потомству продуктивных признаков при снижении их вариабельности.

В этой связи к числу перспективных приемов можно отнести использование микросателлитов — tandemно расположенных коротких некодирующих повторяющихся последовательностей ДНК, равномерно расположенных по всему геному (3). Благодаря высокой степени полиморфизма и менделевскому типу наследования микросателлиты представляют собой идеальные ДНК-маркеры у млекопитающих (4, 5). Показана прикладная значимость микросателлитов в популяционно-генетических исследованиях, контроле достоверности происхождения, оценке степени гетерозиготности, в качестве маркеров генофонда и его изменений во времени и в поколениях, в выявлении генетических различий между породами, типами и линиями животных (6-8). В исследовании, выполненном на коровах породы гироландо, полученной от скрещивания молочных гиров (порода, выведенная скрещиванием зебу с тауринской породой) с голштинским черно-пестрым скотом, показана высокая достоверная корреляция между долей предков исходных пород и микросателлитными профилями ( $r = 0,84$ ,

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, проект № 16.512.11.2212.

$p < 0,0001$ ), что указывает на возможность использования микросателлитов для индивидуализированного установления доли крови исходных пород у особи (9).

В этой связи нашей целью стала разработка алгоритма использования микросателлитов в качестве критериев оценки чистопородности животных и гетерогенности подборов родительских пар в свиноводстве, а также изучение влияния различной степени гетерогенности подборов, рассчитанной на основании микросателлитных профилей, на показатели и степень изменчивости хозяйственно полезных признаков у свиней.

*Методика.* Материалом для исследований служили пробы крови (в качестве антикоагулянта применяли цитрат натрия) и ткани (ушной выщип, консервантом служил 96 % этанол) племенных хряков различных пород из племенных предприятий России. Исследование информативности тест-системы анализа микросателлитов для идентификации породной принадлежности свиней выполняли в сравнении с группами крови и AFLP-маркерами (amplified fragment length polymorphism) на свиньях пород крупная белая ( $n = 12$ ), ландрас ( $n = 12$ ) и дюрок ( $n = 12$ ). Последующую экспериментальную апробацию проводили на свиньях пород крупная белая ( $n = 82$ ), ландрас ( $n = 59$ ) и дюрок ( $n = 60$ ) из трех независимых предприятий. Оценку микросателлитов в качестве критериев гетерогенности подбора родительских пар выполняли на хряках и свиноматках пород йоркшир ( $n = 16$ ) и дюрок ( $n = 23$ ) (ООО «Троснянский бекон», Орловская обл.).

Микросателлитный анализ осуществляли по 12 локусам (S0155, S0355, S0386, SW24, SW72, SW951, S0101, SW240, SW857, S0228, SW911 и SW936), используя разработанную тест-систему для ДНК-экспертизы свиней. Исследования групп крови выполняли по 20 эритроцитарным антигенам 10 систем (A, B, D, E, F, G, H, K, L и M) по общепринятым методикам. При определении популяционно-генетических параметров учитывали профили по 16 эритроцитарным антигенам 6 закрытых систем (B, D, E, F, G и L), степень гетерогенности подборов оценивали на основании полного анализа 20 антигенов. Изучение AFLP-маркеров проводили по трем типам полиморфизма (E33/T47, E46/T48 и 33/T62), применяя собственные методики. Данные об аллелях каждого животного суммировали в электронной таблице Microsoft Excel. Полученная таким образом матрица генотипов служила основой для статистической обработки результатов.

Обработку полученных данных осуществляли по Б. Вейру (10). С целью оценки индивидуальной, внутри- и межпородной изменчивости проводили анализ AMOVA (анализ молекулярной дисперсии) с помощью программного обеспечения GenAlEx (v. 6.4). Для подтверждения индивидуального соответствия особи породе по методу J.K. Pritchard с соавт. (11) использовали программное обеспечение Structure (v. 2.3.1). Анализ выполняли с указанием наиболее вероятного числа популяций ( $k = 3$  или  $k = 2$ ) и без введения предварительной информации о принадлежности особи к породе. В качестве порогового значения при определении породной принадлежности был выбран 75 % уровень исключения (Q критерий).

При проведении подборов генетическое сходство родителей оценивали по показателю  $R_{st}$ , рассчитанному с использованием функции AMOVA при парном сравнении (меньшие значения  $R_{st}$  указывают на большее генетическое сходство родителей). Изменчивость продуктивных признаков оценивали на основании значений коэффициента вариации ( $Cv$ ).

*Результаты.* Результаты анализа генетического разнообразия трех пород свиней с применением в качестве критериев индексов фиксации

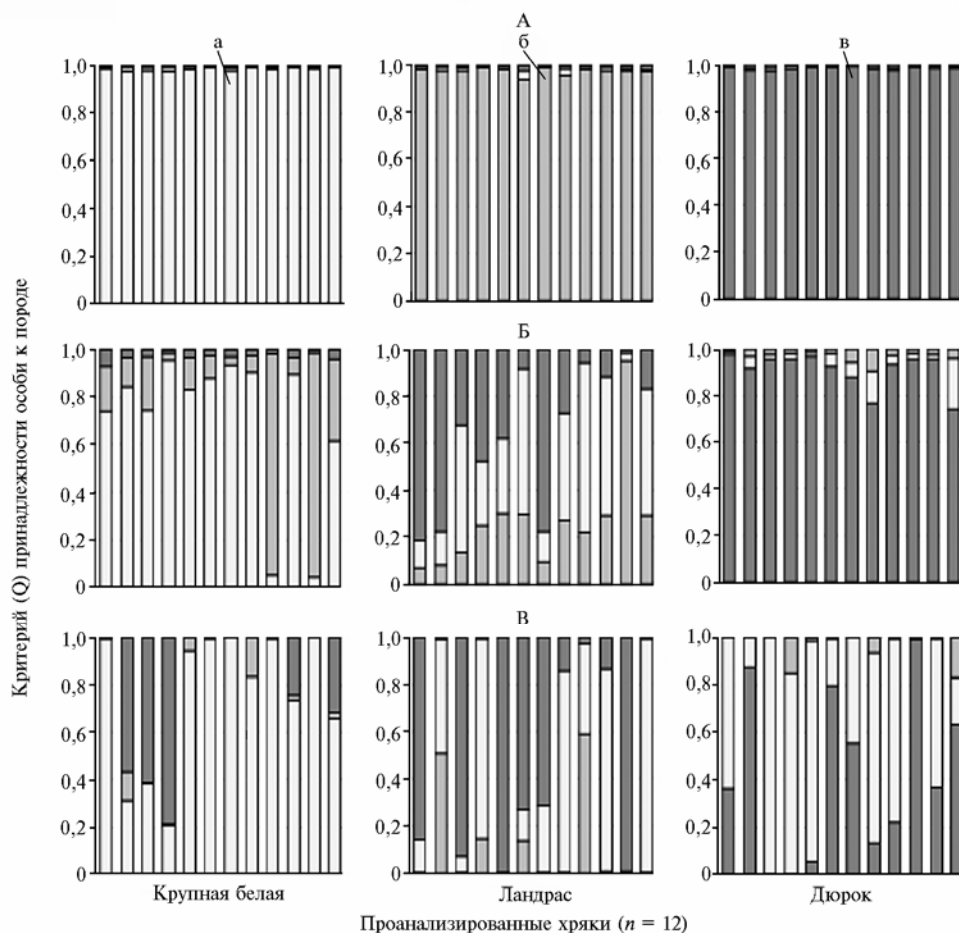
( $R_{st}$  — для микросателлитов,  $F_{st}$  — для групп крови и PhiPT — для AFLP-маркеров), рассчитанных с использованием функции AMOVA, представлены в таблице 1.

**1. Результаты анализа молекулярной варiances (AMOVA) с использованием в качестве критериев микросателлитов, групп крови и AFLP-маркеров в выборке, представленной тремя породами свиней (крупная белая, ландрас и дюрок)**

Показатель	Значение функций молекулярной варiances		
	микросателлиты	группы крови	AFLP-маркеры
Критерий оценки	$R_{st}$ (AMOVA)	$F_{st}$ (AMOVA)	PhiPT (AMOVA)
Между популяциями	2,2	27,3	1,1
Внутри популяций, в том числе:	97,8	72,7	98,9
между индивидуумами	86,2	8,6	
внутри индивидуумов	11,6	64,1	

Примечание. AFLP — amplified fragments length polymorphism; пропуски означают, что для доминантных типов маркеров, к которым относятся AFLP-маркеры, расчет соответствующих показателей не проводится.

Как следует из данных таблицы 1, наибольшие межпопуляционные различия между группами свиней пород крупная белая, ландрас и дюрок отмечали по группам крови, что, по всей видимости, отражает связь некоторых аллелей групп крови с признаками продуктивности у свиней (12).



**Результаты анализа породной принадлежности племенных хряков:** А — микросателлиты (12 полиаллельных локусов), Б — группы крови (8 диаллельных локусов), В — AFLP-маркеры (amplified fragments lengths polymorphism, 465 бинарных локусов); а, б, в — соответственно породы крупная белая, ландрас и дюрок.

Существенно более низкие значения показателей межпопуляционной изменчивости (2,2 % для микросателлитов и 1,1 % для AFLP-маркеров) (см. табл. 1) свидетельствуют в пользу селективной нейтральности исследуемых локусов ДНК-маркеров. Анализ показывает, что внутривидовая изменчивость микросателлитов обусловлена главным образом различиями между индивидами (86,2 % против 11,6 % различий внутри индивидов), в то время как внутривидовая изменчивость групп крови вызвана в основном различиями внутри индивидов (64,1 % против 8,6 % различий между индивидами).

Сравнительный анализ различных типов генетических маркеров для определения породной принадлежности свиней продемонстрировал, что корректное отнесение индивидов к собственной породе в соответствии с данными племенного учета при уровне исключения Q, равном 0,75, достигалось только при использовании тест-системы на основе микросателлитов (рис.).

В породах крупная белая, ландрас и дюрок 100 % хряков на основании анализа ДНК-профилей по микросателлитам были отнесены к различным популяциям, при этом значение критерия Q у отдельных особей варьировало от 0,974 до 0,992 у свиней крупной белой породы, от 0,956 до 0,991 — у породы ландрас и от 0,978 до 0,991 — у породы дюрок; средние значения критерия Q в исследуемых породах составили соответственно  $0,984 \pm 0,002$ ,  $0,976 \pm 0,004$  и  $0,985 \pm 0,002$ . При использовании в качестве маркеров групп крови корректное отнесение индивидов к породе при заданном уровне исключения достигалось в 91,7 % случаев у свиней породы дюрок, в 66,7 % случаев — у крупной белой породы и только в 8,3 % случаев — у породы ландрас. Значения критерия Q в исследуемых породах варьировали соответственно от 0,740 до 0,976, от 0,040 до 0,957 и от 0,065 до 0,951. При вовлечении в анализ AFLP-профилей каких-либо закономерностей в распределении индивидов в соответствии с их породной принадлежностью выявлено не было.

Результаты экспериментальной апробации тест-системы на основе микросателлитов для подтверждения породной принадлежности свиней (табл. 2) показали, что у племенных особей пород крупная белая, ландрас и дюрок она была определена в 100 % случаев. Значения критерия Q варьировали от 0,871 до 0,996 и в среднем составили  $0,981 \pm 0,004$  для свиней крупной белой породы,  $0,981 \pm 0,003$  — для породы ландрас и  $0,986 \pm 0,002$  — для породы дюрок.

## 2. Результаты определения породной принадлежности племенных свиней из трех популяций с использованием микросателлитов

Показатель	Значение критерия Q в исследуемых породах свиней		
	крупная белая	ландрас	дюрок
Популяция 1 (k = 3)	n = 16	n = 12	n = 30
Q <sub>min</sub> -Q <sub>max</sub>	0,919-0,993	0,940-0,990	0,916-0,994
Q	0,973±0,004	0,974±0,005	0,983±0,003
Популяция 2 (k = 3)	n = 26	n = 14	n = 30
Q <sub>min</sub> -Q <sub>max</sub>	0,897-0,994	0,875-0,995	0,948-0,996
Q	0,981±0,004	0,973±0,009	0,988±0,002
Популяция 3 (k = 2)	n = 40	n = 33	—
Q <sub>min</sub> -Q <sub>max</sub>	0,871-0,997	0,897-0,994	—
Q	0,979±0,004	0,981±0,004	—
Итого	n = 82	n = 59	n = 60
Q <sub>min</sub> -Q <sub>max</sub>	0,871-0,997	0,875-0,995	0,916-0,996
Q (M±m)	0,981±0,004	0,981±0,003	0,986±0,002

Примечание. Q — критерий членства особи в соответствующей популяции, рассчитанный по Б. Вейру (10) с указанием наиболее вероятного числа популяций (k). Прочерки означают, что популяция 3 была представлена животными только двух пород.

При оценке влияния степени генетического сходства родителей, рассчитанного по микросателлитам (с индексом фиксации  $R_{st}$ , AMOVA, при парном сравнении), на воспроизводительные качества свиней было установлено (табл. 3), что с его повышением (снижением значения  $R_{st}$ ) достоверно возрастала доля живых поросят при рождении, число поросят на 21-е сут и к отъему, сохранность к 21-м сут и к отъему, масса одного поросенка при рождении, на 21-е сут и к отъему, молочность, масса гнезда к отъему. Отрицательная корреляция между степенью генетического сходства родителей и числом поросят при рождении указывает на снижение многоплодия с увеличением сходства родителей. По-видимому, выживаемость эмбрионов, полученных от гомогенных подборов, ниже, тогда как при гетерогенных подборках, характеризующихся большей разнородностью гамет (индивидуальный гетерозис), эмбрионы, наоборот, более жизнеспособны.

### 3. Достоверные корреляции между степенью генетического сходства родителей, оцененной по микросателлитам, и продуктивными признаками у свиней пород йоркшир и дюрок

Показатель	Коэффициент корреляции $r$	
	йоркшир	дюрок
Многоплодие	-0,38***	-0,74***
Число живорожденных поросят		
Доля живорожденных поросят	+0,79***	+0,96***
Масса гнезда при рождении		+0,87***
Масса одного поросенка при рождении	+0,66***	+0,99***
Число поросят на 21-е сут	+0,41***	+0,49**
Сохранность к 21-м сут	+0,69***	
Молочность	+0,53***	+0,77***
Масса одного поросенка на 21-е сут	+0,43***	+0,99***
Число поросят к отъему	+0,41***	+0,62***
Сохранность к отъему	+0,72***	
Масса гнезда к отъему	+0,51***	+0,60*
Масса одного поросенка к отъему	+0,57***	+0,68***

Примечание. Пропуски означают, что данные не приведены, поскольку были недостоверны.

\*, \*\* и \*\*\* Соответственно  $p < 0,005$ ;  $p < 0,002$  и  $p < 0,001$ .

Повышение генетического сходства родителей приводило к достоверному снижению степени изменчивости продуктивных показателей (табл. 4). Отметим, что выявленные закономерности проявлялись у свиней вне зависимости от породы.

### 4. Достоверные корреляции между степенью генетического сходства родителей, оцененной по микросателлитам, и изменчивостью продуктивных признаков у свиней пород йоркшир и дюрок

Показатель	Коэффициент корреляции $r$	
	йоркшир	дюрок
Многоплодие	-0,71**	
Число живорожденных поросят	-0,83**	-0,55**
Масса гнезда при рождении	-0,58**	-0,57**
Число поросят на 21-е сут	-0,79**	-0,51**
Молочность	-0,91**	-0,56**
Число поросят к отъему	-0,65**	-0,44*
Масса гнезда к отъему	-0,93**	-0,52**

Примечание. Пропуски означают, что данные не приведены, поскольку были недостоверны.

\* и \*\* Соответственно  $p < 0,005$  и  $p < 0,001$ .

Таким образом, результаты проведенных исследований показали возможность применения разработанной нами тест-системы на основе микросателлитов для определения породной принадлежности свиней. Анализ микросателлитных профилей позволил корректно дифференцировать животных основных пород свиней, используемых в системе гибридизации (крупная белая или йоркшир, ландрас и дюрок), по породной при-

надлежасти, в то время как при использовании групп крови корректная дифференциация пород достигалась соответственно в 66,7; 8,3 и 91,7 % случаев. Маркеры AFLP оказались непригодны для этой цели. По всей видимости, преимущество микросателлитов при определении породной принадлежности обусловлено тем, что, с одной стороны, уровень полиморфизма по ним выше, чем по группам крови (общее число аллелей на локус —  $4,64 \pm 0,24$  против  $1,83 \pm 0,12$ , в том числе эффективных аллелей на локус —  $3,11 \pm 0,18$  против  $1,39 \pm 0,07$ ), с другой стороны, большинство микросателлитов (за исключением сцепленных с локусами хозяйственно полезных признаков) селективно нейтральны (13). В качестве одной из причин меньшей дифференциации пород свиней по группам крови можно рассматривать наличие ассоциаций некоторых аллелей групп крови с продуктивными показателями (14, 15), что обуславливает отбор в сторону определенных аллелей групп крови. В пользу такого предположения свидетельствует установленная нами большая доля межпопуляционной изменчивости по группам крови по сравнению с таковой по микросателлитам (27,3 против 2,2 % в общей изменчивости), а также большее сходство генетических профилей свиней вышеназванных пород по группам крови, чем по микросателлитам (6).

Факторы подбора, в основе которых лежат законы наследственности, приобретают все большее значение в селекции животных, при этом особое внимание следует обращать на создание систем линейно-группового подбора (16). Проведенные нами исследования позволили определить оптимальные критерии оценки степени гетерогенности группового подбора свиней, основываясь на генотипах животных по микросателлитам. Показано, что повышение генетического сходства родителей при чистопородном разведении двух изучаемых пород свиней (йоркшир и дюрок), оцененного по показателю  $R_{st}$  (AMOVA), приводило к повышению продуктивных показателей (доли живых поросят при рождении, числа поросят к отъему, сохранности к 21-м сут и к отъему, массы одного поросенка при рождении, на 21-е сут и к отъему, молочности, массы гнезда к отъему) при снижении их вариабельности. Учитывая, что полученные нами результаты согласуются с закономерностями классической генетики и разведения сельскохозяйственных животных, постулирующими, что использование гомогенного подбора направлено на закрепление признаков продуктивности родителей в потомстве (16), можно сделать вывод, что микросателлитные профили могут использоваться в качестве критериев оценки степени гетерогенности подбора родительских пар при чистопородном разведении свиней.

Необходимо отметить, что выявленные закономерности следует с осторожностью распространять на свиней других пород, типов или даже стад. Приведенные в настоящей работе данные хотя и являются научно обоснованными и экспериментально доказанными, требуется их подтверждение в рамках более масштабных исследований как в породном, так и в популяционном аспекте.

Итак, микросателлитные профили могут быть использованы в качестве критериев оценки чистопородности свиней и служить матрицей для определения оптимальной степени гетерогенности подборов родительских пар, обуславливающей повышение уровня проявления хозяйственно полезных признаков при снижении их вариабельности

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Герасимов В.И. Промышленное скрещивание свиней — основной метод произ-

- водства товарной свинины. Свиноводство, 2006, 1: 5-7.
2. Меркурьева Е.А., Абрамова З.В., Бакай А.В. и др. Генетика. М., 1991.
  3. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucl. Acids Res., 1989, 17: 6463-6471.
  4. Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения. Вест. ВОГиС, 2006, 10(1): 74-96.
  5. Марзанов Н.С., Девришов Д.А., Марзанова С.Н., Комкова Е.А., Озеров М.Ю., Кантанен Ю. Генетическое маркирование, сохранение биоразнообразия и проблемы разведения животных. С.-х. биол., 2011, 1: 3-14.
  6. Проскурина Н.В., Тихомирова Т.И., Гладырь Е.А., Ларионова П.В., Зиновьева Н.А. Сравнительный анализ информативности эритроцитарных антигенов и ДНК-микросателлитов в селекционно-племенной работе со свиньями канадской селекции. С.-х. биол., 2007, 6: 41-47.
  7. Зиновьева Н.А., Ларионова П.В., Тихомирова Т.И., Гладырь Е.А., Шавырина К.М. Генетическая характеристика свиней пород крупная белая и йоркшир различного происхождения с использованием ДНК-маркеров. Докл. РАСХН, 2008, 2: 33-36.
  8. Ramírez O., Ojeda A., Tomas A., Gallardo D., Huang L.S., Folch J.M., Clor A., Sánchez A., Badaoui B., Hanotte O., Galman-Omitogun O., Makuza S.M., Soto H., Cadillo J., Kelly L., Cho I.C., Yeghoyan S., Pérez-Enciso M., Amills M. Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. Mol. Biol. Evol., 2009, 26(9): 2061-2072.
  9. Bicalho H.M.S., Pimenta C.G., Mendes I.K.P., Pena H.B., Queiroz E.M., Pena S.D.J. Determination of ancestral proportions in synthetic bovine breeds using commonly employed microsatellite markers. Genet. Mol. Res., 2006, 5(3): 432-437.
  10. Вейр Б. Анализ генетических данных. М., 1995.
  11. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 2000, 155: 945-959.
  12. Сердюк Г.Н., Силин Ю.В., Берникова Н.Н., Куценко Н.Н. Иммуногенетический контроль в селекционной практике. Зоотехния, 2000, 10: 8.
  13. Tachida H., Iizuka M. Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. Genetics, 1992, 131: 471-478.
  14. Тихонов В.Н. Иммуногенетика и биохимический полиморфизм домашних и диких свиней. Новосибирск, 1991.
  15. Гончаренко Г.М., Гришина Н.Б., Кононенко Е.В. Совершенствование методов подбора в селекции свиней. В сб.: Аграрная наука — сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, Казахстана и Кыргызстана. Новосибирск, 2005, т. 2: 48-52.
  16. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. М., 2008.

<sup>1</sup>ГНУ Всероссийский НИИ животноводства  
Россельхозакадемии,  
142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,  
e-mail: n\_zinovieva@mail.ru;

<sup>2</sup>ООО «Биострим»,  
142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы;

<sup>3</sup>ООО «Знаменский СГЦ»,  
302030 Орловская обл., г. Орел, ул. Московская, 31

Поступила в редакцию  
18 июля 2011 года

## MICROSATELLITE PROFILES AS CRITERIA FOR CONFIRMATION OF BREED PURITY AND FOR EVALUATION OF HETEROGENEITY DEGREE OF PARENTS' PAIRS IN PIG BREEDING

*N.A. Zinovieva<sup>1</sup>, V.R. Harzinova<sup>1, 2</sup>, T.I. Logvinova<sup>1, 2</sup>, E.A. Gladyr<sup>1, 2</sup>,  
E.I. Sizareva<sup>3</sup>, Yu.I. Chinarov<sup>2</sup>*

### S u m m a r y

The approaches of using of microsatellites for confirmation of breed purity and evaluation of heterogeneity degree of parents' pairs were developed. 100 per cent of breeding pigs of large white (Yorkshire), landrace and duroc breeds were correctly assigned to own breed based on microsatellites' profiles analysis. Blood groups application made it possible to differentiate 91.7, 66.7 and 8.3 per cent animals of duroc, large white and landrace breeds, respectively. AFLP markers were not suitable to perform the pig breed assignment. The increasing in levels of productive traits (the per cent of piglets born alive, the number of piglets at 21 day and at weaning, the weight of one piglet at birth, at 21 day and at weaning, and the little weight at 21 day and at weaning) by decreasing of their variability with the increasing of genetic likeness evaluated using microsatellites was shown.