

УДК 636.2.082:575.113.1
© 2012

К.В. Котилова,
кандидат сільсько-
господарських наук

Інститут розведення
і генетики тварин НААН

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА БУГАЇВ РІЗНИХ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ISSR-МАРКЕРАМИ

Проведено оцінку бугаїв за мультилокусним міжмікросателітним поліморфізмом 24 порід великої рогатої худоби. За 4-ма ISSR-маркерами виявлено 81 ампліфікований фрагмент ДНК різної довжини. Аналіз генетичної структури за ISSR-маркерами свідчить про можливість їх використання для оцінки характеру міжпородної диференціації.

Формування племенної роботи у тваринництві України пов'язане з упровадженням ДНК-технологій і їх розвитком на основі сучасних методів досліджень. У 1994 р. запропоновано методичний підхід — ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), який належить до методів полілокусного типування біологічних об'єктів [6]. Основу цієї методики становить полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яку проводять з використанням мікросателітної послідовності з довільним нуклеотидом на 5'- або 3'-кінці як праймера. При цьому відбувається ампліфікація ДНК-фрагментів, розташованих між інвертованими послідовностями мікросателіта. ISSR-маркери мають домінуючий тип спадкування, проявляються на електрофореграмах у вигляді спектра смуг-ампліконів (ISSR-профіль, або фінгерпринт) і вважаються інформативнішими для оцінки рівня генетичного різноманіття генофондів, ніж локус-специфічні маркери [4]. Цей метод широко використовують у роботах з таксономії і філогенії видів, особливо в рослинництві [1], але вивченню особливостей генетичної структури різних видів сільськогосподарських тварин як на між-, так і на внутрішньовидовому рівнях присвячено обмежену кількість наукових публікацій [2, 3, 5].

З метою вивчення особливостей генетичної структури різних порід великої рогатої худоби проведено аналіз за ISSR-ПЛР-маркерами з використанням як праймерів фрагментів динуклеотидних і тринуклеотидних мікросателітних локусів (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (GA)₉C.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на зразках біоматеріалу від 205 бугаїв 24 порід великої рогатої худоби, які зберігаються в Національному банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ НААН. ДНК виділяли сорбентним методом. Продукти ампліфікації (амплікони) після проведення ПЛР електрофоретично розділяли у 2%-му агарозному гелі і забарвлювали бромистим етидієм з наступною візуалізацією у УФ-променях. Після проведення електрофору гелю фотографували з використанням цифрового фотоапарата Fujifilm Fine Pix S2500. Аналізували «мажорні» смуги (які містили най-

більшу кількість ампліфікованого продукту та повторювались), що виявлялися в результаті проведення 3-х реакцій ампліфікації. Кожний утворений амплікон розглядали як окремий локус. Розмір ампліфікованих фрагментів визначено з використанням програмного забезпечення TotalLab 2.01 та GelQuest 3.04. Отримані дані математично оброблено за допомогою комп'ютерних програм GELSTAT і PHYLIP.

На основі результатів електрофоретичного розділення отриманих фрагментів складено бінарні матриці, де «1» або «0» позначали наявність або, відповідно, відсутність фрагмента певної довжини. Рівень геномної варіабельності різних порід оцінено за значеннями генетичних відстаней (GD-Genetic Distances). Генетичні відстані обчислено на основі отриманої матриці даних з використанням коефіцієнта розбіжності. Проведено кластерний аналіз для незважених середніх (UPGMA), бутстреп-тест із пакета прикладних програм Gelquest, а також Popgene version 1.32 (значення розрахункової гетерозиготності, частки поліморфних локусів). Статистичний аналіз проведено з використанням програмного пакета Statistica 6,0 та Excel (Microsoft Office 2010).

Результати досліджень та обговорення. У результаті проведення порівняльного аналізу генетичної структури бугаїв молочних, м'ясних і комбінованих порід великої рогатої худоби з використанням мультилокусного міжмікросателітного аналізу за 4-ма типами ISSR-маркерів загалом отримано 670 ампліфікованих ДНК-фрагментів, з яких 81 — різних за розміром (поліморфних фрагментів — 95,1, мономорфних — 4,9%). Діапазон молекулярних мас виявлених ампліконів становив 180–1600 п.н.

З використанням як праймера динуклеотидного фрагмента мікросателітного локусу (AG)₉C сумарно ампліфікувалося 17 фрагментів різної довжини, розмір яких варював від 1500 п.н. у джерсейської породи до 200 п.н. у порід червона степова, сіра українська, світла аквітанська. Найбільшу кількість ДНК-фрагментів виявлено у тварин сірої української породи — 10, джерсейської — 9, тварини симентальської,

лебединської, української червоної молочної, української м'ясної, волинської м'ясної, лімузин, мен-анжу мали по 4 фрагменти. Для більшості порід, за винятком шароле, світла аквітанська, гаскон, був характерний фрагмент розміром 420 п.н. Фрагменти високої молекулярної маси із розмірами 1100 п.н. спостерігали лише у джерсейської та швіцької порід, а 1000 п.н. — в української червоно-рябої, джерсейської, української м'ясної та сірої української порід. За використання як праймера (GA)₉C сумарно отримано 17 ДНК-фрагментів завдовжки 220–1600 п.н. Найбільший фрагмент високої молекулярної маси 1600 п.н. спостерігали лише у тварин південної м'ясної породи. За GA-ISSR-маркером отримано 146 фрагментів ДНК. Загалом за AG-ISSR і GA-ISSR-маркерами сумарно було отримано 275 ампліфікованих фрагментів ДНК, найбільшу кількість фрагментів (18) виявлено у тварин сірої української, а найменше (6) у симентальської порід.

З використанням праймера (ACC)₆G отримано 23 фрагмента ДНК різної довжини від 1300 до 180 п.н. У білоголової української породи виявлено специфічний фрагмент завдовжки 600 п.н. З високою молекулярною масою —

1200 п.н. — фрагменти були притаманні тваринам української м'ясної і сірої української порід. З використанням праймера (GAG)₆C отримано 232 фрагмента, з яких 23 різної довжини. Слід зазначити, що переважна кількість ДНК-фрагментів за цим маркером мала молекулярну масу до 1000 п.н., лише для тварин голштинської породи були характерні фрагменти з масою 1200 п.н. і фрагмент з масою 1100 п.н., який також виявлено у тварин породи шароле, а фрагмент з масою 1000 п.н. — у тварин джерсейської породи.

Аналіз генетичної спорідненості досліджених порід свідчить, що діапазон генетичних відстаней між різними породами варіював: \lim 0,013–0,331 для AG-ISSR-маркера, \lim 0,018–0,386 для GA-ISSR-маркера, \lim 0,018–0,292 для праймера (ACC)₆G і \lim 0,027–0,386 для праймера (GAG)₆C, кластеризація порід залежала від використаного праймера. У результаті аналізу теоретично очікуваної і фактичної гетерозиготності (He) в досліджуваних породах достовірним виявилось збільшення гетерозиготності з використанням праймера (ACC)₆C та (GAG)₆C порівняно з праймером (GA)₉C та (AG)₉C, ($P < 0,05$; 0,001), відповідно.

Висновки

За використання як праймерів диплексних і триплексних нуклеотидних повторів (ISSR-ПЛР) отримано дані про специфічну генетичну структуру вітчизняних та зарубіжних порід великої рогатої худоби м'ясного і молочного напрямку продуктивності. У результаті досліджень виявлено, що використання праймерів (ACC)₆G і (GAG)₆C за генотипування великої рогатої худоби найточніше відображає специфіку генофонду тварин певної поро-

ди. Отже, найпридатнішими для генотипування м'ясних і молочних порід худоби є триплексні нуклеотидні повтори з коровіми мотивами (ACC)₆G та (GAG)₆. Отримані полілокусні спектри й рівноважний розподіл генетичних відстаней свідчать про зручність та інформативність використання молекулярно-генетичних ISSR-маркерів для оцінки міжпородних генетичних структур великої рогатої худоби.

Бібліографія

1. Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих/А.А. Банникова//Журнал общей биологии. — 2004. — Т. 65, № 4. — С. 278–305.
2. Метлицька О. ДНК-маркерні системи в селекції свиней/Метлицька О., Ревенко О., Копилова К.//Тваринництво України. — 2008. — № 2. — С. 22–24.
3. Применение межмикросателлитного анализа ДНК (ISSR-фингерпринтинга) для оценки консолидированности и чистоты пород сельскохозяйственных животных/Г.Е. Сулимова, Ю.А. Столповский, Н.В. Кол и др.//7-я междунар. науч. конф. школа «БиоТехЖ-2008». — Дубровицы, 2008. — С. 75–83.
4. Borner B. Nonanchored Inter Simple Sequence

Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting/Borner B., Branchard M.//Plant Molecular Biology Reporter. — 2001. — № 19. — P. 209–215.

5. Mohammadabadi M.R. Inter-Simple-Sequence Repeat (ISSR)-PCR for the identification of polymorphism in some native cattle breeds/Mohammadabadi M.R., T.A. Kovalenko, M.R. Nassiri, G.E. Sulimova//Proceeding of the 3rd Moscow international congress: Biotechnology: state of the art and prospects of development. — Moscow, Russia. — 2005. — V. 1. — P. 282.

6. Zietkiewicz E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification/E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda//Genomics. — 1994. — V. 20. — P. 176–183.