

УДК 636.1.082:575

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ МІКРОПОПУЛЯЦІЇ СІРОЇ УКРАЇНСЬКОЇ ПОРОДИ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ДНК-МАРКЕРАМИ

Ю. В. Гузєєв¹, О. В. Мельник², В. Г. Спиридонов², С. Д. Мельничук²
p-george@i.ua, oksa.pion@gmail.com

¹ТОВ «Голосіїво»,

с. Гоголів, Броварський р-н, Київська обл., 07452, Україна

²Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

Використання сучасних досягнень генетики, починаючи від контролю походження тварини до популяційної характеристики стада, значно покращує ефективність селекційної роботи у скотарстві. У країнах з розвиненим тваринництвом тестування тварин за мікросателітними локусами є обов'язковим для присвоєння тварині статусу племінної.

Метою наших досліджень був аналіз генетичних ресурсів великої рогатої худоби сірої української породи за мікросателітними локусами ДНК. Для досягнення цієї мети було використано 2 мікросателітних локуси — BM2113 та TGLA 227. Матеріалом для досліджень була велика рогата худоба сірої української породи дочірніх стад ТОВ «Голосіїво» (Броварський район Київської області) та КСП «Вороньків» (Бориспільський район Київської області). Генетичний аналіз худоби, яка належить КСП «Вороньків», було проведено в Українській лабораторії якості та безпеки продукції АПК, ТОВ «Голосіїво» — у Державній науковій установі «Всеросійський науково-дослідний інститут тваринництва Російської академії сільськогосподарських наук».

У результаті проведених досліджень двох дочірніх стад великої рогатої худоби встановлено достатньо високий рівень поліморфізму, зокрема, в КСП «Вороньків» за локусом TGLA227 він був вищим. Усі досліджувані особини цього господарства за цим самим локусом виявилися гетерозиготами, про що свідчить значення фактичної гетерозиготності. Незначний дефіцит гетерозиготних генотипів (2,5 %) зафіксовано в популяції ТОВ «Голосіїво», тоді як в КСП «Вороньків», навпаки, був надлишок гетерозиготних генотипів на рівні 17,7 %. У подальшому перспективним є проведення генетичного аналізу поголів'я сірої української породи великої рогатої худоби за більшою кількістю мікросателітних локусів.

Ключові слова: СІРА УКРАЇНСЬКА ПОРОДА, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, МІКРОСАТЕЛІТИ, ГЕТЕРОЗИГОТНІСТЬ

COMPARATIVE ANALYSIS OF GENETIC STRUCTURE OF A MICRO-POPULATION OF GRAY UKRAINIAN BREED CATTLE BY DNA MARKERS

Y. Huzeyev¹, O. Melnyk², V. Spyrydonov², S. Melnychuk²
p-george@i.ua, oksa.pion@gmail.com

¹LLC “Golosiyevo”,

Gogoliv, Brovarysky district, Kyiv region, 07452, Ukraine

²National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
15 Heroyiv Oborony str., Kyiv 03041, Ukraine

The use of advances in genetics in cattle breeding from identification to parentage determination significantly improves its efficiency. The genotyping of animals by means of microsatellite loci is mandatory for recognition of animals as breeding.

The aim of our study was the analysis of genetic resources of cattle of Gray Ukrainian breed by means of microsatellite loci of DNA. To achieve this aim we used 2 microsatellite loci — BM2113 and TGLA 227. The material for the research was cattle of Gray Ukrainian breed from two households — “Golosiyevo” (Brovary district, Kyiv region) and “Voronkiv” (Boryspil district, Kyiv region). Genetic analysis of cattle belonging to “Voronkiv” was conducted in the Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products. Genetic analysis of cattle belonging to “Golosiyevo” was conducted in the State scientific institution “All-Russian Research Institute of Livestock of Russian Academy of Agricultural Sciences”.

As a result of conducted studies of two herds of cattle sufficiently high level of polymorphism was identified. In cattle belonging "Vorontkiv" higher level of polymorphism with locus TGLA227 was observed. All studied animals of this household with locus TGLA227 were heterozygotes. It showed the value of observed heterozygosity. The deficiency of heterozygous genotypes (2,5 %) was identified in the herd of "Golosiyevo". On the contrary, in cattle belonging "Vorontkiv" there was an excess of heterozygous genotypes (17,7 %). The future genetic analysis of cattle of Gray Ukrainian breed by means of more microsatellite loci is perspective.

Keywords: GRAY UKRAINIAN BREED, POLYMERASE CHAIN REACTION, MICRO-SATELLITE, HETEROZYGOSITY

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МИКРОПОПУЛЯЦИИ СЕРОЙ УКРАИНСКОЙ ПОРОДЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО ДНК-МАРКЕРАМ

Ю. В. Гузеев¹, О. В. Мельник², В. Г. Спиридонов², С. Д. Мельничук²
p-george@i.ua, oksa.pion@gmail.com

¹ТОВ «Голосеево»,

с. Гоголев, Броварской р-н, Киевская обл., 07452, Украина

²Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Оборона, 15, г. Киев, 03041, Украина

Использование современных достижений генетики, начиная от контроля происхождения животного до популяционной характеристики стада, значительно улучшает эффективность селекционной работы в скотоводстве. В странах с развитым животноводством тестирование животных по микросателлитным локусам становится обязательным для присвоения животному статуса племенного.

Целью наших исследований был анализ генетических ресурсов крупного рогатого скота серой украинской породы по микросателлитным локусам ДНК. Для достижения этой цели использовали 2 микросателлитных локуса — BM2113 и TGLA227. Материалом для исследований был крупный рогатый скот серой украинской породы ООО «Голосеево» (Броварский район Киевской области) и КСП «Вороньков» (Бориспольский район Киевской области). Генетический анализ скота, принадлежащего КСП «Вороньков», был проведен в Украинской лаборатории качества и безопасности продукции АПК, ООО «Голосеево» — в Государственном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства Российской академии сельскохозяйственных наук».

В результате проведенных исследований двух популяций крупного рогатого скота установлен достаточно высокий уровень полиморфизма, но в КСП «Вороньков» по локусу TGLA227 его значение было выше. Все исследуемые особи этого хозяйства по локусу TGLA227 оказались гетерозиготами, о чем свидетельствует значение фактической гетерозиготности. Незначительный дефицит гетерозиготных генотипов (2,5 %) зафиксирован в популяции ООО «Голосеево», в то время как в КСП «Вороньков», наоборот, был избыток гетерозиготных генотипов на уровне 17,7 %. В дальнейшем перспективным является проведение генетического анализа поголовья серой украинской породы крупного рогатого скота за большим количеством микросателлитных локусов.

Ключевые слова: СЕРАЯ УКРАИНСКАЯ ПОРОДА, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, МИКРОСАТЕЛЛИТЫ, ГЕТЕРОЗИГОТНОСТЬ

Питання збереження генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин останнім часом набуває особливої актуальності. Основними причинами, які негативно впливають на скорочення генетичного різноманіття порід, є безсистемні схрещування, відсутність селекційних програм і стратегій, природний відбір, інтенсифікація виробництва, широке використання продуктивніших порід, штучного осі-

меніння і трансплантація ембріонів [1]. Локальні породи сільськогосподарських тварин є носіями цінного генетичного матеріалу і, порівняно зі спеціалізованими породами, мають низку переваг: підвищену стійкість до захворювань, пристосованість до певних природно-кліматичних умов, міцність конституції тощо. До того ж, локальні породи слугують матеріалом для подальшої успішної селекційної роботи.

Основною умовою у збереженні порід тварин є визначення методів і принципів виявлення їх генетичного різноманіття. Одним із найдоступніших методів його визначення є опис фенотипу тварин. Проте він має низку недоліків, основним з яких є неврахування генетичних факторів, які впливають на розвиток ознаки. За відсутності вірогідних фенотипових даних оцінка генетичного різноманіття породи ускладнюється. Вирішити цю проблему покликаний генетичний аналіз поліморфних ділянок ДНК за багатьма локусами, який дозволяє не лише провести оцінювання алельного складу популяції чи породи, але й отримати цінну інформацію щодо походження доместифікованих видів, їх міграції, походження [2].

Наразі для вивчення генетичної різноманітності в якості генетичних маркерів надають перевагу послідовностям ДНК, поліморфізм яких обумовлений відмінностями у послідовності нуклеотидів різних алелів одного локусу. Одним із таких типів генетичних маркерів є мікросателіти, STR (*Short Tandem Repeat*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Site*) — тандемні олігонуклеотидні повтори завдовжки 2–6 п. н. [3, 4], які мають кодомінантний характер успадкування та високий рівень поліморфізму. Використання сучасного лабораторного обладнання (наприклад, автоматичний ДНК-секвенатор) з високим рівнем вірогідності дозволяє визначити розміри алельних варіантів.

Серед низки порід великої рогатої худоби в Україні особливе занепокоєння у зв'язку зі зниженням рівня генетичного різноманіття викликає сіра українська порода, яка, згідно з національною «Програмою збереження та раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин України», належить до аборигенних зникаючих порід. Основними проблемами, пов'язаними зі збереженням генофонду представників цієї породи, є звуження генетичного різноманіття і зменшення частот певних генів за рахунок спрямованої селекції за обмеженими ознаками протягом багатьох поколінь, наростання гомозиготності внаслідок

розведення в замкнутій популяції, неможливість в малочисельних популяціях формувати генеалогічну структуру [5].

Метою наших досліджень був аналіз генетичних досліджень дочірніх господарств сірої української породи великої рогатої худоби Поливанівського кореня за двома мікросателітними локусами ДНК — BM2113 і TGLA227.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень слугували тварини сірої української породи великої рогатої худоби Поливанівського кореня ТОВ «Голосіїво» (Броварський район Київської області) (n=28) та КСП «Вороньків» (Бориспільський район Київської області) (n=23). Генетичний аналіз худоби, яка належить ТОВ «Голосіїво», був проведений Державною науковою установою «Всеросійський науково-дослідний інститут тваринництва Російської академії сільськогосподарських наук» з використанням електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації шляхом капілярного електрофорезу на приладі *MegaBace 500*.

Генетичний аналіз худоби, яка належить КСП «Вороньків», було проведено в науково-дослідному відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК. Периферійну кров відбирали у стерильні вакуумні пробірки з консервантом EDTA. Виділення геномної ДНК проводили з використанням наборів «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Росія) згідно з інструкцією виробника.

Для аналізу було обрано мікросателітні локуси, які входять до стандартної панелі маркерів для генотипування великої рогатої худоби, визначеної ISAG (див. *Табл. 1*).

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за стандартних умов. Продукти ампліфікації денатурували формамідом (*Sigma*, США) та розділяли шляхом електрофорезу на автоматичному 4-капілярному генетичному аналізаторі *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, США). Розміри алелів визначали, використовуючи розмірний стандарт *Genescan-LIZ 500* (*Applied Biosystems*, США)

Таблиця 1

Характеристика мікросателітних локусів, використаних у дослідженні

Локус	Локалізація в геномі, № хромосоми	Розмір алелів, п. н.	Послідовність праймерів (5'–3')
BM2113	2	124–146	F: GCTGCCTTCTACCAAATACCC R: CTTCTGAGAGAAGCAACACC
TGLA 227	18	76–104	F: GGAATTCCAAATCTGTAAATTTGCT R: ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA

та програмне забезпечення «Gene Mapper 3.7» (*Applied Biosystem*, США).

Під час проведення популяційно-генетичного аналізу обох стад визначали такі показники: кількість алелів на локус (Na), ефективну кількість алелів (Ne), фактичну (No) і теоретично очікувану (He) гетерозиготність, індекс фіксації (F). Для статистичної обробки даних використовували програмне забезпечення *Genalex 6* [6].

Результати й обговорення

Середня кількість алелів на локус, яка є показником інформативності аналізу та генетичного різноманіття, в обох популяціях за досліджуваними мікросателітними локусами виявилася майже однаковою (Табл. 2).

Середня кількість ефективних алелів характеризує рівень поліморфізму в досліджуваних стадах. Максимальне значення цього показника спостерігали в КСП «Вороньків» за локусом TGLA227, що свідчить про вищий рівень генетичної різноманітності в порівнянні зі стадом ТОВ «Голосіїво».

Аналіз гетерозиготності дає змогу оцінити генетичну мінливість у популяції і виявити кількість гетерозиготних і гомозиготних особин. Щоправда, в популяціях, в яких використовують споріднене парування, зокрема чистопородне розведення в закритих популяціях, частота гомозигот може бути завищеною. У досліджуваних нами тварин максимальний показник фактичної гетерозиготності зафіксовано у стаді КСП «Вороньків» за локусом BM2113 — 1,0, тобто усі тварини за цим локусом виявилися гетерозиготами. Відповідно, у цьому стаді рівень фактичної гетерозиготності виявився вищим за аналогічний показник КСП «Вороньків». Мінімальний рівень фактичної гетерозиготності спостерігали у стаді ТОВ «Голосіїво» за TGLA227 — 0,714. За всіма локусами, окрім TGLA227 у тварин, які належали ТОВ «Голосіїво», спостерігали надлишок гетерозиготних генотипів, про що свідчить індекс фіксації. Цей показник відображає відхилення частот гетерозиготних генотипів, з якими вони зустрічаються в популяції, від теоретично очікуваної частоти гетерозигот згідно із законом

Таблиця 2

Результати генетичного аналізу тварин сірої української породи в дочірніх господарствах ТОВ «Голосіїво» та КСП «Вороньків»

Популяція	Локус	Показник				
		Na	Ne	No	He	F
ТОВ «Голосіїво» (n=28)	BM2113	5	3,301	0,786	0,710	-0,127
	TGLA227	10	7,538	0,714	0,883	0,176
У середньому		7,5±2,5	5,420±2,119	0,750±0,036	0,796±0,087	0,025±0,152
КСП «Вороньків» (n=23)	BM2113	5	3,492	0,870	0,729	-0,219
	TGLA227	11	8,331	1,000	0,900	-0,136
У середньому		8,0±3,0	5,911±2,419	0,935±0,065	0,814±0,085	-0,177±0,041

Харді-Вайнберга внаслідок випадкового парування. Тобто індекс фіксації характеризує рівень інбридингу особин відносно популяції.

У результаті проведених досліджень максимальний надлишок гетерозиготних генотипів (21,9 %) встановлено для стада сірої української худоби КСП «Вороньків». Лише для великої рогатої худоби, яка належить ТОВ «Голосіїво», за локусом TGLA227 виявлено дефіцит гетерозиготних генотипів на рівні 2,5 %.

Висновки

Проведений генетичний аналіз двох дочірніх стад сірої української породи (Поліванівського кореня ТОВ «Голосіїво» та КСП «Вороньків») за досліджуваними мікросателітними локусами показав їх високу інформативність. В обох досліджуваних групах тварин цей показник був вищим за локусом TGLA227. При аналізі індексу фіксації встановлено незначне скорочення генетичного різноманіття в ТОВ «Голосіїво». Водночас у КСП «Вороньків», навпаки, спостерігали надлишок гетерозиготних генотипів.

Перспективи подальших досліджень. Зважаючи на отримані дані та локальність

її унікальність сірої української породи великої рогатої худоби, вважаємо за доцільне проведення подальшого її генетичного дослідження з метою запобігання скорочення генетичного різноманіття та втрати цінного генетичного матеріалу.

1. Bagirov V. Genetic resources of livestock. *Livestock of Russia*, 2008, no. 2, pp. 10–12. (in Russian)

2. Stolpovskij Yu. A. Population-genetic basis of gene conservation of domesticated species. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2013, vol. 17, no. 4/2., pp. 900–915. (in Russian)

3. Litt M., Luty J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeats within cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics*, 1989, vol. 44, no. 3, pp. 397–401.

4. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 1989, vol. 17, no. 16, pp. 6463–6471.

5. Kozyr V. S., Popikova T. V. Microevolution processes in the gene pool of herd of Gray Ukrainian cattle in experimental farm «Polyvanivka». *Bulletin of Institute of Agriculture of Steppe zone of NAAS of Ukraine*, 2011, no. 1, pp. 183–186. (in Ukrainian)

6. Peakall R., Smouse P. E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 2006, vol. 6, is. 1, pp. 288–295.