

ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СВИНЕЙ ПОРОДЫ ВЕНГЕРСКАЯ МАНГАЛИЦА НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МИКРОСАТЕЛЛИТОВ

В. Р. ХАРЗИНОВА, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук,
О. В. КОСТЮНИНА, ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, руководитель лаборатории,
Т. В. КАРПУШКИНА, научный сотрудник,
Всероссийский институт животноводства им. Л. К. Эрнста
(142132, Московская область, г. о. Подольск, п. Дубровицы, д. 60; e-mail: veronika0784@mail.ru),
О. А. БЫКОВА, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, начальник Управления по научно-исследовательской деятельности,
Уральский государственный аграрный университет
(620075, Екатеринбург, ул. К. Либкнехта, д. 42),
Н. А. ЗИНОВЬЕВА, профессор, академик РАН, доктор биологических наук, директор.
Всероссийский институт животноводства им. Л. К. Эрнста
(142132, Московская область, г. о. Подольск, п. Дубровицы, д. 60)

Ключевые слова: породы свиней, мангалица, генетическое разнообразие, микросателлиты.

Преимущественное использование в современном свиноводстве пород европейского и североамериканского происхождения, характеризующихся высоким уровнем продуктивности, привело к вытеснению локальных пород. Изучение аллелофонда свиней породы венгерская мангалица, находившейся на грани исчезновения, но восстановленной совместными усилиями различных специалистов до 7000 особей, представляет интерес в аспекте сохранения генетического разнообразия исчезающих и малочисленных пород. Целью данной работы являлось проведение анализа микросателлитов для определения популяционно-генетических параметров свиней породы венгерская мангалица и оценки степени ее дифференциации в отношении групп свиней пород крупная белая, ландрас и дюрок. Анализ с использованием матрицы попарных генетических дистанций по показателю F_{ST} продемонстрировал значительную дифференциацию мангалицы от свиней пород крупная белая и дюрок, и в то же время, некоторую генетическую схожесть со свиньями породы ландрас. Результаты показали, что свиньи породы мангалица характеризуются относительно высоким уровнем аллельного и генетического разнообразия, а полученные данные могут быть использованы при изучении параметров генетического разнообразия малочисленных пород свиней.

THE STUDY OF THE POPULATION STRUCTURE AND GENETIC DIVERSITY OF HUNGARIAN MANGALICA BREED OF PIGS BASED ON MICROSATELLITES ANALYSIS

V. R. KHARZINOVA, leading researcher, candidate of biological sciences,
O. V. KOSTYUNINA, leading researcher, doctor of biological sciences, head of the laboratory,
T. V. KARPUSHKINA, researcher,
All-Russian Institute of animal husbandry named after L. K. Ernst
(60 Dubrovitsy village, 142132, Moscow region, the county town of Podolsk; e-mail: veronika0784@mail.ru),
O. A. BYKOVA, doctor of agricultural sciences, associate professor, head of the department for research activities,
Ural State Agrarian University
(42 K. Liebknekhta Str., 620075, Ekaterinburg),
N. A. ZINOVYEVA, professor, academician of RAS, doctor of biological sciences, director,
All-Russian Institute of animal husbandry named after L. K. Ernst
(60 Dubrovitsy village, 142132, Moscow region, the county town of Podolsk)

Keywords: breeds of pig, Mangalica, genetic diversity, microsatellites.

Predominant use in the present pig breeding the breeds of European and North American origin characterized by high levels of productivity, has led to the displacement of local breeds. The study of the allele pool of pigs of the Hungarian Mangalica breed, which was on the verge of extinction, but restored by the joint efforts of various specialists up to 7,000 individuals, it is of interest in the aspect in the genetic diversity conservation of endangered and small-numbered breeds. The aim of this work was to conduct microsatellite analysis to determine the population genetic parameters of the Hungarian Mangalica breed of pigs and assessing the degree of its differentiation with respect to groups of Large White, Landrace and Duroc breeds. Analysis of using the pairwise genetic distance matrix for the F_{ST} index showed a significant differentiation of Mangalica from Large White and Duroc breeds, and at the same time, some genetic similarity with Landrace one. Thus, it has been shown that pigs of the Mangalica breed are characterized by relatively high levels of allelic and genetic diversity, and the data obtained can be used to study the parameters of the genetic diversity of small pig breeds.

Введение

На сегодняшний день рынок племенного свиноводства занят широко распространенными крупными организациями, занимающимися разведением свиней пород европейского и североамериканского происхождения, что привело к сокращению поголовья или полному исчезновению десятка локальных пород [1]. Однако на фоне повышения спроса на экопродукты у многих владельцев личных приусадебных, а также мелких и средних фермерских хозяйств, решивших заняться животноводством, отмечается повышенный интерес к породе свиней мангалица, еще недавно находившейся на грани исчезновения. В восстановлении мангалицы принимали участие не только венгерские специалисты, но и ученые других стран, частично используя при этом культурные породы. В настоящее время в мире насчитывается чуть более 7 000 голов этой породы [2]. Кроме того, данная порода относится к охраняемому генному фонду оригинальных и примитивных пород животных ФАО, исследование генетического разнообразия которой является приоритетной задачей программы сохранения генетических ресурсов в области сельского хозяйства [3]. По мнению Flores L. с соавторами [4], именно локальные породы свиней представляют интерес как носители аллельных вариантов, которые могут быть использованы не только для дальнейшего улучшения коммерческих пород, но и также для сохранения генетических ресурсов вида в целом. При этом правильное использование и сохранение таких пород невозможно без наличия информации о состоянии их генетического разнообразия. Так, низкий уровень генетической изменчивости влияет на устойчивость популяции к неблагоприятным условиям среды, разрушает локальные адаптации и коадаптированные генные комплексы, что в конечном итоге может привести к снижению численности и вымиранию популяции [5]. На сегодняшний день в качестве критерия оценки состояния генетического разнообразия, генетической структуры и степени дифференциации пород животных широко используются микросателлиты – короткие tandemные повторы (short tandem repeats, STR) [6], актуальность использования которых освещена в работах многих авторов [7–9], однако исследования генетического разнообразия свиней породы мангалица, разводимых в нашей стране, ранее не проводились.

Цель и методика исследований

Целью данной работы явилось изучение генетического разнообразия свиней породы мангалица и оценка степени ее дифференциации в отношении трех пород импортного происхождения отечественной репродукции (крупная белая, ландрас и дюрок) с использованием микросателлитов. Исследования

были выполнены в лаборатории молекулярных основ селекции ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» в рамках выполнения фундаментальных научных исследований Министерства науки и высшего образования РФ по теме 0445-2019-0026 (АААА-А18-118021590138-1). В исследованиях было использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста. Материалом для исследования служили пробы ткани (ушные выщипы), отобранные от 52 свиней породы мангалица (МАН, $n = 52$). Выделение ДНК осуществляли с помощью набора реагентов «ДНК-ЭКСТРАН» (ЗАО «Синтол», Россия) и с использованием колонок фирмы Nexttec (Германия) согласно протоколу фирм-изготовителей. Мультиплексный анализ, включающий 10 STR (SW24, S0155, S0355, S0386, SW72, SW951, S0101, SW240, SW857 и SO005), выполняли с использованием ранее описанной методики [10]. Для сравнительных исследований были использованы микросателлитные профили 276 особей трех пород из базы данных STR-вариативности домашних свиней (*Sus Scrofa*) ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста: крупная белая (КБ, $n = 105$), ландрас (Л, $n = 58$) и дюрок (ДЮР, $n = 113$). После получения микросателлитных профилей была сформирована матрица генотипов в формате Microsoft Excel. Расчет основных параметров аллельного и генетического разнообразия: число эффективных (N_E), средних (N_A) и приватных (P_R) аллелей на локус, аллельное разнообразие, рассчитанное с применением процедуры рарификации (A_R), наблюдаемая (H_O) и ожидаемая (H_E) гетерозиготность, а также коэффициент инбридинга (F_{IS}), проводили с использованием программного обеспечения GenAlEx (ver. 6.5.1) [11] и R package “diveRsity” [12]. Анализ главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) выполняли в R-пакете adegenet [13] и визуализировали в R-пакете ggplot2 [14]. Оценку степени генетической дифференциации определяли на основании матрицы попарных значений D_{Jost} [15] с последующим построением филогенетического дерева по алгоритму «сети соседей» (Neighbor-Net) в программе SplitsTree 4.14.5 [16]. Исходные файлы были сформированы в программной среде R 3.5.0 [17].

Результаты исследований

В таблице 1 представлены результаты анализа основных параметров аллельного и генетического разнообразия исследованных пород свиней.

Значения показателя числа информативных аллелей варьировали от 2.062 ± 0.266 у ДЮР до 3.256 ± 0.628 у МАН. Практически равные максимальные значения среднего числа аллелей на локус были выявлены у свиней двух пород: мангалицы ($6.000 \pm$

Таблица 1
 Параметры аллельного и генетического разнообразия исследованных пород свиней

Порода	n	N_E	N_A	P_R	A_R	H_O	H_E	F_{IS} ($F_{IS} 95\% CI > 0$)
МАН	52	3.256 ± 0.628	6.000 ± 1.258	0.667 ± 0.471	6.002 ± 1.258	0.534 ± 0.1	0.581 ± 0.091	0.124 [-0.072; 0.32]
ДЮР	113	2.062 ± 0.266	4.556 ± 0.944	0.222 ± 0.147	4.157 ± 0.829	0.442 ± 0.074	0.449 ± 0.071	0.064 [-0.122; 0.25]
КБ	105	3.191 ± 0.506	5.778 ± 0.795	0.333 ± 0.167	5.38 ± 0.726	0.67 ± 0.055	0.633 ± 0.044	-0.053 [-0.126; 0.02]
Л	58	2.587 ± 0.478	5.111 ± 0.824	0.333 ± 0.167	5.064 ± 0.818	0.544 ± 0.072	0.532 ± 0.064	-0.015 [0.107; 0.077]

Примечание: N_E – число эффективных аллелей на локус; N_A – среднее число аллелей на локус; P_R – число приватных аллелей; A_R – аллельное разнообразие; H_O – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; F_{IS} – коэффициент инбридинга.

Расшифровку аббревиатур для пород свиней см. в методике.

Note: N_E – the number of effective alleles per locus; N_A – the average number of alleles per locus; P_R – the number of private alleles; A_R – the allelic variety; H_O – the observed heterozygosity; H_E – the expected heterozygosity; F_{IS} – inbreeding coefficient.

Decoding of abbreviations for breeds of pigs see in the technique.

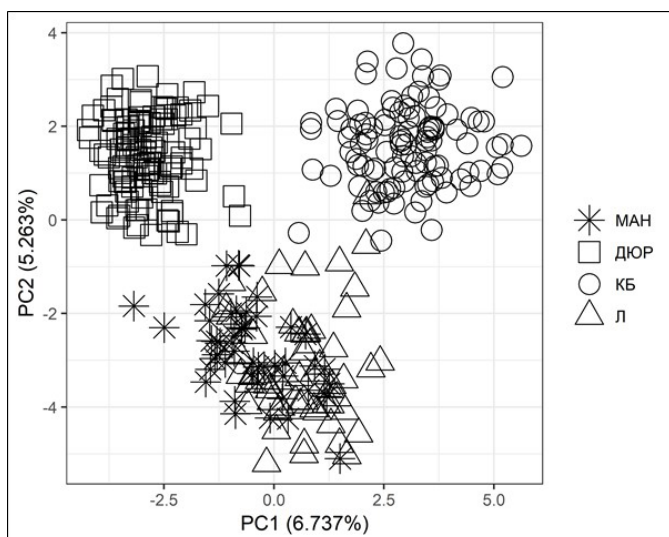


Рис. 1. Распределение особей исследуемых пород свиней на плоскости двух главных компонент по данным PCA-анализа.

Примечание: расшифровку аббревиатур для пород свиней см. в методике

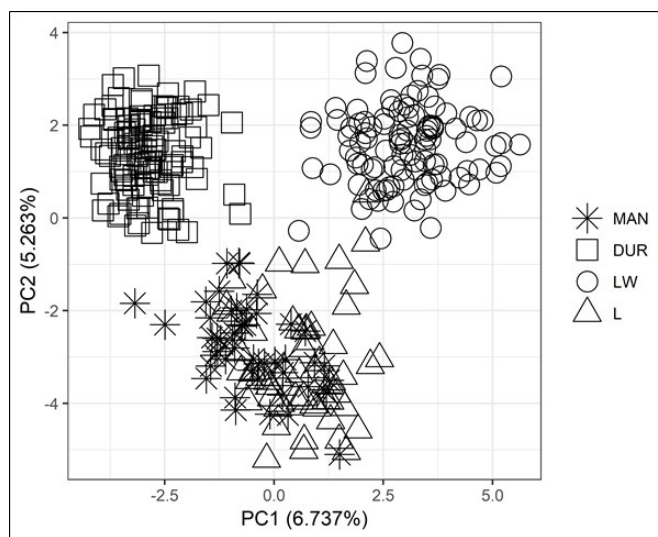


Fig. 1. Distribution of individuals of the studied pig breeds on the plane of two main components according to PCA-analysis.

Note: the extension of abbreviations for the breed, see in the technique

1.258) и крупной белой (5.778 ± 0.795), в то время как свиньи породы дюрок имели минимальные значения показателя (4.556 ± 0.944). Уникальные (приватные) аллели, являющиеся отличной характеристикой породы, были выявлены во всех исследуемых нами группах, с превалированием их числа в породе мангалица: 6 аллелей против 3 (КБ и Л) и 2 (ДЮР). При этом максимальная частота встречаемости (0,231) выявлена у 227 аллеля локуса SO005. Диапазон изменчивости аллельного разнообразия, рассчитанного с применением процедуры рарификации, составил от 4.157 ± 0.829 (ДЮР) до 6.002 ± 1.258 (МАН).

Значения показателей ожидаемой и наблюдаемой степени гетерозиготности оказались существенно выше у свиней крупной белой породы: $H_O = 0.67 \pm 0.055$ и $H_E = 0.633 \pm 0.044$. Животные породы мангалица имели промежуточные значения данных параметров: $H_O = 0.534 \pm 0.1$ и $H_E = 0.581 \pm 0.091$.

Положительные значения коэффициента инбри-

динга (F_{IS}), свидетельствующие о недостатке гетерозигот, были выявлены у свиней породы мангалица и дюрок. Однако следует обратить внимание на значения доверительного интервала ($F_{IS} 95\% CI > 0$), который во всех исследуемых группах включал ноль, указывая на генетическое равновесие в данных породах. Максимальные отрицательные значения показателя отмечены у свиней крупной белой породы ($F_{IS} = -0,053$).

Следующим этапом наших исследований являлось выявление генетических взаимоотношений свиней породы мангалица с другими группами. Для этих целей были использованы два молекулярно-генетических подхода: метод главных компонент (PCA) (рис. 1) и филогенетический анализ (рис. 2).

Так, по данным рис. 1, следует, что факторный анализ всего массива частот аллелей 10 микросателлитов выделил две компоненты, объясняющие около 12 % генетической изменчивости.

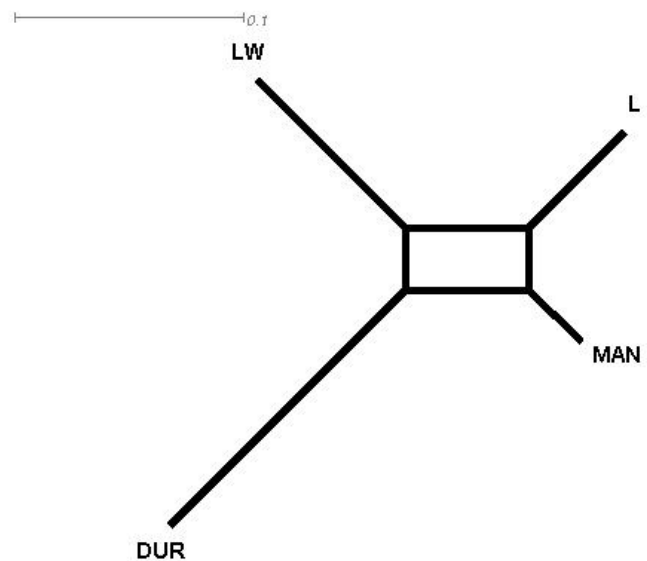
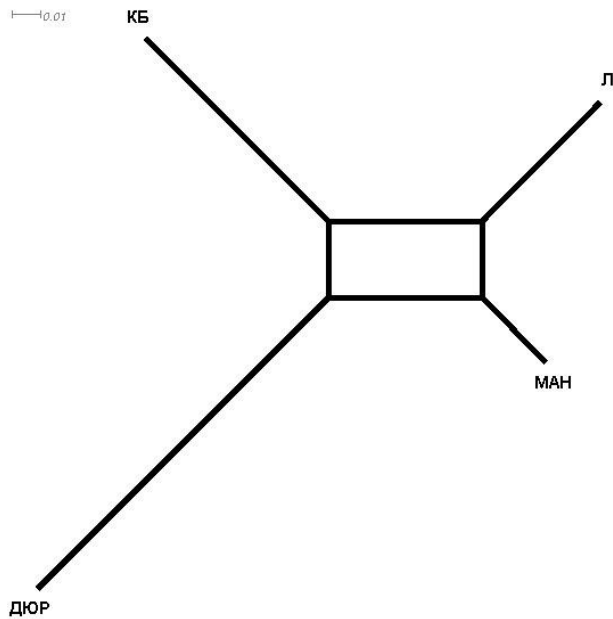


Рис. 2. Филогенетическое дерево взаимоотношений исследуемых пород свиней, построенное на основе матрицы попарных генетических дистанций F_{ST} по алгоритму «сети соседей» (Neighbor-Net).
Примечание: расшифровку аббревиатур для пород см. в методике

Fig. 2. Phylogenetic relationship tree of studied pig breeds, based on the pairwise genetic distance F_{ST} matrix using the Neighbor-Net algorithm.
Note: the extension of abbreviations for the breed, see in the technique

Выводы. Рекомендации

При этом проекция исследуемых групп образовала два независимых кластера свиней пород крупной белой и дюрок и общий кластер животных пород мангалица и ладрас.

Анализ исследуемых групп свиней, проведенный на основе матрицы попарных генетических дистанций по показателю F_{ST} с последующей визуализацией результатов на филогенетическом дереве по алгоритму «сети соседей» (Neighbor-Net) (рис. 2), выявил обособленность каждой породы, при этом к свиньям породы мангалица наибольшую генетическую схожесть проявили животные породы ландрас.

Таким образом, проведенные нами исследования, основанные на анализе полиморфизма 10 микросателлитов, выявили, что свиньи породы мангалица характеризуются относительно высоким уровнем аллельного и генетического разнообразия. Анализ двух главных компонент показал формирование общего кластера свиней породы мангалица и ладрас с дистанционированием от кластеров пород крупной белой и дюрок, что также было выявлено филогенетическим анализом по алгоритму «сети соседей» (Neighbor-Net).

Наличие в генофонде исследуемой выборки мангалицы компонента породы ландрас позволяет сделать предположение об участии последней в процессе восстановления мангалицкой породы свиней. При этом более детальные выводы о генетических взаимоотношениях между исследованными группами свиней возможны при увеличении выборки, а также при исследовании паттерна генетической дифференциации с другими породами. Тем не менее впервые проведенные нами исследования генетического разнообразия и популяционной структуры свиней породы венгерская мангалица могут быть использованы при разработке селекционных, организационных и экономических мероприятий, направленных на поддержание и развитие генофонда данной породы свиней. Кроме того, изучение состояния генетического разнообразия малочисленных пород животных и, как следствие, рациональное использование их генетических ресурсов, имеет особое значение как ценнейшее генетическое наследие всего человечества.

Работа проведена в рамках выполнения фундаментальных научных исследований Министерства науки и высшего образования РФ по теме 0445-2019-0026 (AAAA-A18-118021590138-1).

Литература

1. Михайлова О. А. История выведения и проблема сохранения редких и исчезающих пород свиней. // Свиноводство. 2016. № 1. С. 8–11.
2. Венгерская мангалица: плюсы и минусы породы [Электронный ресурс]. URL: <https://vusadebke.com/fermerstvo/ghivotnovodstvo/svinyi/vengerskaya-mangalica.html> (дата обращения: 26.06.2019).
3. Georgescu S. E., Manea M. A., Dudu A., Costache M. Phylogenetic relationships of the mangalica swine breed inferred from mitochondrial DNA variation // International Journal of Molecular Sciences. 2012. No. 13 (7). Pp. 8467–8481.

4. Flores L. [et al.] Genetic analysis of Mexican hairless pig populations // *Journal of Animal Science*. 2001. V. 79. Pp. 3021–3026.
5. Mahmoudi B. [et al.] Breed characteristics in Iranian native goat populations // *Journal of Cell and Animal Biology*. 2011. No. 5 (7). Pp. 129–134.
6. Mekuriaw G. [et al.] Review on current knowledge of genetic diversity of domestic goats (*Capra hircus*) identified by microsatellite loci: how those efforts are strong to support the breeding programs? // *Journal of Life Science and Biomedicine*. 2016. No. 6 (2). Pp. 22–32.
7. Зиновьева Н. А. [и др.] Оценка вклада различных популяций в генетическое разнообразие свиней корня крупной белой породы // *Сельскохозяйственная биология*. 2012. № 6. С. 35–42.
8. Луговой С. И. Характеристика генофонда локальных пород свиней Украины по локусам микросателлитов ДНК // *Вестник Новосибирского государственного аграрного университета*. 2013. № 2 (27). С. 67–72.
9. Харзинова В. Р. [и др.] Локальные породы свиней: сравнительная характеристика аллелофонда на основе анализа микросателлитов // *Свиноводство*. 2017. № 1. С. 5–7.
10. Харзинова В. Р. [и др.] Популяционно-генетическая характеристика свиней пород крупная белая, ландрас и дюрок с использованием микросателлитов // *Зоотехния*. 2018. № 4. С. 2–7.
11. Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update // *Bioinformatics*. 2012. No. 28. Pp. 2537–2539.
12. Keenan K., McGinnity P., Cross T. F., Crozier W. W., Prodöhl P. A. diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors // *Methods in Ecology and Evolution*. 2013. No. 4. Pp. 782–788.
13. Jombart T. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers // *Bioinformatics*. 2008. No. 24. Pp. 1403–1405.
14. Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. – New York : Springer-Verlag, 2009. – 216 p.
15. Jost L. GST and its relatives do not measure differentiation // *Molecular Ecology*. 2008. No. 17. Pp. 4015–4026.
16. Huson D. H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // *Molecular Biology and Evolution*. 2006. No. 23. Pp. 254–267.
17. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. – Vienna, 2012. – 2630 p.

References

1. Mikhailova O. A. The history of breeding and the problem of conservation of rare and endangered species of pigs // *Pig breeding*. 2016. No. 1. Pp. 8–11.
2. Hungarian Mangalica: pros and cons of the breed [Electronic resource]. URL: <https://vusadebke.com/fermerstvo/ghivotnovodstvo/svinyi/vengerskaya-mangalica.html> (access date: 26.06.2019).
3. Georgescu S. E., Manea M. A., Dudu A., Costache M. Phylogenetic relationships of the mangalica swine breed inferred from mitochondrial DNA variation // *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. No. 13 (7). Pp. 8467–8481.
4. Flores L. [et al.] Genetic analysis of Mexican hairless pig populations // *Journal of Animal Science*. 2001. V. 79. Pp. 3021–3026.
5. Mahmoudi B. [et al.] Breed characteristics in Iranian native goat populations // *Journal of Cell and Animal Biology*. 2011. No. 5 (7). Pp. 129–134.
6. Mekuriaw G. [et al.] Review on current knowledge of genetic diversity of domestic goats (*Capra hircus*) identified by microsatellite loci: how those efforts are strong to support the breeding programs? // *Journal of Life Science and Biomedicine*. 2016. No. 6 (2). Pp. 22–32.
7. Zinovieva N. A. [et al.] Assessment of the contribution of different populations to the genetic diversity of pigs of the root of a large white breed // *Agricultural biology*. 2012. No. 6. Pp. 35–42.
8. Lugovoy S. I. Characterization of the gene pool of local breeds of pigs in Ukraine for the loci of the microsatellite DNA // *Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University*. 2013. No. 2 (27). Pp. 67–72.
9. Kharzinova V. R. [et al.] Local breed of pig: comparative analysis of allele-based analysis of microsatellites // *Pig breeding*. 2017. No. 1. Pp. 5–7.
10. Kharzinova V. R. [et al.] Population-genetic characteristic of pigs of breeds Large White, Landrace and Duroc using microsatellites // *Husbandry*. 2018. No. 4. Pp. 2–7.
11. Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update // *Bioinformatics*. 2012. No. 28. Pp. 2537–2539.
12. Keenan K., McGinnity P., Cross T. F., Crozier W. W., Prodöhl P. A. diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors // *Methods in Ecology and Evolution*. 2013. No. 4. Pp. 782–788.
13. Jombart T. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers // *Bioinformatics*. 2008. No. 24. Pp. 1403–1405.
14. Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. – New York : Springer-Verlag, 2009. – 216 p.
15. Jost L. GST and its relatives do not measure differentiation // *Molecular Ecology*. 2008. No. 17. Pp. 4015–4026.
16. Huson D. H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // *Molecular Biology and Evolution*. 2006. No. 23. Pp. 254–267.
17. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. – Vienna, 2012. – 2630 p.