

К.Ф. ПОЧЕРНЯЄВ

Інститут свинарства ім. О.В. Квасницького, УАН, Полтава

РЕКОНСТРУКЦІЯ ПОХОДЖЕННЯ СУЧАСНИХ ПОРІД СВИНЕЙ ЗА ПОЛІМОРФІЗМОМ МИТОХОНДРІАЛЬНИХ ГЕНОМІВ



Для визначення можливих материнських родин італійського походження серед сучасних порід свиней з використанням методу ПЛР-ПДРФ була досліджена мітохондріальна ДНК шести порід євро-американського, однієї азійського походження та дикої свині. Визначена придатність методів виділення ядерної ДНК для ПЛР-аналізу мітохондріальної ДНК. На дослідженій ділянці мітохондріального гена $tRNK^{pro}$ в мітохондріях, виділених з крові тварин, гетероплазмія не спостерігалась. Притаманний тільки диким свиням Італії гаплотип, що характеризується однонуклеотидною заміною в позиції 15524 нуклеотидної послідовності мітохондріального геному свині, у досліджених тварин виявлено не було.

© К.Ф. ПОЧЕРНЯЄВ, 2004

Вступ. Подібність сучасних порід свиней за морфологічними і продуктивними ознаками не завжди є обов'язковим доказом їх однакового походження. Залучення у далекому минулому предкових порід різного генетичного походження, але схожих за екстер'єром, та довга селекція на певні ознаки продуктивності призвела до значної подібності сучасних порід свиней. Визначення предкових форм сучасних порід ускладнюється відсутністю проміжних ланок і не завжди можливо з залученням молекулярно-генетичних маркерів ядерного геному. Наприклад, мікросателітні маркери, які широко використовують в популяційних дослідженнях, мають ряд обмежень, пов'язаних з рекомбінаційними процесами та характером мутацій, що визначають їх поліморфізм [1, 2]. Також значний вплив на визначення походження з використанням маркерів ядерного типу мають ефекти засновника, «шийки пляшки», характерні для популяцій свійських тварин. Використання поліморфізму мітохондріальних геномів дає можливість через ряд поколінь розрізнити в сучасних породах свиней їх предкові форми, незважаючи на міжпорідне схрещування, та викликані довгою селекцією морфологічні зміни [3]. Головними центрами створення порід вважаються Англія, Китай та США [4]. Найбільш істотний вплив на породоутворення свиней в Англії мали тварини китайського та південно-європейського походження, серед останніх неаполітанські [5]. В кінці XIX ст. першим серед англійських заводчиків використав неаполітанських свиней для покращання англійських місцевих порід учень Р. Беквела — Р. Коллінг. Англійські вчені того часу вважали неаполітанську породу нащадком дикої італійської свині [6]. В цей час до Данії з тією ж метою теж відбувався імпорт свиней з країн Середземномор'я [7]. Аналіз нуклеотидних послідовностей фрагмента мітохондріальної ДНК (мтДНК) порід євро-американського, азійського походження та популяцій диких свиней визначив унікальний гаплотип, характерний тільки для мітохондріального геному італійської дикої свині [8]. Виходячи з цього, нами була здійснена спроба серед сучасних порід свиней знайти материнські родини, що успадкували гаплотип італійської дикої свині. Виконання роботи було викликано необхідністю залучення до дослідження процесів породоутворення як історичних, так і молекуляр-

но-генетичних даних. Іншим аспектом роботи стала необхідність всебічного дослідження біорізноманітності порід з метою збереження не тільки цінних генотипів свиней, а й мітохондріальних гаплотипів, господарське значення яких сьогодні в повній мірі невідоме.

Матеріал та методика. *Тварини.* Зразки крові свиней, по п'ять голів від кожної з порід велика біла, велика чорна, дюрок, миргородська, уельс, полтавська м'ясна були взяті в господарствах України, ДНК порід свиней п'єтрен, мейшан та дикої свині надані проф. Гельдерманом (Університет Хохенхейм, Німеччина).

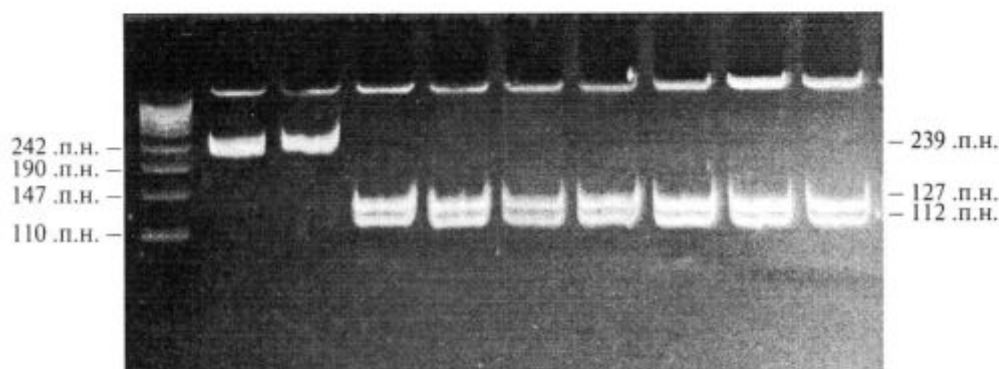
Виділення ДНК та гаплотипування. Виділення сумарної ядерної та мітохондріальної ДНК проводили з використанням хелатного полімера Chelex-100 [9], а також шляхом екстракції білків фенолом [10] та натрій-ацетатом [11]. Ампліфікацію фрагмента гена *tRNK^{PRO}* проводили на програмованому термостаті AMPLY-4 («Биоком», Россия) за наступною програмою: денатурація — 94 °C 0,5 хв, гібридизація праймерів — 58 °C протягом 0,5 хв, синтез — 74 °C 1 хв. Всього проводили 35 циклів. Ампліфікацію проводили з використанням набору реагентів «Тапотили» (ГосНИИ генетики, лаб. молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии, Россия) та олігонуклеотидних праймерів власного дизайну: MITPROF 5'-GCA CCC AAA GCT GAA ATT CTA та MITPRO2R 5'-TTA TAT GCA TGG GGA CTA GCA T, що обмежують ділянку мітохондріального гена *tRNK^{PRO}* розміром 239 пар нуклеотидів. Аліквоту 5 мкл продукту ПЛР гідролізували ендонуклеазою *AspI* («СибЭнзим», Россия). Варіанти гаплотипів утворилися шляхом мутації G→A в позиції 15524 нуклеотидної послідовності мітохондріального геному свині. Нумерація нуклеотидної позиції відповідає повній послідовності мітохондріальної ДНК свині [12]. Продукти ампліфікації і гідролізу ДНК аналізували у 6%-ному поліакриламідному гелі. Як маркер молекулярної маси використовували ДНК плазмиди pUC19, гідролізованої ендонуклеазою *Msp I*. Візуалізацію продуктів ампліфікації та рестрикції здійснювали шляхом фарбування бромистим етидієм і фотографуванням на транслюмінаторі в ультрафіолетовому світлі.

Результати досліджень та їх обговорення. Визначення одонуклеотидних замінів в нуклеїно-

вих кислотах за допомогою поліморфізму довжин рестриктних фрагментів, ампліфікованих у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР-ПДРФ), в порівнянні з секвенуванням дозволяє значно спростити процедуру визначення мітохондріальних гаплотипів і може бути використане для дослідження великих масивів зразків.

В ході роботи досліджено придатність сумарної — ядерної та мтДНК — для ампліфікації мітохондріальних генів. Необхідність виконання цього етапу полягала у складності методу виділення чистої мтДНК. Для цього спочатку була здійснена ампліфікація в ПЛР фрагмента мітохондріального гена *tRNK^{PRO}* розміром 239 п.н. з використанням сумарної ДНК, виділеної за допомогою хелатного полімера Chelex-100. Після одержання позитивного результату — ампліфікації фрагмента мітохондріального гена *tRNK^{PRO}*, була перевірена можливість ампліфікації ДНК, виділеної за допомогою фенольного та натрій-ацетатного екстрагування білків з розчину нуклеїнових кислот. В цих методах присутній етап осадження ядер, і при цьому була можливість втрати мітохондрій. Всі методи виділення ДНК виявилися придатними для аналізу мітохондріального геному за допомогою ПЛР, що робить доступним аналіз мтДНК з колекцій зразків ДНК, накопичених в ході виконання різноманітних наукових проектів.

На можливість використання мтДНК-маркерів впливає також інший фактор. В 1994 р. була визначена варіабельність нуклеотидних послідовностей (гетероплазмія) мітохондріального геному кроля, що спостерігалась в межах одного організму [13]. Дослідження цього явища визначило, що гетероплазмія характерна для ділянки D-петлі, що не містить гени на ділянках, які безпосередньо з ним межують. В протилежність, на ділянці мтДНК, де кодуються гени, гетероплазмія не спостерігається. Частота розподілу типів мтДНК залежить також від типу тканини. В клітинах крові гетероплазмії мтДНК знайдено не було [14]. Мітохондріальний ген *tRNK^{PRO}*, який був нами використаний для дослідження материнського походження свиней, безпосередньо межував з ділянкою D-петлі, тому не виключалась можливість хибного визначення мітохондріальних гаплотипів, викликаних гетероплазмією. Вибір саме



Електрофореграма продуктів ПЛР фрагмента мітохондріального гена тРНК^{PRO} розміром 239 пар нуклеотидів гідролізованих ендонуклеазою *AspLe I* (G↓CGC) в позиції 15524 нуклеотидної послідовності мітохондріального геному свині (6%-ний акріламідний гель): М — маркер молекулярної маси ДНК плазмиди pUC19/Msp I; 1, 2, — негідролізовані продукти ПЛР мтДНК свиней породи уельс; 3–6 — гідролізовані продукти ПЛР мтДНК свиней породи уельс; 7–9 — гідролізовані продукти ПЛР мтДНК свиней великої чорної породи

цієї ділянки мітохондріального геному свині для дослідження пояснюється достатнім рівнем поліморфізму для диференціації порід та наявністю маркерного сайту італійської дикої свині. Для всіх мітохондріальних геномів досліджених тварин був визначений один сайт повної рестрикції *AspLe I* (рисунок), що вказує на відсутність гетероплазмії.

Історичні дані про те, що створення деяких сучасних євро-американських порід відбувалося шляхом гібридизації європейських та азійських свиней, знайшло підтвердження при молекулярно-генетичному аналізі мтДНК [8, 15, 16]. Молекулярно-генетичного свідчення про використання свиней італійського походження поки що немає. Притаманний тільки диким свиням Італії гаплотип, що характеризується однонуклеотидною заміною в позиції 15524 нуклеотидної послідовності мітохондріального геному свині, у досліджених нами тварин теж виявлено не було.

Цілком можливо, що мутація, яка призвела до утворення унікального гаплотипу італійської дикої свині, відбулась пізніше часу доместикації і тому не зустрічається серед італійських порід свиней. Непрямий доказ цього був одержаний при дослідженні мтДНК з кістки викопної свині, знайденої в поселенні Кітей на Керченському півострові в Криму і датованої III ст. до н.е. [17]. Інтенсивний культурно-господарський обмін між регіонами Середземномор'я та грецькими, а згодом італійськими колоніями в Криму допускав можливість заве-

знення також і місцевих свиней Італії. По даній однонуклеотидній заміні гаплотип викопної свині відповідав гаплотипу, характерному для всіх досліджених порід. Більш точні дані про проміжну ланку в процесі породоутворення сучасних євро-американських порід свиней можуть бути отримані при дослідженні мітохондріальних геномів місцевих порід Італії, Іспанії та Португалії.

Висновки. Методи, розроблені для виділення ядерної ДНК, цілком придатні для ПЛР-аналізу мітохондріальної ДНК. На ділянці гена тРНК^{PRO} в мітохондріях, виділених з клітин крові, явище гетероплазмії не спостерігалось, що робить можливим однозначну інтерпретацію даних, одержаних з використанням цього мтДНК маркера. Мітохондріальний гаплотип, притаманний італійській дикій свині, в мітохондріальних геномах досліджених порід свиней визначено не було.

SUMMARY. Mitochondrial DNAs of six pig breeds of Euro-American origin, one breed of Asian origin and of wild boar were studied using PCR-RFLP analysis to detect probable maternal lines of Italian origin among modern pig breeds. In the studied animals the Italian Wild boar haplotype characterized by single nucleotide substitution in the 15524 position of pig mitochondrial genome has not been detected.

РЕЗЮМЕ. Для определения возможных материнских семейств итальянского происхождения среди современных пород свиней с использованием метода ПЦР-ПДРФ была исследована митохондриальная ДНК шести пород евро-американского происхожде-

ния, одна азиатского и дикой свиньи. Определена пригодность методов выделения ядерной ДНК для ПЦР-анализа митохондриальной ДНК. На исследованном участке митохондриального гена *тРНК^{PRO}* в митохондриях, выделенных из крови животных, гетероплазмия не наблюдалась. Свойственный только диким свиньям Италии гаплотип, который характеризуется однонуклеотидной заменой в позиции 15524 нуклеотидной последовательности митохондриального генома свиньи, у исследованных животных обнаружен не был.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kimura M, Ohta T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1978. — **75**. — P. 2868–2872.
2. Ellegren H., Moore S., Robinson N., Byrne K., Wayne W., 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.
3. Почерняев К.Ф. Використання поліморфізму митохондриальної ДНК у дослідженні сільськогосподарських тварин // *Вісн. Полтав. держ. аграр. академії*. — 2003. — № 5. — С. 122–125.
4. Ruvinsky A., Rothschild M.F. The Genetics of the Pig. — Oxon, UK : CAB International, 1998. — 640 p.
5. Кулешов П.Н. Свиноводство. — М.: Сельхозгиз, 1930. — 192 с.
6. Роде О. Свиноводство. — С.-Петербург : Изд. А.Ф.Дервиена, 1884. — 454 с.
7. Хэммонд Дж., Йоганссон И., Харинг Ф. Руководство по разведению животных. — М.: Колос, 1965. — Т. 3, кн. 1. — 488 с.
8. 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. — **154**. — P. 1785–1791.
9. 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.
10. Mathew C.G.P. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // *Methods in mol. biology*. V.2 / Ed. J.M. Walker. — New York; London : Humana press, 1984. — P. 31–34.
11. Соколов Б.П., Джемелинский В.В., Калинин В.Н. Выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК с использованием ацетата калия // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. — 1989. — № 6. — С. 45–46.
12. Ursing B.M., Arnason U. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig // *J. Mol. Evol.* — 1998. — **47**. — P. 302–306.
13. Casane D., Denneboy N., De Rochambeau H., Mounolou J.C., Monnerot M. Genetic analysis of systematic mitochondrial heteroplasmy in rabbits // *Genetics*. — 1994. — **138**. — P. 471–480.
14. Jazin E.E., Cavelier L., Eriksson L., Orelund L., Gyllenstein U. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1996. — **93**. — P. 12382–12387.
15. 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. — **32**. — P. 139–147.
16. Kim K.-I., 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. — **33**. — P. 19–25.
17. Почерняев К.Ф., Каспаров О.К., Лядський І.К. Визначення придатності викопних кісток, знайдених на території України, для аналізу ДНК // *Археологічний літопис Лівобережної України* (передано до друку).

Надійшла 14.04.04