

УДК 636.52/.58:636.082

*А.В. ШЕЛЬОВ*, кандидат сільськогосподарських наук,  
*Н.П. ПОНОМАРЕНКО*, доктор сільськогосподарських наук,  
*В.П. БОРОДАЙ*, доктор сільськогосподарських наук,  
*В.В. МЕЛЬНИК*, кандидат сільськогосподарських наук,  
*В.Г. СПИРИДОНОВ*, доктор сільськогосподарських наук,  
*С.Д. МЕЛЬНИЧУК*, доктор біологічних наук  
Національний університет біоресурсів і природокористування України

# Використання мікросателітних маркерів ДНК для контролю походження та однорідності популяцій сільськогосподарської птиці

**Робота присвячена визначенню доцільності використання молекулярно-генетичних методів досліджень для контролю походження популяцій. Встановлено, що використання цих методів, зокрема, мікросателітних локусів ДНК, має високу ефективність як для визначення достовірності походження та індивідуальної ідентифікації особин, так і для контролю однорідності популяцій птиці.**

*Птиця, ДНК-маркери, генотипування, контроль походження та однорідності популяцій*

Нині на ринку племінного птахівництва склалася доволі складна ситуація в нашій країні та у світі загалом. Основну частку ринку племінної продукції контролює вельми обмежена кількість селекційних компаній. Лише вони є власниками чистих ліній та батьківських форм сільськогосподарської птиці різних видів. У вітчизняних птахівничих підприємствах утримують птицю фінальних гібридів кросів, а племінні господарства працюють з батьківськими стадами, які необхідно щорічно оновлювати. За таких умов іноді виникають досить суперечливі ситуації, коли при інкубації яєць однієї партії отримують молодняк, який за своїми фенотиповими ознаками, а отже і генетично, є неоднорідний. За існуючої ситуації розробка і впровадження в практику роботи птахівничих підприємств ефективних методів контролю походження та однорідності популяцій є надзвичайно актуальним питанням.

У цьому зв'язку використання маркерних ознак (у першу чергу, ДНК-поліморфізму) має важливе значення, оскільки надає можливість провести ідентифікацію генотипів, оцінку генетичного різноманіття, виявлення інтрогресії чужорідного матеріалу, визначен-

ня рівня гібридності тощо [1,2]. Оцінка генетичного різноманіття за допомогою ДНК-маркерів надає надійну інформацію для вивчення взаємовідносин між популяціями курей та є основою для ідентифікації особин, а також диференціації існуючих і створюваних популяцій [3]. Отже, на сьогодні актуальними є дослідження ДНК-поліморфізму, які спрямовані на вивчення та проведення аналізу процесів, що відбуваються в процесі відтворення птиці. Вони є надзвичайно важливими при визначенні перспектив використання конкретної популяції та виборі шляхів і методів подальшої роботи з нею.

**Метою** нашої роботи було визначити ефективність використання молекулярно-генетичних методів досліджень шляхом типування за мікросателітними локусами ДНК чотирьох популяцій птиці різного ступеня спорідненості при оцінці та контролі походження та однорідності популяцій птиці. За результатами генетичної ідентифікації особин розраховували частоти виявлених алелів, індекси їхньої гетерозиготності (Hobs, Hexp), поліморфізму (polymorphic information contents, PIC), а також вірогідність виключення випадкового збігу алелів (probabi-

lity of exclusion, PE). На прикладі груп птиці з різним ступенем спорідненості показали практичне застосування та рівень інформативності мікросателітних ДНК-маркерів для контролю походження та однорідності популяцій.

**Матеріал і методи досліджень.** Дослідження проведено на базі відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України, яку атестовано як підприємство (лабораторію) генетичного контролю.

Для дослідження використовували пир'я 80 голів птиці, яка належала до чотирьох груп: півники та курочки кросу „Хайсекс коричневий” – батьківські стада кросу, популяція фінального гібриду кросу “Хайсекс коричневий”, до якої належать потомки досліджених батьківських форм (фінальний гібрид 1) та популяція фінального гібриду кросу “Хайсекс коричневий”, особини якої не є їхніми потомками, тобто не споріднені з іншими досліджуваними популяціями (фінальний гібрид 2)

Геному ДНК було ізольовано з пульпи пера птиці із використанням наборів “ДНК-сорб” (Амплі-сенс, Росія) згідно інструкцій

**1. Частоти ідентифікованих алелів у курей різних популяцій кросу “Хайсекс коричневий”**

Назва маркера	Кількість алелів	Алельні варіанти, п. н. (частоти)							
<b>Півники (батьківське стадо)</b>									
ADL 0268	4	108 (0,425)	110 (0,325)	112 (0,125)	114 (0,125)	–	–	–	–
MCW 0216	7	135 (0,075)	137 (0,200)	139 (0,250)	141 (0,175)	143 (0,150)	145 (0,050)	147 (0,100)	–
LEI 0094	7	245 (0,225)	247 (0,175)	249 (0,200)	259 (0,050)	261 (0,025)	263 (0,175)	265 (0,150)	–
MCW 0248	6	213 (0,200)	215 (0,175)	217 (0,125)	219 (0,150)	221 (0,275)	223 (0,075)	–	–
ADL 0278	7	108 (0,150)	110 (0,150)	112 (0,050)	116 (0,175)	118 (0,175)	120 (0,200)	122 (0,100)	–
<b>Курочки (батьківське стадо)</b>									
ADL 0268	4	108 (0,475)	110 (0,289)	112 (0,105)	114 (0,131)	–	–	–	–
MCW 216	7	135 (0,075)	137 (0,175)	139 (0,200)	141 (0,125)	143 (0,150)	145 (0,150)	147 (0,125)	–
LEI 0094	8	245 (0,175)	247 (0,200)	249 (0,225)	257(0,025)	259 (0,100)	261 (0,075)	263 (0,100)	265 (0,100)
MCW 0248	5	213 (0,300)	215 (0,200)	217 (0,125)	219 (0,125)	221 (0,250)	–	–	–
ADL 0278	7	108 (0,250)	110 (0,075)	112 (0,100)	116 (0,175)	118 (0,100)	120 (0,150)	122 (0,150)	–
<b>Курочки – фінальний гібрид 1</b>									
ADL0268	4	108 (0,350)	110 (0,275)	112 (0,150)	114 (0,225)	–	–	–	–
MCW 0216	6	135 (0,125)	137 (0,175)	139 (0,300)	141 (0,250)	143 (0,100)	145 (0,050)	–	–
LEI 0094	7	245(0,200)	247 (0,175)	249 (0,175)	259 (0,100)	261 (0,125)	263 (0,075)	265 (0,150)	–
MCW 0248	6	213 (0,175)	215 (0,175)	217 (0,150)	219 (0,150)	221 (0,275)	223 (0,075)	–	–
ADL 0278	7	108 (0,120)	110 (0,075)	112 (0,200)	116 (0,220)	118 (0,150)	120 (0,075)	122 (0,150)	–
<b>Курочки – фінальний гібрид 2</b>									
ADL0268	5	108 (0,309)	110 (0,214)	112 (0,262)	114 (0,167)	118 (0,048)	–	–	–
MCW 0216	7	135 (0,095)	137 (0,190)	139 (0,214)	141 (0,214)	143 (0,143)	145 (0,072)	147 (0,072)	–
LEI 0094	10	245 (0,214)	247 (0,190)	251 (0,072)	253 (0,024)	257 (0,072)	259 (0,144)	261 (0,048)	263 (0,190)
		265 (0,023)	281 (0,023)	–	–	–	–	–	–
MCW 0248	5	213 (0,167)	215 (0,167)	217 (0,143)	219 (0,238)	221 (0,285)	–	–	–
ADL 0278	7	108 (0,214)	110 (0,095)	112 (0,119)	116 (0,143)	118 (0,166)	120 (0,143)	122 (0,119)	–

виробника.

П'ять мікросателітних локусів (ADL0268, MCW0216, LEI0094, ADL0278, MCW0248) було відібрано за результатами літературних даних [4, 5] та згідно рекомендацій Міжнародного товариства генетики тварин (ISAG). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) застосовували для ампліфікації мікросателітних маркерів птиці за стандартних умов.

Продукти ПЛР денатурували формамідом (Sigma, США) та розділяли методом капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі “ABI Prizm 3130” Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США). Визначення розмірів алелів здійснювали за допомогою програмного забезпечення “Gene Mapper 3.7” (Applied Biosystem, США) із використанням стандарту “Genescan-ROX 500” (Applied

Biosystem, США). Кількість та частоти ідентифікованих алелів оцінювали за допомогою безпосереднього підрахунку та аналізу одержаних генотипів, індекси гетерозиготності (Hobs, Нехр), поліморфізму (PIC) та вірогідність виключення випадкового збігу алелів (PE) було визначено за допомогою програмного забезпечення Cervus 3.0.3 [6] та PowerStatsV12 (Promega, США).



**Результати досліджень.** У результаті проведеної нами генетичної ідентифікації дослідженого поголів'я було одержано дані, які наведені в табл. 1.

У результаті аналізу одержаних даних нами було виявлено, що популяція фінального гібриду 1 кросу "Хайсекс коричневий", до якої належать потомки досліджених батьківських форм, за всіма алелями зберігає структуру батьківських популяцій. У переважній більшості випадків, навіть, зберігаються тенденції щодо частот з якими в популяціях зустрічаються ті або інші алельні варіанти. Що ж стосується фінального гібриду 2, одержаного від інших батьків, то в цій популяції зустрічаються алелі, які відсутні у інших досліджуваних групах. Так, наприклад, лише в цій групі представлений алельний варіант розміром 118 п.н. (0,048) за локусом ADL0268, а також алелі 251 (0,072), 253 (0,024), 257 (0,072) та 281 п.н. (0,023) за локусом LEI0094. Водночас у даній популяції відсутні алельні варіанти 249 п.н. за локусом LEI0094 та 223 п.н. за локусом MCW0278, які присутні в усіх інших досліджених групах птиці.

Розраховані параметри гетерозиготності (табл. 2) свідчать про те, що досліджувані популяції птиці батьківського і промислових стад, загалом, виявляють тенден-

цію до гомозиготизації (фактична гетерозиготність є меншою за очікувану). Розраховані індекси поліморфізму (PIC) свідчать про те, що загалом досліджувані вибірки характеризуються досить високим рівнем поліморфізму, який в середньому по популяції становить, відповідно, 0,766 та 0,763 для півнів і курей батьківського стада й 0,773 та 0,788 – для птиці фінального гібриду 1-ї та 2-ї груп.

Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелів (CPE) для півнів батьківського стада дорівнювала 1,000, або 100%, для курочок – 0,9811, або 98,11%, для птиці фінального гібриду 0,9903, або 99,03 – для птиці 1-ї групи та 0,9880, або 98,80 % для 2-ї, що є підтвердженням високої достовірності одержаних даних.

### Висновки

Наведені факти підтверджують факт різного походження досліджуваних фінальних гібридів і доводять високу інформативність та доцільність застосування мікросателітних локусів ДНК в якості інформативних генетичних маркерів у популяційно-генетичних дослідженнях та при селекційній роботі з кросами птиці.

Отримані дані свідчать про те, що типкування популяцій птиці за мікросателітними локусами ДНК є

високоінформативним методом контролю походження та однорідності популяцій.

**Работа посвящена определению целесообразности использования молекулярно-генетических методов исследования для контроля происхождения популяций. Установлено, что использование таких методов, в частности, микросателлитных локусов ДНК, имеет высокую эффективность как для определения достоверности происхождения и индивидуальной идентификации особей, так и для контроля однородности популяций птицы.**

*Птица, ДНК-маркеры, генотипирование, контроль происхождения и однородности популяций.*

**The work is devoted to definition of expediency of use of molecular-genetic methods of researches for the control of an origin of populations. Is established, that use of such methods, in particular, microsatellite loci of DNA, has high efficiency as for definition of reliability of an origin and individual identification, and for the control of uniformity of bird populations.**

*Bird, DNA-markers, genotyping, control of origin and uniformity of populations.*

2. Гетерозиготність, індекс поліморфізму та вірогідність виключення випадкового збігу алелів мікросателітних маркерів курей кросу "Хайсекс коричневий"

Назва маркера	Кількість алелів	Hobs	Hexp	PIС	PE
<b>Півники (батьківське стадо)</b>					
ADL 0268	4	0,600	0,700	0,626	0,291
MCW 0216	7	1,000	0,847	0,803	1,000
LEI 0094	7	0,800	0,844	0,798	0,637
MCW 0248	6	0,550	0,831	0,783	0,188
ADL 0278	7	0,800	0,863	0,821	0,599
Середнє	6,2	0,750	0,817	0,7662	0,543
<b>CPE</b>					1,000
<b>Курочки (батьківське стадо)</b>					
ADL 0268	4	0,684	0,681	0,608	0,428
MCW 0216	7	0,900	0,869	0,828	0,795
LEI 0094	8	0,700	0,864	0,823	0,637
MCW 0248	5	0,550	0,796	0,740	0,223
ADL 0278	7	0,700	0,858	0,816	0,428
Середнє	6,2	0,7068	0,8136	0,763	0,502
<b>CPE</b>					0,9811
<b>Курочки – фінальний гібрид 1</b>					
ADL 0268	4	0,700	0,747	0,679	0,428
MCW 0216	6	0,950	0,809	0,757	0,898
LEI 0094	7	0,700	0,867	0,825	0,637
MCW 0248	6	0,600	0,833	0,786	0,291
ADL 0278	7	0,650	0,859	0,817	0,355
Середнє	6	0,72	0,823	0,773	0,522
<b>CPE</b>					0,9903
<b>Курочки – фінальний гібрид 2</b>					
ADL 0268	5	0,381	0,778	0,719	0,103
MCW 0216	7	0,952	0,852	0,810	0,903
LEI 0094	10	0,810	0,868	0,829	0,637
MCW 0248	5	0,571	0,805	0,752	0,310
ADL 0278	7	0,714	0,869	0,829	0,451
Середнє	6,8	0,686	0,834	0,788	0,4808
<b>CPE</b>					0,9880

**Література**

1. Шельов А.В. Молекулярно-генетичний аналіз популяцій курей кросу „Хайсекс білий” / А.В.Шельов, В.Г.Спиридонов, Н.П.Пономаренко, В.П.Бородай, В.В.Мельник, С.Д.Мельничук // Наукові доповіді НУБіП. – 2011-4 (26) – [http://www.nbu.gov.ua/e%2Djournals/Nd/2011\\_4/11sav.pdf](http://www.nbu.gov.ua/e%2Djournals/Nd/2011_4/11sav.pdf)

2. Tadano R. Assessing genetic diversity and population structure for commercial chicken lines based on forty microsatellite analyses / R. Tadano, M. Nishibori, N. Nagasaka, M. Tsudzuki // Poultry Science. – 2007. – Vol. 86, №11. – P.2309-2314.

3. Подстрешний А.П. Перспективы использования молекулярно-генетических маркеров в птицеводстве / А.П.Подстрешний // Обзор статей по материалам XXII Всемирного Конгресса по птицеводству. – Харків: ТОВ „НТМТ”, 2005. – С.27-34.

4. Chatterjee R.N. Variability of microsatellites and their association with egg production traits in chicken / R.N.Chatterjee, R.P.Sharma, A.Mishra, M.Dange, T.K.Bhattacharya // International Journal of Poultry Science. – 2008. – №7 (1). – P. 77-80.

5. Van Marle-Koster E. Genetic characterization of native southern African chicken populations: evaluation and selection of polymorphic microsatellite markers / E. van Marle-Koster, L.H. Nel // South African Journal of Animal Science. – 2000. – №30 (1). – <http://www.sasas.co.za/sites/sasas.co.za/files/vanmarlea30issue1.pdf>.

6. Marshall T.C. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations / T.C.Marshall, I.Slate, L.Kruuk, I.M.Pemberton // Molecular ecology. – 1998. – №7. – P. 639-655.