

УДК: 636.592.082

Ю.В. ЛЯШЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Державної дослідної станції птахівництва НААН

Оцінка рівня генетичної мінливості у вітчизняних породних групах сірих та глинястих качок з використанням RAPD-маркерів

Виявлений високий рівень поліморфізму RAPD-маркерів у вітчизняних популяціях сірих і глинястих качок, який в середньому становив 94%. Встановлена ефективність використання праймерів OPA-01, OPA-12, OPA-18, OPC-07, OPC-20 для аналізу генетичної мінливості качок на внутрішньопородному рівні. Пропонується застосовувати RAPD-маркери для контролю стану біологічного різноманіття локальних генофондних стад, а також у селекційно-племенній роботі для керування рівнем інбридингу при відтворенні нечисленних популяцій качок.

Качки, породні групи, RAPD-маркери, генетична мінливість, полімеразна ланцюгова реакція

Кількість видів тварин і рослин на землі продовжує скорочуватися. За підрахунками вчених число вимерлих видів за всю історію існування нашої планети в 5-9 разів перевищує нині існуючі [8]. Подібна тенденція спостерігається також зі свійськими тваринами. Проблема збереження й раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин актуальна і для такої стратегічної галузі як птахівництво [3]. Особливо гострою вона є для країн, що розвиваються, або мають перехідну економіку. Експансія імпортованих комерційних кросів, використання обмеженої кількості високопродуктивних спеціалізованих порід у виробництві, а також недостатнє фінансування для підтримки власних генетичних ресурсів птиці призводить до різкого скорочення й безповоротної втрати аборигенних форм. Так, наприклад, колекція Інституту птахівництва НААН (нині Державна дослідна станція птахівництва НААН) вже не нараховує таких рідкісних порід та популяцій курей як юрловські голосисті, італійські куріпчасті, українські вушанки, голошияна, падуан, міні-смуґасті, міні м'ясо-яєчні. Серед порід водоплавної птиці, до яких відносяться і качки, на сьогоднішній день збережені колекційні породні групи – білі, глинясті, сірі та чорні білогруді у вигляді відносно малочисельних локальних популяцій.

У системі збереження генофонду сільськогосподарських тварин однією з поширених організаційних форм є генофондне стадо [6], головне призначення якого є збереження генетичних ресурсів на основі чистопородного розведення. При цьому важливе значення відіграє використання спеціальних схем добору і підбору, спрямованих на зменшення негативних наслідків обмеженої кількості племінного матеріалу. Серед генофондних об'єктів птахівництва качки представлені чотирма вітчизняними породними групами (білі, глинясті, сірі, чорні білогруді) [2]. Основне стадо качок до недавнього часу утримувались безпосередньо на експериментальній базі Інституту птахівництва (птахогосподарство Бірки). На теперішній час качок даних породних груп розводять декілька приват-

них господарств України. Враховуючи зазначене, питання збереження біологічного різноманіття вітчизняних порід качок, представлених декількома локальними стадами, стоїть гостро, а тому потребує залучення комплексу доступних методів *in situ* та *ex situ*.

Окрім традиційних заходів, спрямованих на збереження біологічного різноманіття тварин (селекційно-генетичний моніторинг), останнім часом набули популярності молекулярно-генетичні методи, які дають безпосереднє уявлення про генетичну мінливість [1]. Існує широкий набір сучасних технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК, проте не для кожного організму вони можуть бути використані в повній мірі. Мова йде про рівень дослідженості геному. Серед сільськогосподарської птиці у 2004 р. першою була розшифрована нуклеотидна послідовність геному курки (*G. gallus*). У результаті цього в арсеналі дослідників з'явилась інформація про локалізацію і поліморфізм основних генів кількісних ознак (QTL), яку можна використовувати для маркер-асоційованої селекції (MAS) [4,5]. Прикладом застосування ДНК-технологій для оцінки генетичної мінливості курей є рекомендації Міжнародної продовольчої організації ООН (FAO) з використання мікросателітних маркерів (SSR) [12]. Для інших видів сільськогосподарської птиці повне секвенування геному завершилось декілька років тому: індичка *Meleagris gallopavo* (2010), гуска *Anser cygnoides* (2012), качка *Anas platyrhynchos* (2013).

Приймаючи до уваги маловивченість водоплавної сільськогосподарської птиці, для дослідження генетичної різноманітності вітчизняних породних груп качок був застосований метод випадкової ампліфікації поліморфної ДНК – RAPD-аналіз (Random Amplified Polymorphic DNA). Незважаючи на певні недоліки, він залишається найбільш швидким і рентабельним методом оцінки генетичної розмаїтості на основі поліморфізму анонімних молекулярно-генетичних маркерів, які можуть надавати непряму інформацію про функціональні гени важливих ознак [5]. Показано, що RAPD-маркери є достатньо інформативними

при дослідженні міжпородної та міжлінійної диференціації водоплавної птиці, зокрема качок [7,10,11].

Метою роботи було дослідження генетичної мінливості в популяціях качок двох породних груп (сірі, глинясті) з використанням п'яти RAPD-праймерів. У результаті роботи передбачалося отримати інформацію про генетико-популяційну структуру на основі RAPD-маркерів, яку можна буде використати для об'єктивної оцінки стану досліджуваних об'єктів, ефективності задіяних методів селекційно-племінної роботи.

Матеріал і методи досліджень. Об'єктом дослідження були качки двох породних груп (сірі та глинясті), які утримуються у приватному агропромисловому підприємстві «Добробут» Тернопільської області. Для генотипування особин використовували пір'я від 25 особин кожної популяції. Виділення ДНК проводили за допомогою комерційного набору «Сорб-В» («Амплиценс», Росія). Ефективність виділення ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 0,7–1% агарозному гелі за напруги 200 В протягом 5 хв. (фарбування бромистим етидієм).

Для проведення ПЛР використовували 5 довільних декануклеотидних праймерів ОРА-01, ОРА-12, ОРА-18, ОРС-07, ОРС-20 (розроблені «Operon Technologies Inc.», США).

Ампліфікацію ДНК проводили з використанням програмованого термоциклера «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). ПЛР проводили в наступному режимі: початкова денатурація – 3 хв. при 94°C, наступних 45 циклів з такими параметрами: денатурація – 1 хв. при 94°C, відпал праймера – 1 хв. при 32°C, елонгація – 2 хв. при 72°C; кінцева елонгація – 5 хв. при 72°C.

ПЛР-ампліфікацію геномної ДНК проводили в реакційній суміші об'ємом 20 мкл, яка включала: 2мкл 1хбуферу («Сибензим», Росія) з 20 мМ MgCl₂, суміш ДНТФ 200 мкМ кожного, 0,6 мкМ праймера і 0,5 од. DreamTaq ДНК полімерази («Сибензим», Росія).

Розподіл продуктів ампліфікації проводили методом вертикального електрофорезу в 5% поліакриламідному гелі з використанням 1хTBE буфера (89 мМ тріс, 89 мМ борної кислоти, 2 мМ трилон Б). Розмір ампліфікаційних фрагментів визначали з використанням маркеру молекулярних мас М200 («Изоген», Росія).

Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили за допомогою УФ-випромінювача з використанням бромистого етидію (1 мг/л), а також фарбуванням гелю в 0,2% AgNO₃ [9]. Електрофоретичні профілі ампліфікованої ДНК задокументували з використанням цифрової фотокамери.

Обчислення молекулярної маси продуктів ампліфікації проводили за допомогою програми GelAnalyzer (Version 2010a freeware). Кожен RAPD-фрагмент на електрофореграмі, представлений у вигляді чіткої смуги яскравого свічення з хорошою відтворюваністю при повторній ампліфікації, розглядали як окремий генетичний локус. Рівень поліморфізму визначали у відсотках відношенням числа поліморфних локусів до загального числа виявлених локусів для кожного із праймерів.

Результати досліджень. Використання п'яти олігонуклеотидних праймерів дозволило отримати інформацію, достатню для оцінки стану генетичної мінливості в досліджуваних популяціях качок. Загальна кількість RAPD-фрагментів, які мали стабільну відтворюваність, становила 159 і варіювала від 22 (ОРА-18) до 46 (ОРС-20) (табл. 1).

На тлі поліморфізму спільних для обох породних груп фрагментів, які мають більшу щільність (так звані «мажорні» локуси), має місце варіація менш інтенсивних за насиченістю «мінорних» фрагментів. Подібна картина спостерігалась при аналізі електрофореграм для решти праймерів.

Необхідно зазначити, що незважаючи на значний відсоток спільних RAPD-локусів, у досліджених популяціях відмічено 35 породоспецифічних фрагментів різної довжини (22 для глинястих і 13 для сірих), які мають низьку частоту зустрічаємості – 0,04-0,08. Найбільша кількість рідкісних локусів відносилась до «мінорного» ряду та була виявлена для ОРС-20 (12), ОРА-12 (9) та ОРС-07 (7).

Отримані дані про частоти досліджених алелів (локусів) підтверджують спорідненість походження даних

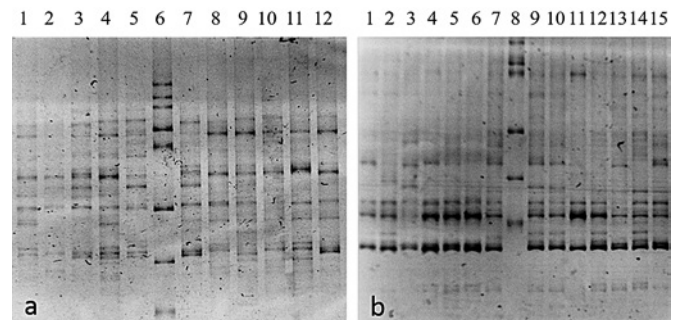


Рис. 1. RAPD-спектри особин качок досліджених популяцій з використанням праймерів ОРА-01 (а) та ОРС-07 (б) Проби 1-5 (а) і 1-7 (б) – глинясті качки, 7-12 (а) і 9-15 (б) – сірі, 6 і 8 – маркер молекулярних мас М200

1. Характеристика використаних праймерів та рівень поліморфізму RAPD-маркерів у дослідних популяціях качок

Праймер	Послідовність нуклеотидів 5'-3'	Розмір фрагментів, п.н.	Кількість локусів, шт.	Кількість поліморфних локусів, шт.	Поліморфізм, %
ОРА-01	CAGGCCCTTC	490–1605	33	31	93,9
ОРА-12	TCGGCGATAG	240–1095	23	22	95,7
ОРА-18	AGGTGACCGT	240–1962	22	21	95,5
ОРС-07	GTCCCGACGA	240–1225	35	33	94,3
ОРС-20	ACTTCGCCAC	370–2200	46	43	93,4

породних груп качок (глинясті виведені на основі сірих, [2]). Використані праймери є досить інформативними для виявлення внутрішньопородної диференціації качок. Переважна більшість досліджених локусів проявила себе як високополіморфні маркери для оцінки генетичної мінливості близькоспоріднених особин. Крім того, враховуючи наявність приватних фрагментів, ці праймери можуть бути корисними для генетичного аналізу на міжпородному рівні.

ВИСНОВКИ

1. Виявлений високий рівень поліморфізму досліджених RAPD-маркерів, а також ефективність їх використання для оцінки генетичної мінливості породних груп сірих і глинястих качок.

2. Генетична диференціація качок за результатами проведеного RAPD-аналізу може слугувати підтвердженням благополуччя обох генотипних стад з позицій збереження біологічного різноманіття.

3. Отримана інформація може бути корисна в селекційно-плеємній роботі з качками для типування, ідентифікації унікальної функціональної мінливості особин, керування рівнем інбридингу при відтворенні нечисленних популяцій даних породних груп. ■

Виявлен високий уровень полиморфизма RAPD-маркеров в отечественных популяциях серых и глинистых уток, который в среднем составлял 94%. Установлена эффективность использования праймеров OPA-01, OPA-12, OPA-18, OPC-07, OPC-20 для анализа генетической изменчивости уток на внутривидовом уровне. Предлагается применение RAPD-маркеров для контроля состояния биологического разнообразия локальных генотипных стад, а также в селекционно-племенной работе для управления уровнем инбридинга при воспроизводстве немногочисленных популяций уток.

Утки, породные группы, RAPD-маркеры, генетическая изменчивость, полимеразная цепная реакция

The high level of RAPD-markers polymorphism in populations of domestic gray and clay ducks which averaged 94% was identified. The efficiency of the use of primers OPA-01, OPA-12, OPA-18, OPC 07 OPC-20 for the analysis of within-breed genetic variation in ducks was established. It was proposed to use RAPD-markers as a control of the biological diversity of local gene pool herds as well as in the selection and breeding with aim to control the level of inbreeding in the reproduction of the small in number quantity populations of ducks.

Ducks, breed groups, RAPD-markers, genetic variation, polymerase chain reaction

Література

1. Р.Н. Календарь, В.И. Глазко. / Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культ. растений. – 2002. – Т. 34. – №4. – С. 279–296.
2. Каталог плеємних ресурсів сільськогосподарської птиці України / Ю.О. Рябоконт, В.О. Пабат, Д.М. Микитюк [та ін.] / Під редакцією Ю.О. Рябоконт. – Харків., 2005. – 78 с.
3. Катеринич О.О. Методологічні проблеми збереження генетичних ресурсів сільськогосподарської птиці / О.О. Катеринич // Проблеми збереження генотипу тварин: матер. творч. дискусії (14 лютого 2007 р.) / ІРГТ. Тов-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. – К.: Аграрна наука, 2007. – С. 40–43.
4. Кулибаба Р.А. Поліморфізм генів гормона росту, рецептора гормона росту, пролактину і рецептора пролактину в зв'язі з яичної продуктивністю у кур породи полтавская глинистая / Р.А. Кулибаба // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50, №2. – С. 198 – 207.
5. Кулибаба Р.А. Поліморфізм генів пролактину і гормона росту в лінійях кур української селекції / Р.А. Кулибаба, А.П. Подстрешный // Цитология і генетика. – 2012. – Т.46, № 6. – С. 75 – 82.
6. Методологічні аспекти збереження генотипу сільськогосподарських тварин: до 75-річ. створ. УААН / УААН, Ін-т розведення і генетики тварин; М.В. Зубець, В.П. Буркат, Ю.Ф. Мельник [та ін.] ; за наук. ред. І.В. Гузєва. – К.: Аграр. наука, 2007. – 120 с.
7. Рамазанов А.У. Молекулярна характеристика кроссов уток «Бишкульская цветная» і «Медео» на севері Казахстану / А.У. Рамазанов, Г.А. Темирбекова, К.Н. Каньшев // Птахівництво: Міжвід. темат. наук. зб. / ІТ НААН. – 2013. – Вип. 69. – С. 271 – 276.
8. Солбриг О. Популяційна біологія і еволюція / О. Солбриг, Д. Солбриг. – М.: Мир, 1982. – 488 с.
9. Irwin N. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press; 3th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press / N. Irwin, K.A. Janssen. – New York, 2001. – 764 p.
10. Measurement of within and between genetic variability in duck breeds by RAPD markers / Mohsen Gholizadeh, Ghodrath Rahimi Mianji, Abbas Ghobadi [et al.] // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2007. – Vol. 10(6). – P. 982 – 985.
11. Molecular characterization of genetic biodiversity in ducks, using RAPD-PCR analysis / E. A. El-Gendy, M. A. Helal, N. H. Goher [et al.] // Arab J. Biotech. – 2005. – Vol. 8, №2. – P. 253 – 264.
12. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. – № 9. – Rome, Italy: FAO of the UN, Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, 2011. – 87 p.