

УДК 575.857; 575.17

В. Н. Кипень

младший научный сотрудник НИЛ медико-биологических исследований
научного отдела специальных исследований
E-mail: slavakipen@rambler.ru

А. О. Рябцева

младший научный сотрудник НИЛ медико-биологических исследований
научного отдела специальных исследований
E-mail: alunchic_90@mail.ru

С. А. Котова

кандидат химических наук
заведующий НИЛ медико-биологических исследований
научного отдела специальных исследований
E-mail: kotova_spc@mail.ru

И. С. Цыбовский

кандидат биологических наук
ученый секретарь
E-mail: tsybovsky@yahoo.com

НПЦ Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КАБАНА ЕВРОПЕЙСКОГО (*SUS SCROFA SCROFA*) И ЕГО ДОМАШНЕЙ РАЗНОВИДНОСТИ (*SUS SCROFA DOMESTICUS*) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

*В экспертной практике задача по дифференциации дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) от домашней свиньи (*Sus scrofa domestica*) может быть решена тремя способами: 1) анализом однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в белок-кодирующих генах, полиморфизм которых напрямую связан с фенотипом животных; 2) совокупным анализом большого количества видоспецифичных STR-локусов с математической обработкой результатов генотипирования для корректной интерпретации и отнесения особи к той или иной группе (с определенной долей вероятности) на основании Байесовского вывода и 3) анализом большого количества (более 10) SNP с использованием технологий секвенирования нового поколения (NGS), микросеквенирования (SNaPshot, ThermoFisher) или высокоплотных чипов (например, PorcineSNP60 DNA Analysis Kit, Illumina).*

Первые два способа – анализ однонуклеотидного полиморфизма или видоспецифичных STR-локусов – ввиду их относительной простоты и дешевизны, могут повсеместно использоваться при решении экспертной задачи по дифференциации дикого кабана от домашней свиньи при условии научной адаптации к региональным особен-

ностям популяций и достижения требуемого уровня точности. Одновременное использование двух схем анализа (SNP и STR-маркеры) приблизит точность дифференциации к 100%.

*Ключевые слова: дикий кабан (*Sus scrofa scrofa*), домашняя свинья (*Sus scrofa domesticus*), SNP, STR, RAPD-анализ, секвенирование, ПЦР, ПДРФ, экспертиза, ДНК-дифференциация.*

В настоящее время проблема сохранения природных ресурсов, поддержания численности отдельных видов и биоразнообразия животного мира в целом, обеспечения экологического равновесия становится все более острой. Помимо разрушения среды обитания, одним из основных факторов, приводящим к значительному сокращению, а все чаще и к исчезновению видов животных и растений, является браконьерство. Данный вид правонарушения составляет предмет судебно-следственного процесса и регулируется соответствующими правовыми нормами во всех государствах мира, поскольку кроме очевидного вреда природе незаконная охота наносит ущерб и экономике государства. В Республике Беларусь вопрос о выработке методического инструментария для экспертного сопровождения дел о незаконной охоте подразумевает разработку в первую очередь технологий ДНК-типирования диких животных, пригодных при решении рутинных экспертных задач. Объективная информация высокого доказательного уровня по фактам незаконной охоты позволит обеспечить в судебно-следственном процессе баланс интересов государства и личности и определить адекватную компенсацию ущерба, нанесенного природе и государству.

Кабан европейский (*Sus scrofa scrofa*) является наиболее распространенным объектом, в отношении которого фиксируются факты незаконной охоты на территории Республики Беларусь. С 2014 г. к незаконной охоте приравнена также транспортировка туш диких животных и/или мясопродуктов, происходящих от диких животных [1, с. 11–13]. В то же время в стране активно ведется разведение домашних свиней высококачественных пород. В отношении домашних свиней совершаются преступления имущественного характера, связанные с кражами животных или мясопродуктов. Наконец, в пищевой промышленности актуальны вопросы разработки современных и высокоточных методик проверки соответствия продукции и, как следствие, исключения мошенничества с составом и истинным происхождением мяса и продуктов его переработки (фарш, колбасы и др.).

Разработка методических подходов для молекулярно-генетической идентификации биологического материала Кабана европейского (*Sus scrofa scrofa*) и его домашнего подвида – свиньи домашней, а также дифференциации образцов, происходящих от обоих подвидов, в состоянии обеспечить оперативное проведение экспертных исследований для обеспечения потребностей правоохранительных органов в сфере природоохранных мероприятий.

Современные подходы к дифференциации подвидов кабана европейского с использованием молекулярно-генетических методов

Одна из основных причин изменения генетической структуры дикого европейского кабана – это антропогенное воздействие. Так, изменение местных генофондов могло происходить путем истребления особей в ходе неумеренной охоты или гибридизации диких животных с домашними во время свободного выпаса скота.

Даже при наличии непрерывных ареалов обитания, дикие популяции кабана редко бывают однородными и подразделяются на генетически дифференцированные субпопуляции. Nikolov I. et al. (2009) и Ferreira E. (2009) сообщили о наличии генетического структурирования в популяции кабана в Болгарии и Португалии [2; 3]. Для Болгарии установлены две основные субпопуляции: одна к северу и одна к югу от фракийской долины. Такая дифференциация севера с югом согласуется с морфометрическими данными и данными исследования аллозимных маркеров. В Португалии обнаружены три генетические субпопуляции: северная, центральная и южная. В этом случае существование топологических барьеров

(например, реки) не могло объяснить наблюдаемого раздела. В качестве причин дифференциации были указаны демографические процессы и вмешательство человека. Похожая картина была показана в недавнем исследовании популяции диких кабанов на Сардинии: идет процесс разделения на три субпопуляции, но влияния антропогенных факторов при этом не выявляется [4].

Гибридизация диких кабанов с домашней свиньей как фактор, который вносит существенные изменения в генетический состав популяции, носит спорный характер [5; 6]. Генетический вклад современной домашней свиньи в популяции евразийских диких кабанов активно обсуждается, но тесное генетическое сходство между кабаном и домашней свиньей в Европе, несомненно, существует. Это подтверждается с помощью исследований аллозимных маркеров, мтДНК, микросателлитов и Y-хромосомных последовательностей [5–7].

Для определения источника происхождения мяса (от дикого кабана либо от домашней свиньи), как правило, используют молекулярно-генетический анализ митохондриальной (мтДНК) или ядерной ДНК [8]. Использование мтДНК имеет ряд неоспоримых преимуществ: 1) многокопийность в клетке – на начальных раундах ПЦР это приводит к лучшей амплифицируемости исследуемого региона; 2) митохондриальные гены эволюционируют гораздо быстрее, чем ядерная ДНК, что приводит к большему генетическому разнообразию среди филогенетически родственных видов [9]. Среди генов, расположенных в мтДНК, наиболее часто подвергаются анализу: 1) ген цитохрома В [10; 11], 2) 12S и 16S рибосомальные субъединицы [12; 13], 3) регион D-петли [14; 15]. В то же время следует иметь в виду, что высокий уровень спонтанных изменений (мутаций, например, однонуклеотидных замен), свойственных некоторым участкам мтДНК, может быть основой дополнительных рисков совершения экспертной ошибки при анализе генетического материала конкретной особи животного.

Из числа генов, расположенных в ядерной ДНК, в основном в экспертных лабораториях анализируют: 1) ген гормона роста *GHI* [16], 2) ген актина *ACTA1* [17], 3) ген меланокортина *MC1R* [8] и 4) ген ядерного рецептора *NR6A1* [18].

подавляющее большинство приложений ПЦР в опубликованных исследованиях при идентификации мясных изделий ориентированы на домашние виды животных: крупный рогатый скот, овцы, козы, домашние свиньи, индейки и курицы [9; 19]. В значительно меньшем количестве представлены данные об использовании ПЦР-методов при определении мяса диких животных. Высокая коммерческая ценность мяса диких животных, все увеличивающееся количество вновь выявленных случаев мошенничества в мясной отрасли, а также случаи незаконной охоты являются движущей силой развития соответствующих инструментов для проверки подлинности происхождения мяса [16; 20].

Для целей различения биологических источников происхождения мяса в отношении дикого кабана и различных пород домашней свиньи были использованы различные молекулярно-генетические подходы.

Использование **ПЦР-секвенирования** гена цитохрома В, расположенного в мтДНК, было признано непригодным для дифференциации из-за высокого уровня гомологии данного региона [16]. В исследовании Karlsson A. et al. для широкого ряда видов животных был проведен анализ последовательности генов, кодирующих 12S и 16S РНК-субъединицы в мтДНК, в том числе и для *Sus scrofa* (как для домашней свиньи, так и для дикого кабана). В результате было показано, что различить дикий и домашний подвиды кабана не представляется возможным – секвенированные последовательности генов полностью совпадали [13].

На начальных этапах работ по идентификации различных видов животных методом ПЦР широко использовалась технология **RAPD** (Random Amplification of Polymorphic DNA) – полиморфизм случайно амплифицированной ДНК. На основе результатов исследований с его применением впоследствии стало возможным более точно охарактеризовать, и в определенных случаях картировать, участки генома, специфичные для того или иного вида.

В исследовании Koh M. et al. для решения задачи по дифференциации дикого кабана от домашней свиньи была использована технология RAPD на основе 29 пар 8-нуклеотидных праймеров [21]. В результате авторы пришли к заключению, что данный метод может быть использован для дифференциального разделения мяса дикого кабана от домашней свиньи. Схожие результаты были получены и группой исследователей Arslan A. et al. [22]. Однако по причине определенной технической сложности постановки эксперимента (строго контролируемые условия амплификации; качество исходной ДНК – деградированная матрица будет приводить к амплификации артефактных продуктов; необходимость большого количества параллельно исследуемых образцов при анализе смесей ДНК нескольких видов) и относительно невысоких показателях воспроизводимости результатов данный метод не нашел широкого распространения.

Использование метода ПЦР-ПДРФ в силу его относительной простоты (не требуется дорогостоящего оборудования), хорошей масштабируемости при рутинном анализе, достаточных показателей чувствительности и специфичности приобрело наиболее широкое применение при видовой идентификации животных. Попытки дифференцировать мясо дикого кабана от мяса домашней свиньи с использованием ПЦР-ПДРФ метода были предприняты как на основе анализа мтДНК [15; 23], так и для анализа генов, расположенных в ядерной ДНК [8; 17; 25].

Так, в исследовании Montiel-Sosa J. et al. анализировался регион мтДНК, известный как D-петля [15]. Было показано, что у дикого кабана в позиции 15 879 имеется делеция одного нуклеотида, в то время как у домашней свиньи этой делеции нет. В результате при обработке амплифицированного участка D-петли рестриктазой *Ava*II происходит расщепление ПЦР-продукта длиной 531 п.о. на два фрагмента (286 п. о. и 245 п. о.) в случае образцов домашней свиньи. В случае образцов дикого кабана из-за наличия делеции сайт рестрикции для *Ava*II исчезает – на электрофореграмме наблюдается единичный продукт размером 531 п. о.

В работе Pascoal A. et al. была проанализирована возможность использования участка гена цитохрома b в мтДНК с целью дифференциации дикого кабана от домашней свиньи [23].

В исследовании было задействовано 4 эндонуклеазы рестрикции: *P*alI, *M*boI, *H*infI и *A*luI. Авторами было показано, что различие в электрофоретическом профиле дикого кабана и домашней свиньи наблюдается только для рестриктазы *H*infI: в случае дикого кабана ампликон в 359 п. о. разрезался на два фрагмента – 198 п. о. и 161 п. о. В случае с образцами домашней свиньи рестрикции не было. Однако коллективом авторов Wolf C. et al. данные результаты были уточнены – на других образцах дикого кабана и домашней свиньи использование рестриктазы *H*infI не давало никаких различий [26].

В результате был сделан вывод о невозможности дифференцировать дикого кабана от домашней свиньи с помощью анализа последовательности гена цитохрома b при применении метода ПЦР-ПДРФ.

Fajardo V. et al. анализировали последовательность гена MC1R (ядерная ДНК), ответственного за пигментную окраску кожи и шерсти у дикого кабана и домашней свиньи, а также регион D-петли мтДНК [8]. Перед авторами стояла задача дифференцировать образцы дикого кабана от домашней свиньи. Для этих групп животных в нуклеотидной последовательности D-петли не было выявлено различий. В то же время, ПЦР-ПДРФ анализ последовательности гена MC1R с использованием рестриктаз *B*stUI и *B*spHI показал наличие дифференциально значимых различий. В ходе исследований авторам удалось решить несколько задач: отличить мясо дикого кабана от мяса домашней свиньи; выделить 2 типа домашней свиньи – тип А и тип В; а также дифференцировать гибридных особей, образующихся при скрещивании дикого кабана и домашней свиньи. Авторами были проанализированы последовательности гена MC1R у 45 диких кабанов и 45 домашних свиных разных пород. В 73% (33/45) случаев домашние свиньи были отнесены либо к типу А, либо к типу В. Количество гибридных по данному признаку особей у домашних животных (в результате скрещивания

свиней типа А и типа В) составило 12 особей (или 27%). Среди диких кабанов у 89% (40/45) особей было установлено наличие аллеля дикого типа (Е), выявлено 5 гибридных особей (или 11%), при этом все гибриды дикого кабана происходили от скрещивания с домашней свиньей типа А.

В исследовании Babicz M. et al. также анализировалась последовательность гена *MC1R* у диких кабанов и домашних свиней [24]. Авторами было показано, что среди диких кабанов процент гибридных особей составил 30% (3/10). Среди всех представителей домашних пород (Pulawska, Zlonnicka White, Zlotnichka Spotted) был отмечен генотип АА по сайту с.367G > А, т. е. все образцы относились к типу А.

В 2014 г. коллективом авторов Fontanesi L. et al. было продемонстрировано, что для целей скринингового анализа продуктов питания, приготовленных с использованием мяса дикого кабана, одного гена – *MC1R*, – оказывается недостаточно по причине большого количества гибридных особей в популяции и высокой вероятности принятия мяса гибридной особи за мясо истинно дикого кабана [18]. Авторами была предложена схема анализа, включающая, помимо анализа трех сайтов в гене *MC1R* (с.367G > А, с.727G > А и с.729G > А), еще один сайт g.299084751C > Т в гене *NR6A1*.

Результаты свидетельствуют о том, что процент гибридных особей среди популяций дикого кабана может существенно варьировать: в рамках исследования Fontanesi L. et al. для региона юго-восточной Европы (Словения и Западные Балканы) было найдено 25,6% (23/90) гибридов; для Северной Италии (центральная область южной Европы) – 17,1% (19/111) гибридных особей. В среднем процент гибридов для диких кабанов по гену *MC1R* составил 20,9% (42/201).

Анализ полиморфного сайта g.299084751C>Т в гене *NR6A1* также не дает однозначного ответа на вопрос, происходит ли мясо от дикого кабана или от домашней свиньи – авторами Fontanesi L. et al. также были найдены гибридные особи среди дикого кабана. Для региона юго-восточной Европы (Словения и Западные Балканы) найдено 12,2% (11/89) гибридов; для Северной Италии (центральная область южной Европы) – 3,6% (4/111) гибридных особей. В среднем процент гибридов у исследованных диких кабанов по гену *NR6A1* составил 7,5% (15/201).

Одновременно в данной работе установлено, что для 100% биологических образцов, взятых у домашних свиней (вне зависимости от породы), по сайту g.299084751C>Т выявлен генотип ТТ. Среди образцов дикого кабана данный генотип был отмечен в 0,5% (1/201) случаев, гетерозиготное носительство отмечено для 7,0% (14/201) случаев. В сумме аллель Т в выборке образцов дикого кабана встречается в 3,4% случаев. Частота распространенности данного аллеля также имеет географически выраженную особенность: для региона юго-восточной Европы (Словения и Западные Балканы) наличие аллели Т наблюдается в 7 раз чаще, чем для региона Северной Италии (центральная область южной Европы).

Совместный анализ этих четырех полиморфных сайтов в генах *MC1R* и *NR6A1*, по мнению Fontanesi L. et al., позволяет в 98,4% случаев правильно дифференцировать мясо дикого кабана от домашней свиньи или их гибридов.

В исследовании Conyers C. et al. (2012) было предложено использовать STR-маркеры для решения задачи по дифференциации мяса дикого кабана от домашней свиньи [25], причем точность дифференциации в данной работе составила 100%. Однако необходимо отметить, что в силу природных особенностей STR-маркеров STR-профили для представителей *Sus scrofa* могут различаться в зависимости от географической локализации. По этой причине использование одной и той же панели STR-маркеров для исследования кабанов из различных регионов может давать итоговые значения показателей специфичности и чувствительности меньше 100%. Экспертному использованию STR-маркеров для целей дифференциации дикого кабана от домашней свиньи должны предшествовать научные исследования популяционной и генетической структуры вида *Sus scrofa* на целевой территории (например, в пределах Республики Беларусь).

За последние несколько лет в научных журналах было опубликовано более 100 работ, посвященных поиску и использованию видо- и породоспецифичных SNP для вида *Sus scrofa*, реализованных на основе **чиповых технологий** – PorcineSNP60 (Illumina). Среди основных работ, результаты которых могут иметь практическое значение для задач криминалистики в контексте дел по браконьерству, необходимо отметить следующие – [27–28].

Данные технологии по причине их высокой стоимости вряд ли найдут широкое распространение при решении рутинных экспертных задач. В то же время, анализ большого количества генетических маркеров (в основном SNP и STR), несомненно, позволяет решать ряд более узких, но, тем не менее, очень важных вопросов относительно популяционной принадлежности особи (географическое происхождение), а также «чистоты» генотипа анализируемой особи. Последнее важно с точки зрения сохранения генетического разнообразия: истинно дикие кабаны (не «гибриды» в широком смысле слова) имеют несравненно более высокий биологический потенциал и извлечение этих особей из их естественной среды обитания скажется значительно негативнее на сохранении популяционной структуры и разнообразия в отдаленной перспективе.

Таким образом, на данный момент в экспертной практике задача по дифференциации дикого кабана от домашней свиньи может быть решена тремя способами: 1) анализом однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в белок-кодирующих генах, полиморфизм которых напрямую связан с фенотипом животных – *MC1R* и *NR6A1*; 2) совокупным анализом большого количества видоспецифичных STR-локусов с математической обработкой результатов генотипирования для корректной интерпретации и отнесения особи к той или иной группе (с определенной долей вероятности) на основании Байесовского вывода и 3) анализом большого количества (более 10) SNP с использованием технологий секвенирования нового поколения (NGS), микросеквенирования (SNaPshot, ThermoFisher) или высокоплотных чипов (например, PorcineSNP60 DNA Analysis Kit, Illumina).

Первые два способа, анализ однонуклеотидного полиморфизма или видоспецифичных STR-локусов, ввиду их относительной простоты и дешевизны, могут повсеместно использоваться при решении экспертной задачи по дифференциации дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) от домашней свиньи (*Sus scrofa domesticus*) при условии научной адаптации к региональным особенностям популяций и доведении точности до требуемого уровня. Одновременное использование двух схем анализа (SNP и STR-маркеры) приблизит точность дифференциации к 100%.

Развитие и широкое распространение методов биоинформатики (анализ полногеномных данных NGS-проектов, множественное выравнивание SRA-Blast, специфический «коллинг») позволяют ожидать появления ранее неизвестных видо- и породоспецифичных генетических маркеров, применение которых в экспертной практике будет способствовать увеличению достоверности вывода.

Список использованных источников

1. Экспертное сопровождение расследования фактов незаконной охоты и подготовка материалов для производства экспертиз : метод. рекомендации для следователей, судей и экспертов / И. Г. Дода [и др.]; НПЦ Гос. ком. судеб. экспертиз Респ. Беларусь. – Минск : Право и экономика, 2015. – 107 с.
2. Nikolov, I. S. Population genetic structure of wild boar *Sus scrofa* in Bulgaria as revealed by microsatellite analysis / I. S. Nikolov // Acta Theriologica. – 2009. – Vol. 54. – P. 193–205.
3. Ferreira, E. Genetic structure of the wild boar population in Portugal : evidence of a recent bottleneck / E. Ferreira // Mammalian Biology. – 2009. – Vol. 74. – P. 274–285.
4. Scandura, M. Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar : are the effects of the last glaciation still detectable? / M. Scandura // Molecular Ecology. – 2008. – Vol. 17. – P. 1745–1762.

5. Larson, G. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe / G. Larson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104. – P. 15 276–15 281.
6. Luetkemeier, E. S. Multiple Asian pig origins revealed through genomic analyses / E. S. Luetkemeier // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2010. – Vol. 54. – P. 680–686.
7. Ramirez, O. Integrating Y-chromosome, mitochondrial and autosomal data to analyse the origin of pig breeds / O. Ramirez // *Molecular Biology Evolution*. – 2009. – Vol. 26. – P. 2061–2072.
8. Fajardo, V. Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes / V. Fajardo // *Meat Sci*. – 2008. – P. 314–322.
9. Girish, P. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene / P. Girish // *Meat Science*. – 2005. – P. 107–112.
10. Maede, D. A strategy for molecular species detection in meat and meat products by PCR-RFLP and DNA sequencing using mitochondrial and chromosomal genetic sequences / D. Maede // *European and Food Research Technology*. – 2006. – P. 209–217.
11. Pfeiffer, I. Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR-RFLP / I. Pfeiffer // *Genetics*. – 2004. – P. 30–35.
12. Girish, P. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene : a simple method for identification of poultry meat species / P. Girish // *Veterinary Research Communications*. – 2007. – P. 447–455.
13. Karlsson, A. Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing / A. Karlsson // *Forensic Science International*. – 2007. – P. 16–20.
14. Krkoska, L. Using the PCR-RFLP method / L. Krkoska // *Fleischwirtschaft International*. – 2003. – P. 39–42.
15. Montiel-Sosa, J. Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA / J. Montiel-Sosa // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2000. – P. 2829–2832.
16. Brodmann, P. Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search / P. Brodmann // *European Food Research Technology*. – 2001. – P. 491–496.
17. Hopwood, A. An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures / A. Hopwood // *Meat Science*. – 1999. – P. 227–231.
18. Fontanesi, L. Differentiation of meat from European wild boars and domestic pigs using polymorphisms in the MC1R and NR6A1 genes / L. Fontanesi // *Meat Sci*. – 2014. – P. 781–784.
19. Stirtzel, S. Authentication of the most common poultry species by means of PCR / S. Stirtzel // *Fleischwirtschaft*. – 2007. – P. 86–89.
20. La Neve, F. Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis / F. La Neve // *Meat Sci*. – 2008. – P. 216–224.
21. Koh, M. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species / M. Koh // *Meat Science*. – 1998. – P. 275–285.
22. Arslan, A. Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique / A. Arslan // *Journal of Muscle Foods*. – 2005. – P. 37–45.
23. Pascoal, A. Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis / A. Pascoal // *European Food Research and Technology*. – 2004. – P. 306–312.
24. Babicz, M. Variability in the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene in wild boars and local pig breeds in Poland / M. Babicz // *Anim Genet*. – 2013. – P. 357–358.
25. Conyers, C. Development of a microsatellite-based method for the differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) from domestic pig breeds (*Sus scrofa domestica*) in food / C. Conyers // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2012. – P. 3341–3347.
26. Wolf, C. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification / C. Wolf, J. Rentsch, P. Hubner // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999; 47(4): 1350-5.

27. Ramos, A. M. Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing / A. M. Ramos // *Anim Genet.* – 2011. – P. 613–620.

28. Ramos, A. M. Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology / A. M. Ramos // *PLoS One.* – 2009. – e6524. – P. 1–13.

Дата поступления: 16.11.2016

V. N. Kipen

junior researcher of the RL of the biomedical research
of the scientific department of special investigations

A. O. Rabtsava

junior researcher of the RL of the biomedical research
of the scientific department of special investigations

S. A. Kotova

candidate of chemical sciences
head of the RL of the biomedical research
of the scientific department of special investigations

I. S. Tsybovsky

candidate of biological sciences
scientific secretary

SPC of the State forensic examination committee of the Republic of Belarus

**MODERN APPROACHES TO THE DIFFERENTIATION OF EUROPEAN
WILD BOAR (*SUS SCROFA SCROFA*) AND DOMESTIC PIG (*SUS SCROFA DOMESTICUS*)
USING MOLECULAR GENETIC METHODS**

*In expert practice, the task of differentiation of wild boar (*Sus scrofa scrofa*) from domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) can be solved in three ways: 1) analysis of single nucleotide polymorphism (SNP) in protein-encoding genes, polymorphism of which is directly linked to the phenotype of animals; 2) aggregate analysis of a large number of species-specific STR-loci with a mathematical processing of the results of genotyping for correct interpretation and assignment of individuals to one group or another (with a certain probability) on the basis of Bayesian inference, and 3) analysis of a large number (more than 10) SNP with technologies new-generation sequencing (NGS), micro-sequencing (SNaPshot, ThermoFisher) or high-density chips (e. g., PorcineSNP60 DNA Analysis Kit, Illumina).*

The first two methods – analysis of single nucleotide polymorphism or species-specific STR-loci, due to their relative simplicity and low cost, can widely be used in solving expert tasks for differentiation of wild boar from domestic swine, provided the scientific adaptation to regional characteristics of populations and bringing precision to the desired level. Simultaneous use of two analysis circuits (SNP and STR-markers) will bring the accuracy of differentiation to 100%.

*Keywords: wild boar (*Sus scrofa scrofa*), domestic pig (*Sus scrofa domesticus*), SNP, STR, RAPD-analysis, sequencing, PCR, RFLP, expert examination, DNA-differentiation.*