ГЕНЕТИКА, 2025, том 61, № 6, с. 58–69

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.113: 636.4.033

ХАРАКТЕРИСТИКА КОНВЕРСИИ КОРМА ПО ПОЛОВЫМ ХРОМОСОМАМ МЕТОДОМ ПОЛНОГЕНОМНОГО АССОЦИАТИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

© 2025 г. А. А. Белоус[1, *], П. И. Отраднов[1], А. А. Сермягин[1], Н. А. Зиновьева[1]

[1]*Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская область, пос. Дубровицы, 142132 Россия*

**e-mail: belousa663@gmail.com*

Поступила в редакцию 27.12.2024 г.
После доработки 23.01.2025 г.
Принята к публикации 27.01.2025 г.

Изучение количественных и качественных признаков с точки зрения генетической направленности невозможно без учета болезней или особенностей, сцепленных с полом. В настоящее время геномная селекция по половым хромосомам, проведенная методом полногеномного ассоциативного исследования, не была ключевым фактором для разработки специального кода и функциональной аннотации генов с учетом библиотек GO, KEGG и анализа ранее выявленных генов. Целью научно-практического исследования было создание программного кода для проведения GWAS по половым хромосомам свиней и поиск функционально значимых генов для объяснения связи «фенотип – генетика пола», которая в дальнейшем конкретизирует селекционный отбор свиней в нуклеус популяции и позволит заранее прогнозировать наследственные заболевания животных. В данной статье мы впервые провели GWA-анализ геномных оценок племенной ценности признака конверсии корма с учетом только половых хромосом (sGWAS). Структурная аннотация выявила 21 ген, расположенный на X-хромосоме, и восемь генов – на Y-хромосоме, включая гомологичный участок XY. Проведенный кластерный анализ полученных генов обнаружил значимую взаимосвязь с коэффициентом конверсии корма у восьми из них: *STS*, *DDX3X*, *PUDP*, *PNPLA4*, *DHRSX*, *GPR143*, *SHROOM2* и *PRKX*. Функциональная аннотация данных генов выявила их значительный вклад в биологические процессы организма, включая наследственные заболевания и специфичность сцепленных с полом.

Ключевые слова: половые хромосомы, sGWAS, конверсия корма, структурная аннотация генов, функциональная аннотация генов, хряки породы дюрок.

DOI: 10.31857/S0016675825060051 **EDN:** SWHFBH

Развитие геномных технологий с учетом биоинформационного анализа данных для практического применения является одной из основных задач в рамках стратегии научно-технологического развития Российской Федерации [1]. Одной из интенсивных отраслей продуктивного животноводства считается свиноводство – из-за быстрого роста и смены поколений. Также свиньи являются важными модельными организмами для выявления и тестирования многих наследственных заболеваний человека.

Геном свиней состоит из 18 пар аутосом и половых хромосом [2]. X-хромосома показывает небольшую интерстициальную C-полосу на коротком плече и большую G-полосу на длинном плече, что, как полагают, коррелирует с повторяющимся содержимым [3, 4]. Одна известная псевдоаутосомная область (PAR) лежит на конце короткого плеча X-хромосомы, и несколько генов, например KAL1 и STS, были сопоставлены с PAR свиньи и могут быть идентичными у других видов млекопитающих [5].

Y-хромосома является самой маленькой из всех хромосом свиньи, и информация о ее структуре и содержании генов остается малоизученной с момента идентификации половых хромосом данного вида [6]. Цитогенетические исследования показали, что Y-хромосома свиньи является метацентрической, длина которой, по данным проточной цитометрии, составляет около 50 Мб [7]. В ранних исследованиях, посвященных изучению рисунка полос Y-хромосомы, было отмечено, что длинное плечо (Yq) содержит большую полосу C, что указывает на содержание значительной доли

конститутивного гетерохроматина [3, 8]. Физическое картирование клонов бактериальных искусственных хромосом, содержащих Y-хромосомы, с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) показало, что длинное плечо может быть почти полностью окрашено одним клоном, в то время как большинство из последовательностей с одной копией находятся на коротком плече [5]. Такой уровень повторяющейся последовательности еще больше усложняет попытки секвенировать данную хромосому, что является проблемой, характерной для Y-хромосом млекопитающих (например, мыши) [9–11].

Некоторые подсказки относительно структуры Y-хромосомы свиньи были получены в результате поиска специфических для самцов последовательностей ДНК, который позволил обнаружить короткие повторяющиеся последовательности, специфические для самцов [12, 13]. Идентичность последовательностей между различными повторами составляет от 80 до 91%, но вместе данные последовательности частично объясняют повторяющуюся природу SSCYq. Широкая организация SSCYq кажется сложной, но очевидно, что она содержит расширяющуюся и расходящуюся группу повторов. Однако остается неизвестным, существуют ли области гомологии XY на длинном плече Y-хромосомы, вкрапленные среди повторяющегося содержимого.

Полногеномное ассоциативное исследование (**GWAS**) используется для выявления геномных вариантов или генов, которые статистически связаны с определенным признаком или заболеванием. Благодаря данному методу были сформированы тест-системы как у людей, так и у сельскохозяйственных животных. Но данная методология, как правило, используется только на аутосомных или на совокупных данных всего генома изучаемого вида. GWAS-анализ с выявлением генов исключительно по половым хромосомам у сельскохозяйственных животных в настоящее время не проводился как в России, так и за рубежом.

Учитывая вышеизложенное, целью данного исследования было создание программного кода для формирования GWAS по половым хромосомам свиней и поиск функционально значимых генов для объяснения связи «фенотип – генетика пола», которая в дальнейшем конкретизирует селекционный отбор свиней в нуклеус популяции и позволит заранее прогнозировать наследственные заболевания животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на хряках породы дюрок (n = 2571) по геномным оценкам племенной ценности признака конверсии корма (GEBV FCR). В качестве материала для молекулярно-генетических исследований использовали пробы ткани (ушные выщипы). Выделение ДНК проводили с помощью наборов для геномной ДНК серии «ДНК-Экстран» (ЗАО «Синтол», Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Концентрацию двухцепочечной ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen/Life Technologies, США). Для определения качества ДНК измеряли соотношение OD260/OD280 (спектрофотометр NanoDrop8000, ThermoFisher Scientific, США). Для анализа использовали ДНК с OD260/OD280 = = 1.6–1.8. Полногеномное ассоциативное исследование по половым хромосомам (sGWAS) проводили с использованием высокоплотных ДНК-чипов Porcine GGP HD (платформа GeneSeek Genomic Profiler, «Neogene», США), содержащих ≈70 тыс. SNP, из которых 3253 расположены на половых хромосомах. Контроль качества и фильтрацию данных генотипирования для каждого образца и SNP, локализованных на половых хромосомах, выполняли, применяя следующие фильтры:

— call-rate по всем исследуемым SNP для индивидуального образца не ниже 90%;

— call-rate для каждого из исследованных SNP по всем генотипированным образцам не ниже 90%;

— частота встречаемости минорных аллелей (MAF) $\geqslant 0.03$;

— отклонение генотипов по SNP от распределения по Харди–Вайнбергу в совокупности протестированных образцов.

По данному виду полногеномного ассоциативного исследования мы ввели следующее обозначение: **sGWAS** (sex-chromosome GWAS) – GWAS, учитывающий только половые хромосомы.

Геномный BLUP (Genomic BLUP, GBLUP) идентичен по применяемой методологии решения уравнения обычному BLUP, однако матрица родства A заменяется матрицей геномного сходства G, учитывающей как генотип по каждому SNP, так и частоту этого генотипа:

$$G = \frac{CC'}{2\sum p_i(1-p_i)}$$

где C' – транспонированная матрица C, p_i – частота встречаемости минорного варианта (MAF) для i-го SNP, C – «центрированная матрица» SNP-маркеров, которая рассчитывается следующим образом:

$$C = M - 2P$$

где M – матрица содержания SNP-файла (закодированный генотип SNP-маркеров), P – матрица частот генотипов.

Таким образом, между животными рассчитывается тип родства, позволяющий также учесть, какие сегменты хромосом унаследовали потомки от предков (при наличии подобных в выборке).

Исходя из этого, решение уравнения GBLUP имеет вид:

$$\begin{bmatrix} X'X\sigma_e^{-2} & X'Z\sigma_e^{-2} \\ Z'X\sigma_e^{-2} & Z'Z\sigma_e^{-2}+G^{-1}\sigma_a^{-2} \end{bmatrix}\begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{a} \end{bmatrix}=\begin{bmatrix} X'y\sigma_e^{-2} \\ Z'y\sigma_e^{-2} \end{bmatrix}$$

где X, Z – матрицы распределения наблюдений (записей о фенотипах в группах эффектов); X', Z' – транспонированные матрицы X и Z; σ^{-2}_a – генетическая варианса (дисперсия) оцениваемого признака, σ^{-2}_e – остаточная (негенетическая) варианса оцениваемого признака, G^{-1} – обратная матрица геномного сходства.

Оценки племенной ценности, получаемые в результате применения GBLUP, называют GEBV (Genomic EBV).

Поиск генов-кандидатов, внутри которых локализованы идентифицированные SNP, и участков, сцепленных с ними (± 0.2 Мб), осуществлялся по сборке генома Sscrofa11.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000003025.6) по специально разработанному коду на языке программирования R. Функциональные аннотации и выявление обогащения генов выполняли с привлечением веб-программы DAVID (https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp). Построение сети взаимосвязи между генами и образцами 3D моделей белков проводили в веб-программе STRING (https://string-db.org).

РЕЗУЛЬТАТЫ

После фильтрации и контроля качества данных генотипирования для проведения sGWAS на основе массива GEBV FCR осталось 677 SNP. В порог достоверности вошли 72 SNP, из них наибольшее количество было локализовано на X-хромосоме – 57 (рис. 1).

Поиск кластерного расположения генов с учетом *K*-средних (алгоритм кластеризации на основе центроида, где вычисляется расстояние между каждой точкой данных и центроидом, чтобы назначить его кластеру) обнаружил взаимосвязь восьми генов: *STS*, *DDX3X*, *PUDP*, *PNPLA4*, *DHRSX*, *GPR143*, *SHROOM2* и *PRKX* (рис. 2).

Была проведена структурная аннотация в программной среде R в специально разработанном коде. Преимуществом данного кода является автоматическая идентификация выявленных SNP по заданной сборке генома. От веб-программы Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) его отличает значительное преимущество – благодаря разработанному алгоритму SNP, расположенные внутри генов, отмечаются «*», пример представлен в табл. 1.

Структурная аннотация выявила 21 ген, расположенный на хромосоме X, и восемь генов – на хромосоме Y, включая гомологичный участок XY (табл. 1).

Дальнейшая функциональная аннотация проводилась с учетом не только веб-программ для поиска путей GO и KEGG, но и анализом идентифицированных генов, которые были ранее продемонстрированы в исследованиях генетики различных видов сельскохозяйственных животных, в том числе *Sus scrofa*, а также у людей. Ген *PRKX* обнаружен на участке конца длинного плеча X-хромосомы, но его функциональность у свиней до сих пор мало изучена [14]. Известно, по пути GO, что он соотнесен с развитием и метаболическими процессами в почках. Следующие гены *PUDP* и *STS* взаимодействуют друг с другом, и при мутации

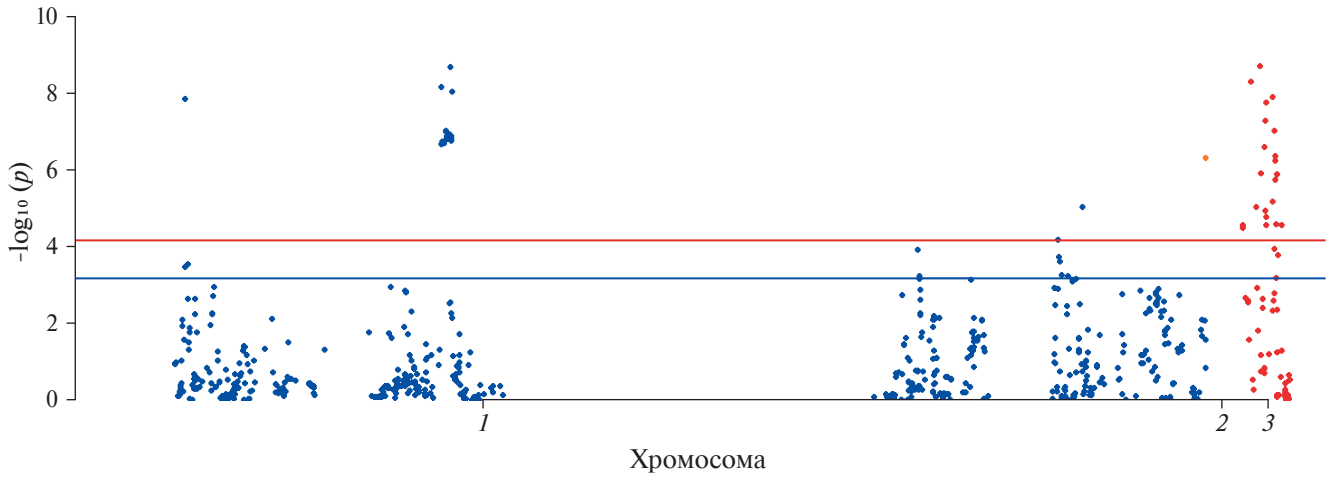

Рис. 1. Полногеномное ассоциативное исследование по половым хромосомам. *1* – хромосома X, *2* – хромосома Y, *3* – гомологичный участок хромосом X и Y.

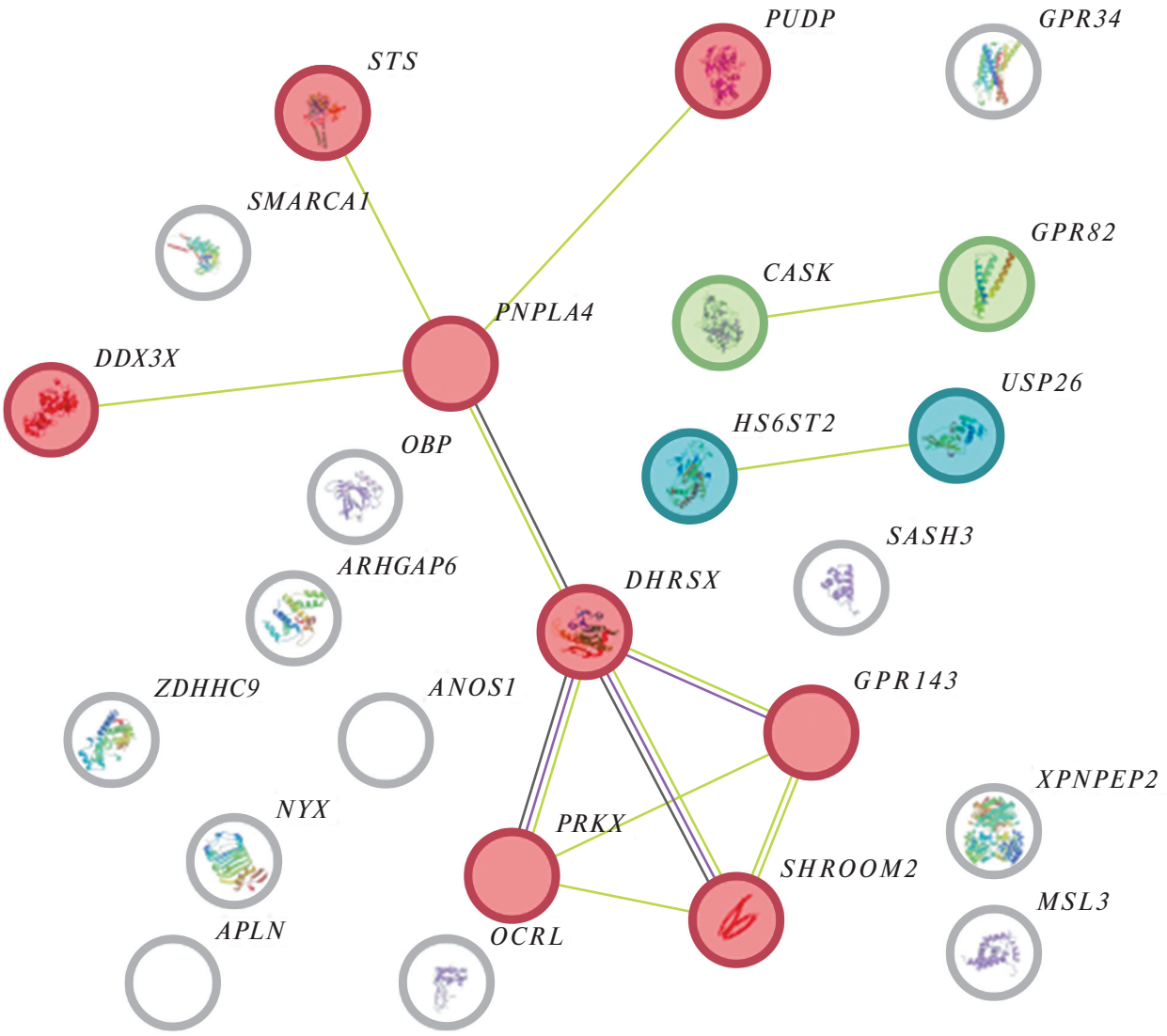

Рис. 2. Кластерная взаимосвязь генов, полученная с применением программы STRING (string-db.org).

возникает сцепленный с Х-хромосомой рецессивный ихтиоз, который клинически характеризуется темно-коричневой распространенной сухостью с полигональными чешуйками [15].

Рецессивный Х-сцепленный ихтиоз – это нарушение кератинизации, вызванное ошибкой врожденного метаболизма, которое поражает примерно 1 : 2000 – 1 : 6000 мужчин (*Homo sapiens*). Женщины-носители не проявляют заболевание, за редкими исключениями. Клинические проявления возникают в раннем возрасте и включают генерализованную сухость и шелушение кожи с полигональными правильными темными чешуйками. Часто поражаются туловище, конечности, шея, уши и кожа головы. Как таковой ихтиоз (или ихтиозоподобные расстройства) был выявлен у ряда сельскохозяйственных животных: крупный рогатый скот [16], овцы [17], ламы [18] и чаще всего возникает у плода.

Аннотация гена *PNPLA4* выявила, что он катализирует гидролиз триглицеридов и участвует в метаболизме ретинол-эфира в организме, в частности, в эпидермисе. Ген *PNPLA4* расположен на Х-хромосоме у исследованных геномов плацентарных млекопитающих и идентифицирован у сумчатого опоссума, курицы, ящерицы-анолиса, когтистой жабы, данио-рерио и ланцетника [19]. Следующий ген *ANOS1*, кодирующий аносмин-1 и ответственный за Х-сцепленную форму синдрома Каллмана, ранее был известен под номенклатурой *KAL1*. Организация по геному человека (HUGO) [20] в 2015 г. предложила сообществу

Таблица 1. Структурная аннотация генов

Хромосома	Группа SNP и достоверность	Ген	Протяженность, пн
X	CASI0009866...6.572e-24; WU_10.2_X_144210530 2.985e-23; WU_10.2_X_144141530*...4.585e-23	*PRKX*	657421...753739
X	WU_10.2_X_1965597...5.276e-09	*OBP*	2012066...2019074
X	M1GA0027048...1.275e-16; WU_10.2_X_3574297...9.155e-16; WU_10.2_X_4126360...5.824e-14; WU_10.2_X_4151415 1.105e-13; ASGA0097527*...1.837e-08; WU_10.2_X_3790883*... 5.478e-08; WU_10.2_X_3755475...2.62e-07; MARC0114252 1.197e-05; WU_10.2_X_3987877*...1.709e-05; WU_10.2_X_3997107*...2.874e-05	*PUDP*	3577487...3876142
X	WU_10.2_X_4126360*...5.824e-14; WU_10.2_X_4151415*... 1.105e-13; ASGA0097527...1.837e-08; WU_10.2_X_3987877... 1.709e-05; WU_10.2_X_3997107...2.874e-05	*STS*	3926027...4076900
X	H3GA0051305...1.354e-08; WU_10.2_X_4827746...9.803e-08; ASGA0080531...4.498e-07; WU_10.2_X_4933640...5.994e-07; WU_10.2_X_4963047...1.865e-06; WU_10.2_X_4618039...6.787e-06	*PNPLA4*	4540846...4623831
X	ASGA0080658...2.883e-05	*ANOS1*	5163638...5363835
X	WU_10.2_X_9178400*...1.506e-08	*ARHGAP6*	7910851...8441579
X	WU_10.2_X_9178400...1.506e-08	*MSL3*	8519366...8535249
X	WU_10.2_X_41333759...7.429e-09; ALGA0099682...2.272e-07	*DDX3X*	36988031...37005496
X	WU_10.2_X_41333759 7.429e-09; WU_10.2_X_41447307 1.921e-07; DIAS0000190 2.084e-07; ALGA0099682 2.272e-07	*NYX*	37080197...37105513
X	WU_10.2_X_41333759...7.429e-09; WU_10.2_X_41859130 9.637e-08; WU_10.2_X_41829741 1.048e-07; WU_10.2_X_41945318...1.373e-07; WU_10.2_X_41932385... 1.625e-07; WU_10.2_X_41447307*...1.921e-07; DIAS0000190*...2.084e-07; ALGA0099688*...2.126e-07; ALGA0099682...2.272e-07	*CASK*	37166973...37535723
X	WU_10.2_X_41333759 7.429e-09; WU_10.2_X_41447307... 1.921e-07; DIAS0000190 2.084e-07; ALGA0099688...2.126e-07; ALGA0099682 2.272e-07	*GPR34*	37306490...37313626
X	WU_10.2_X_41447307...1.921e-07; DIAS0000190...2.084e-07; ALGA0099688...2.126e-07; ALGA0099682...2.272e-07	*GPR82*	37328672...37334144
X	WU_10.2_X_122022473...6.741e-05	*SMARCA1*	106039961...106116156
X	WU_10.2_X_122022473...6.741e-05	*OCRL*	106124991...106188066

Таблица 1. Окончание

Хромосома	Группа SNP и достоверность	Ген	Протяженность, пн
X	WU_10.2_X_122022473...6.741e-05	*APLN*	106236746...106246563
X	WU_10.2_X_122022473...6.741e-05	*XPNPEP2*	106333785...106363412
X	WU_10.2_X_122022473...6.741e-05	*SASH3*	106373871...106389454
X	WU_10.2_X_122022473...6.741e-05	*ZDHHC9*	106397139...106436103
X	WU_10.2_X_125030741*...9.347e-06	*HS6ST2*	108755577...109043976
X	WU_10.2_X_125030741...9.347e-06	*USP26*	109092622...109095548
Y	MARC0016732...2.77e-05; WU_10.2_X_948876...3.255e-05	*OBP*	1145927...1179835
Y	WU_10.2_X_2598061...3.026e-22; WU_10.2_X_2626938... 3.432e-13; WU_10.2_X_2692794 9.608e-06	*PUDP*	2681502...2701629
Y	WU_10.2_X_2598061...3.026e-22; WU_10.2_X_3245184... 1.279e-12; WU_10.2_X_2692794...9.608e-06	*STS*	2747102...2828322
Y	WU_10.2_X_4914926...5.175e-07; ASGA0099463...3.258e-19; M1GA0027048...1.275e-16; WU_10.2_X_3574297...9.155e-16; WU_10.2_X_3755475...2.62e-07; MARC0039838...1.266e-06	*PNPLA4*	3287635...3369286
Y	WU_10.2_X_4126360*...5.824e-14; WU_10.2_X_4151415*... .105e-13; ASGA0097527...1.837e-08; WU_10.2_X_3987877... 1.709e-05; WU_10.2_X_3997107...2.874e-05	*ANOS1*	3807032...4014112
Y	WU_10.2_X_4827746 9.803e-08; ASGA0080531 4.498e-07; WU_10.2_X_4933640 5.994e-07; WU_10.2_X_4963047 1.865e-06; ALGA0099076 2.62e-05	*GPR143*	4669764...4704304
Y	WU_10.2_X_4827746...9.803e-08; ASGA0080531...4.498e-07; WU_10.2_X_4933640...5.994e-07; WU_10.2_X_5143157 1.343e-06; WU_10.2_X_4963047*...1.865e-06; ALGA0099076...2.62e-05	*SHROOM2*	4753733...4785766
Y	ASGA0080658...2.883e-05	*DHRSX*	5248447...5374873

Примечание. * – SNP, локализованные внутри гена.

стандартизировать номенклатуру гена *KAL1* на *ANOS1*. Ген *ANOS1* был впервые описан как генетическая гетерогенная ассоциация между отсутствием обоняния (аносмия) и гипогонадотропным гипогонадизмом, как причина бесплодия [21, 22], с распространенностью, оцениваемой примерно от 1 : 8000 у мужчин и 1 : 40000 у женщин [21].

У взрослых пациентов обычно наблюдаются нормальные или низкие уровни циркулирующих гонадотропинов и низкие уровни сывороточных гонадных гормонов из-за нарушения функции системы гонадотропин–рилизинг–гормон – главных регуляторов гормональной репродуктивной оси. Отсутствие обоняния является результатом дефекта развития обонятельной луковицы [22]. Обонятельные и репродуктивные нарушения могут сочетаться с другими дефектами или сопутствующими симптомами, включая агенезию почек, зеркальное движение (синкинезию), синдактилию, краниофациальные аномалии, колобому и нейросенсорную глухоту.

Ген *ARHGAP6* также сцеплен с Х-хромосомой и имеет доминантный, летальный для особей мужского пола синдром – микрофтальмию с

линейными дефектами кожи, которая характеризуется апластическим кожным покровом и агенезией мозолистого тела [23]. Аналогичных исследований на животных не проводили.

Сцепленный с полом на Х-хромосоме ген *MSL3* кодирует субъединицу комплекса специфического летального поражения самцов, связанного с хроматином [24]. Он был впервые идентифицирован и был описан как основная генетическая причина синдрома Базиликаты–Ахтар (MIM 301032) – Х-сцепленного нейроразвивающегося расстройства, которое в равной степени поражает как женщин, так и мужчин [25]. Ген *DDX3X* ранее был обнаружен как специфичный для определения пола, идентификации ооцитов свиней, биопсий эмбрионов, бластоцист 6-го дня и плодов 35-го дня [26].

Мутации в гене *NYX*, который кодирует никталопин, приводят к врожденному нарушению сетчатки глаза и к так называемой «ночной слепоте», которая характеризуется дефектным ночным зрением (никталопия) с рождения. Никталопин имеет неизвестную функцию, но, как предполагается, является секретируемым гликопротеином семейства внеклеточных малых лейцин-богатых повторов протеогликана и белка, прикрепленного к клеточной мембране у людей через якорь гликозилфосфатидилинозитола, а у мышей – через трансмембранный домен [27].

Как сообщается в исследовании [28], ген *CASK* (мембранно-ассоциированный белок гуанилаткиназы) играет роль в развитии и функционировании мозга как у грызунов, так и у людей. У людей мутации в данном гене приводят к Х-сцепленной микроцефалии и умственной отсталости [29]. У мышей нокаут данного гена вызывает неонатальную летальность, а снижение его экспрессии в мозге приводит к уменьшению мозжечка [30]. Данные результаты указывают на критическую роль гена *CASK* в нервной системе, а по GO он влияет на импорт ионов кальция (табл. 2).

Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), участвуют в регуляции многочисленных физиологических функций, в том числе играют иммуномодулирующую роль и распознают лизофосфатидилсерин (LysoPS) в качестве предполагаемого лиганда. Ген *GPR34* является сцепленным с Х-хромосомой, и его мутации могут стать значимыми даже при низкой частоте встречаемости в популяции. Текущие знания о строении гена основаны только на геномном анализе кодирующей области у позвоночных, однако структурное разнообразие может также определяться аллельными вариантами и супрагеномными процессами, такими как сплайсинг и редактирование мРНК, а также на трансляционном уровне [31].

Для изучения функциональной значимости гена *GPR82* были охарактеризованы мыши с его дефицитом, которые были жизнеспособны, нормально размножались и не показывали явных анатомических аномалий. Однако такие мыши имеют сниженную массу тела и содержание жира в организме, что связано с более низким потреблением пищи. Более того, они показали сниженные уровни триацилглицеридов в сыворотке крови, повышенную чувствительность к инсулину и толерантность к глюкозе, что является наиболее выраженным при высококалорийном рационе. Поскольку

Таблица 2. Функциональная аннотация генов

Ген	DAVID
PRKX	Метаболизм и развитие почек
PUDP	Процесс биосинтеза глицерина
STS	Информация отсутствует
PNPLA4	Катаболический процесс триглицеридов, липидный гомеостаз
ANOS1	Дифференцировка нейронов
ARHGAP6	Информация отсутствует
MSL3	Информация отсутствует
DDX3X	Генерация гамет, врожденный иммунный ответ
NYX	Визуальное восприятие
CASK	Импорт ионов кальция
GPR34	Информация отсутствует
GPR82	Информация отсутствует
SMARCA1	Информация отсутствует
OCRL	Внутриутробное эмбриональное развитие
APLN	Развитие коронарной сосудистой системы
XPNPEP2	Информация отсутствует
SASH3	Позитивная регуляция роста органов
ZDHHC9	Информация отсутствует
HS6ST2	Информация отсутствует
USP26	Информация отсутствует
GPR143	Информация отсутствует
SHROOM2	Информация отсутствует
DHRSX	Метаболический процесс в сетчатке

нет никаких различий в скорости дыхания и метаболизма между мышами дикого типа и мышами с дефицитом гена *GPR82*, можно сделать вывод о том, что функция гена *GPR82* влияет как на потребление пищи, так и на баланс энергии и веса тела в целом [32].

Глазной альбинизм 1-го типа (**ГА1**) – это сцепленное с Х-хромосомой заболевание, которое является наиболее распространенной формой глазного альбинизма, с предполагаемой распространенностью 1 на 60 000 при рождении. ГА1 характеризуется серьезным снижением остроты зрения, рефракционными ошибками, нистагмом (быстрые движения глаз, которые неоднократно повторяются и неподконтрольны воле человека), прозрачностью радужной оболочки, гипопигментацией глазного дна, фовеолярной гипоплазией и потерей стереоскопического зрения из-за неправильного направления зрительных волокон в зрительном перекресте [33]. ГА1 возникает из-за мутаций в гене рецептора IG-белка, связанного с глазным альбинизмом (*GPR143*) (Online Mendelian Inheritance in Man № 300500). Данный белок рецептора, связанный с G-белком, экспрессируется в меланоцитах глаза и эпидермиса и может быть меланосомным трансмембранным белком. Ген *GPR143* – это специфичный для пигментных клеток внутриклеточный гликопротеин, состоящий из 404 аминокислотных остатков, который мутирует у пациентов с ГА1 [34].

Семейство АТФ-зависимого ремоделирования хроматина состоит из белков, которые содержат хорошо сохранившийся домен *SNF2*, и может быть подразделен на подсемейства SWI/SNF, ISWI, CHD и INO80, различающиеся дополнительными мотивами взаимодействия хроматина и отдельными взаимодействующими белками-партнерами [35]. Данные комплексы ремоделирования используют энергию гидролиза АТФ для перемещения нуклеосом и имеют решающее значение для репликации, транскрипции и репарации ДНК. Семейство ISWI млекопитающих состоит из двух генов, *SMARCA1* и *SMARCA5*, которые кодируют белки ремоделирования SNF2L и SNF2H соответственно и являются ортологами белка ISWI дрозофилы. Биохимические исследования показывают, что белковые комплексы ISWI участвуют в сборке и размещении нуклеосом, репликации гетерохроматина, организации структуры хромосом более высокого порядка и регуляции транскрипции [36].

Мутации в гене *OCRL*, кодирующем инозитолполифосфат-5-фосфатазу (белок окулоцеброренального синдрома Лоу), нарушают гомеостаз фосфоинозитида вдоль эндолизосомального пути, вызывая дисфункцию клеток, выстилающих проксимальные канальцы почек. Дисфункция может быть изолированной (болезнь Дента) или связанной с врожденной катарактой, центральной гипотонией и умственной отсталостью (синдром Лоу) [37, 38].

Связь между репродуктивным успехом животных и их метаболическим статусом изучается в течение многих лет. Растущее количество доказательств указывает на важную роль адипоцитокинов, полученных в основном из белой жировой ткани (БЖТ) и вовлеченных в регуляцию энергетического обмена. Апелин, член группы адипокинов, был первоначально выделен из желудка быка в 1998 г. и идентифицирован как лиганд рецептора, связанного с орфанным G-белком (рецептор апелина, также называемый APLNR) [39]. Гормон кодируется геном *APLN*, расположенным на человеческой хромосоме Xq25-26 и свиной Х-хромосоме. Продуктом обоих генов, человеческого и свиного, является препропротеин, состоящий из 77 аминокислот, который посредством протеолитического расщепления дает несколько биоактивных пептидов, таких как апелин-36, апелин-17, апелин-13 или пироглутамат-апелин-13 [40].

Было также обнаружено, что апелин оказывает плейотропное действие на организм. Гормон участвует в регуляции функционирования сердечно-сосудистой системы, регуляции давления и кровотока, потреблении воды и пищи, а также в ангиогенезе [41]. Также было обнаружено, что апелин участвует в регуляции важных метаболических процессов, таких как секреция инсулина, и сообщалось о его стимулирующем эффекте на усвоение и транспорт глюкозы, на окисление жирных кислот и его ингибирующем эффекте на липолиз [42, 43]. Существует общий дефицит данных относительно действия гормонов на репродуктивные функции млекопитающих и не только во время беременности.

Присутствие гормона апелина, его рецепторных генов и белков в репродуктивных структурах было исследовано в различных тканях многих организмов, таких как яичники человека, свиньи, быка и овцы, яйцеводы овец, матки крыс и овец, а также в плацентах человека и собак [44–47]. В одном из немногих исследований, проведенных A. Rak с соавт., указан модуляторный эффект апелина на стероидогенез яичников свиней [46]. Гормон увеличил базальную секрецию стероидов, но снизил их высвобождение, вызванное инсулиноподобным фактором роста 1 и фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ), а также экспрессию ферментов, участвующих в процессе стероидогенеза [48]. Q.L. Duan с соавт. обнаружили значительную связь с локусом, который включает ген *XPNPEP2*, кодирующий мембраносвязанный APP (низкая активная плазменная аминопептидаза P) [49].

Ген *SASH3* – это внутриклеточный адаптерный белок, который экспрессируется в основном

в лимфоцитах и важен для пролиферации, активации и выживания Т-клеток. O.M. Delmonte с соавт. [50] описывают новый человеческий Х-сцепленный иммунодефицит, вызванный гемизиготными вариантами потери функции гена *SASH3*. У пациентов с данным иммунодефицитом наблюдаются аномалии в Т-клетках, а также нарушение иммунной регуляции, проявляющееся в виде рецидивирующих инфекций и рефрактерных аутоиммунных цитопений [50].

Ген *ZDHHC9* (цинковый палец, содержащий тип DHHC 9) – это протеиновая ацилтрансфераза, участвующая в пальмитоилировании основных сигнальных молекул. S. Maak с соавт. [51] обнаружили, что экспрессия *ZDHHC9* увеличилась в мышцах задних ног новорожденных поросят с раздвинутыми ногами. Оказалось, что их вариации экспрессии не зависят от гена *ZDHHC9*, что исключает их причинно-следственную связь с врожденным смещением ног [51]. Ген *HS6ST2*, расположен на Х-хромосоме и сцеплен с умственной отсталостью и тяжелой миопией у близнецов мужского пола [52].

В течение последних десятилетий связь между мутациями в убиквитин-специфической протеазе 26 (USP26) и мужским бесплодием остается сомнительной. Q.Y. Li с соавт. [52] провели метаанализ, чтобы оценить связь между мутациями в *USP26* и мужским бесплодием в соответствии с рекомендациями Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) 2020. Исследования включали мутации гена *USP26* у пациентов с азооспермией, олигозооспермией и астенозооспермией с нормальными значениями параметров спермы или партнеров, у которых наступила спонтанная беременность. Результаты показали, что несколько мутаций (кластерная мутация, c.1737G>A) могут играть роль в мужском бесплодии, в то время как другие (c.576G>A и c.1090C>T) не показывают заметных ассоциаций с мужским бесплодием [53].

Псевдоаутосомная граница (PAR), проксимальная к гену *SHROOM2* у свиньи, согласуется с картированием PAR у коровы и собаки – PAR данных видов находится в интервале между генами *SHROOM2* и *GPR143* у коровы и дистальнее у собаки. Кроме того, исследования B.M. Skinner с соавт. [54] также указывают на то, что гены *SHROOM2* и *GPR143* являются псевдоаутосомными у морской свиньи. Данные результаты позволяют предположить, что свинья сохранила большую часть предковой цетариодактильной PAR [54]. И аннотация Х-хромосомы выявила ген *DHRSX*, который кодирует неклассический секреторный белок и способствует аутофагии, вызванной голоданием [54, 55].

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное полногеномное ассоциативное исследование по половым хромосомам имеет ряд преимуществ, одно из которых – выявление генов, взаимосвязанных с половой дифференциацией или наследственными заболеваниями, сцепленных с определенным хозяйственно-полезным признаком, по которому проводится отбор животных. Так как в настоящем исследовании данные гены высоко достоверны и у свиней близким ортологом является человек, то необходимо дальнейшее предметное изучение данного вопроса на молекулярно-белковом уровне. Взаимосвязь генов *PUDP* и *STS* может быть обусловлена тем, что при врожденной задержки полового развития и бесплодия, активируется мутация, отвечающая за возникновение ихтиоза – заболевание, характеризующиеся повышенным ороговение кожного покрова, сцепленное с полом.

Не меньший интерес представляли гены *ARHGAP6* и *MSL3*, которые оказались летальными для мужских особей, но при этом, они локализовались на Х-хромосоме (женская особь является носителем). Ген *APLN*, кодирующий гормон апелин, который участвует в регуляции важных метаболических процессов, таких как секреция инсулина и имеет стимулирующий эффект на усвоение и транспорт глюкозы, на окисление жирных кислот и его ингибирующем эффекте на липолиз – метаболический процесс расщепления жиров на составляющие их жирные кислоты под действием липазы.

Полученные результаты проведенной научно-практической работы показывают, что при отборе животных с применением геномной оценки на основании GBLUP по коэффициенту конверсии корма, который является одним из основных экономически значимых характеристик популяции, необходимо учитывать возможность возникновения летальных генов и/или мутаций из-за быстрой смены поколения и сокращенного генерационного интервала.

Исследования проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации за счет государственного задания.

Исследование одобрено Этическим комитетом по биоэтики ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, дата 14.11.2022 г., протокола № 2022-11/1.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Указ Президента РФ от 28.02.2024 № 145 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации».
2. *Gustavsson I.* Standard karyotype of the domestic pig. Committee for the Standardized Karyotype of the Domestic Pig // Hereditas. 1988. V. 109. P. 151–157. https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1988.tb00351.x
3. *Adega F., Chaves R., Guedes-Pinto H.* Chromosome restriction enzyme digestion in domestic pig (*Sus scrofa*) Constitutive heterochromatin arrangement // Genes Genet. Syst. 2005. V. 80. P. 49–56. https://doi.org/10.1266/ggs.80.49
4. *Hansen K.M.* Sequential Q- and C-band staining of pig chromosomes, and some comments on C-band polymorphism and C-band technique // Hereditas. 1982. V. 96. P. 183–189. https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1982.tb00848.x
5. *Quilter C.R., Blott S.C., Mileham A.J. et al.* A mapping and evolutionary study of porcine sex chromosome gene // Mamm. Genome. 2002. V. 13. P. 588–594. https://doi.org/10.1007/s00335-002-3026-1
6. *Cornefert-Jensen F., Hare W.C., Abt D.A.* Identification of the sex chromosomes of the domestic pig // J. Hered. 1968. V. 59. P. 251–255. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a107710
7. *Grunwald D., Geffrotin C., Chardon P. et al.* Swine chromosomes: flow sorting and spot blot hybridization // Cytometry. 1986. V. 7. P. 582–588. https://doi.org/10.1002/cyto.990070613
8. *Thomsen P.D., Hindkjaer J., Christensen K.* Assignment of a porcine male-specific DNA repeat to Y-chromosomal heterochromatin // Cytogenet. Cell Genet. 1992. V. 61. P. 152–154. https://doi.org/10.1159/000133395
9. *Alfoldi J., Skaletsky H., Graves T. et al.* Sequence of the mouse Y Chromosome. Seattle: USA, 2004.
10. *Alföldi J.E.* Sequence of the mouse Y chromosome: PhD Thesis. Massachusetts: Massachusetts Inst. Technol., Department of Biol., 2008.
11. *Hamilton C.K., Revay T., Domander R. et al.* A large expansion of the HSFY gene family in cattle shows dispersion across Yq and Testis-Specific Expression // PLoS One. 2011. V. 6 (3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017790
12. *Horng Y.-M., Huang M.-C.* Male-specific DNA sequences in pigs // Theriogenology. 2003. V. 59. P. 841–848. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01150-0
13. *Pérez-Pérez J., Barragán C.* Isolation of four pig male-specific DNA fragments by RDA // Anim. Genet. 1998. V. 29. P. 157–158.
14. *Skinner B.M., Lachani K., Sargent C.A., Affara N.A.* Regions of XY homology in the pig X chromosome and the boundary of the pseudoautosomal region // BMC Genet. 2013. V. 14 (3). https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-3
15. *Park J., Cho Y.G., Kim J.K., Kim H.H.* STS and PUDP deletion identified by targeted panel sequencing with CNV analysis in X-linked ichthyosis // Genes (Basel). 2023. V. 14. (10). https://doi.org/10.3390/genes14101925
16. *Moghaddam S., Houshangi A.F., Eshratkhah B., Allahvirdizadeh R.* Clinical report of a Holstein's calf with ichthyosis // Vet. Res. Forum. 2021. V. 12. № 1. P. 133–135. https://doi.org/10.30466/vrf.2020.117113.2783
17. *Câmara A.C.L., Borges P.A.C., Paiva S.A., Pierezan F.* Ichthyosis fetalis in a cross-bred lamb // Vet. Dermatol. 2017. V. 28. P. 516–525. https://doi.org/10.1111/vde.12459
18. *Belknap E.B., Dunstan R.W.* Congenital ichthyosis in a llama // J. Am. Vet. Med. Assoc. 1990. V. 197(6). P. 764–767.
19. *Holmes R.S.* Vertebrate patatin-like phospholipase domain-containing protein 4 (PNPLA4) genes and proteins: A gene with a role in retinol metabolism // 3 Biotech. 2012. V. 2. P. 277–286. https://doi.org/10.1007/s13205-012-0063-7
20. *Gray K.A., Yates B., Seal R.L. et al.* Genenames.org: the HGNC resources in 2015 // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43(D1). P. D1079–D1085. https://doi.org/10.1093/nar/gku1071
21. *Dodé C., Hardelin J.P.* Kallmann syndrome // Eur. J. Hum. Genet. 2009. V. 17(2). P. 139–146. https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.206
22. *MacColl G., Bouloux P., Quinton R.* Kallmann syndrome: adhesion, afferents, and anosmia // Neuron. 2002. V. 34. № 5. P. 675–678. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00720-1
23. *Prakash S.K., Paylor R., Jenna S. et al.* Functional analysis of ARHGAP6, a novel GTPase-activating protein for RhoA // Hum. Mol. Genet. 2000. V. 9(4). P. 477–488. https://doi.org/10.1093/hmg/9.4.477
24. *Brunet T., McWalter K., Mayerhanser K. et al.* Defining the genotypic and phenotypic spectrum of X-linked MSL3-related disorder // Genet. Med. 2021. V. 23(2). P. 384–395. https://doi.org/10.1038/s41436-020-00993-y
25. Deciphering Developmental Disorders Study. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders // Nature. 2017. V. 542. P. 433–438. https://doi.org/10.1038/nature21062
26. *Lucas C.G., Spate A.M., Samuel M.S. et al.* A novel swine sex-linked marker and its application across different mammalian species // Transgenic Res. 2020. V. 29. P. 395–407. https://doi.org/10.1007/s11248-020-00204-z

27. *O'Connor E., Eisenhaber B., Dalley J. et al.* Species specific membrane anchoring of nyctalopin, a small leucine-rich repeat protein // Human Mol. Genet. 2005. V. 14(13). P. 1877–1887. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi194
28. *Huang T.N., Hsueh Y.P.* CASK point mutation regulates protein-protein interactions and NR2b promoter activity // Biochem. Biophys. Res Commun. 2009. V. 382(1). P. 219–222. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.015
29. *Najm J., Horn D., Wimplinger I. et al.* Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum // Nat. Genet. 2008. V. 40. P. 1065–1067. https://doi.org/10.1038/ng.194
30. *Atasoy D., Schoch S., Ho A. et al.* Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104(7). P. 2525–2530. https://doi.org/10.1073/pnas.0611003104
31. *Engemaier E., Römpler H., Schöneberg T., Schulz A.* Genomic and supragenomic structure of the nucleotide-like G-protein-coupled receptor GPR34 // Genomics. 2006. V. 87(2). P. 254–264. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.10.001
32. *Engel K.M., Schröck K., Teupser D. et al.* Reduced food intake and body weight in mice deficient for the G protein-coupled receptor GPR82 // PLoS One. 2011. V. 6(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029400
33. *Sallmann G.B., Bray P.J., Rogers S. et al.* Scanning the ocular albinism 1 (OA1) gene for polymorphisms in congenital nystagmus by DHPLC // Ophthalmic Genet. 2006. V. 27. P. 43–49. https://doi.org/10.1080/13816810600677834
34. *Jia X., Yuan J., Jia X. et al.* GPR143 mutations in Chinese patients with ocular albinism type 1 // Mol. Med. Rep. 2017. V. 15(5). P. 3069–3075. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6366
35. *Clapier C.R., Iwasa J., Cairns B.R., Peterson C.L.* Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2017. V. 18(7). P. 407–422. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26
36. *Picketts D., Mirzaa G., Yan K. et al.* Pathogenic variants in SMARCA1 cause an X-linked neurodevelopmental disorder modulated by NURF complex composition // Res. Sq. [Preprint]. 2023. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3317938/v1
37. *Festa B.P., Berquez M., Gassama A. et al.* OCRL deficiency impairs endolysosomal function in a humanized mouse model for Lowe syndrome and Dent disease // Hum. Mol. Genet. 2019. V. 28(12). P. 1931–1946. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy449
38. *Gianesello L., Arroyo J., Del Prete D. et al.* Genotype phenotype correlation in dent disease 2 and review of the literature: OCRL gene pleiotropism or extreme phenotypic variability of Lowe syndrome? // Genes (Basel). 2021. V. 12(10). https://doi.org/10.3390/genes12101597
39. *Tatemoto K., Hosoya M., Habata Y. et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. V. 251 (2). P. 471–476. https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9489
40. *Tatemoto K., Takayama K., Zou M.X. et al.* The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism // Regul. Pept. 2001. V. 99(2–3). P. 87–92. https://doi.org/10.1016/s0167-0115(01)00236-1
41. *Hu G., Wang Z., Zhang R. et al.* The role of apelin/apelin receptor in energy metabolism and water homeostasis: A comprehensive narrative review // Front. in Physiology. 2021. V. 12. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.632886
42. *Sörhede Winzell M., Magnusson C., Ahrén B.* The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice // Regul. Pept. 2005. V. 131(1–3). P. 12–17. https://doi.org/10.1016/j.regpep.2005.05.004
43. *Dray C., Knauf C., Daviaud D. et al.* Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice // Cell. Metab. 2008. V. 8(5). P. 437–445. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.10.003
44. *Kawamata Y., Habata Y., Fukusumi S. et al.* Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1538(2–3). P. 162–171. https://doi.org/10.1016/s0167-4889(00)00143-9
45. *Mercati F., Scocco P., Maranesi M. et al.* Apelin system detection in the reproductive apparatus of ewes grazing on semi-natural pasture // Theriogenology. 2019. V. 139. P. 156–166. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.012
46. *Rak A., Drwal E., Rame C. et al.* Expression of apelin and apelin receptor (APJ) in porcine ovarian follicles and *in vitro* effect of apelin on steroidogenesis and proliferation through APJ activation and different signaling pathways // Theriogenology. 2017. V. 96. P. 126–135. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.014
47. *Wang X., Liu X., Song Z. et al.* Emerging roles of APLN and APELA in the physiology and pathology of the female reproductive system // PeerJ. 2020. V. 8. e10245. https://doi.org/10.7717/peerj.10245
48. *Dobrzyn K., Kiezun M., Kopij G. et al.* Apelin-13 modulates the endometrial transcriptome of the domestic pig during implantation // BMC Genomics. 2024. V. 25(501). https://doi.org/10.1186/s12864-024-10417-9
49. *Duan Q.L., Nikpoor B., Dube M.P. et al.* A variant in XPNPEP2 is associated with angioedema induced by

angiotensin I-converting enzyme inhibitors // Am. J. Hum. Genet. 2005. V. 77(4). P. 617–626. https://doi.org/10.1086/496899

50. *Delmonte O.M., Bergerson J.R.E., Kawai T. et al.* SASH3 variants cause a novel form of X-linked combined immunodeficiency with immune dysregulation // Blood. 2021. V. 138(12). P. 1019–1033. https://doi.org/10.1182/blood.2020008629
51. *Maak S., Boettcher D., Tetens J. et al.* Expression of microRNAs is not related to increased expression of ZDHHC9 in hind leg muscles of splay leg piglets // Mol. Cell. Probes. 2010. V. 24(1). P. 32–37. https://doi.org/ 10.1016/j.mcp.2009.09.001
52. *Paganini L., Hadi L.A., Chetta M. et al.* A HS6ST2 gene variant associated with X-linked intellectual disability and severe myopia in two male twins // Clin. Genet. 2019. V. 95(3). P. 368–374. https://doi.org/10.1111/cge.13485
53. *Li Q.Y., Zhang Y.C., Wei C. et al.* The association between mutations in ubiquitin-specific protease 26 (USP26) and male infertility: A systematic review and meta-analysis // Asian. J. Androl. 2022. V. 24(4). P. 422–429. https://doi.org/10.4103/aja2021109
54. *Skinner B.M., Lachani K., Sargent C.A., Affara N.A.* Regions of XY homology in the pig X chromosome and the boundary of the pseudoautosomal region // BMC Genet. 2013. V. 14. https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-3
55. *Zhang G., Luo Y., Li G. et al.* DHRSX, a novel non-classical secretory protein associated with starvation induced autophagy // Int. J. Med. Sci. 2014. V. 11(9). P. 962–970. https://doi.org/10.7150/ijms.9529

Characterization of Feed Conversion by Sex Chromosomes Via Full Genome Association Study

A. A. Belous[1], *, P. I. Otradnov[1], A. A. Sermyagin[1], N. A. Zinovieva[1]

[1] *Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst*

**e-mail: belousa663@gmail.com*

The study of quantitative and qualitative traits from a genetic perspective is impossible without considering diseases or characteristics linked to sex. Currently, genomic selection based on sex chromosomes, conducted through genome-wide association studies (GWAS), has not been a key factor in developing specialized code and functional gene annotation, taking into account GO and KEGG libraries, as well as the analysis of previously identified genes. The aim of this research was to develop a software code for conducting GWAS on pig sex chromosomes and to identify functionally significant genes to explain the "phenotype-sex genetics" relationship. This will further refine the selection process for pigs in the population nucleus and enable the prediction of hereditary diseases in animals. In this article, we performed, for the first time, a GWAS analysis of genomic estimated breeding values for the feed conversion trait, focusing solely on sex chromosomes (sGWAS). Structural annotation identified 21 genes located on the X chromosome and 8 genes on the Y chromosome, including the homologous XY region. Cluster analysis of the identified genes revealed a significant association with the feed conversion ratio in eight of them: *STS, DDX3X, PUDP, PNPLA4, DHRSX, GPR143, SHROOM2*, and *PRKX*. Functional annotation of these genes highlighted their significant contribution to biological processes, including hereditary diseases and sex-linked specificity.

Keywords: sex chromosomes, sGWAS, feed conversion, structural gene annotation, functional gene annotation, Duroc boars.