

(UPGMA method) on the base of minisatellite variability. It was shown that studied breeds formed two distinguished clusters. One of them contained the Malay Game, Orlov Calico and Yurlov Sonorous breeds. The second cluster included Poltava Clay, Leghorn Brown, Appentseller and Holland White Crested breeds. The efficiency of DNA-markers of different types use for chicken breed genetic differentiation, the history of studied breeds' origin and possible reasons for their genetic diversity change were discussed.

Key words: DNA fingerprinting, minisatellites, chicken breeds, genetic differentiation

УДК 575.113:636.92

ГЕНЕТИЧНА ОЦІНКА КРОЛІВ НОВОЗЕЛАНДСЬКОЇ БІЛОЇ ПОРОДИ ЗА ПОЛІМОРФНИМИ ВАРИАНТАМИ C34T ГЕНА *MSTN* ТА G2464A ГЕНА *PGR*

Є.А. ШЕВЧЕНКО^{1,2}, К.В. КОПИЛОВ¹, О.М. ФЕДОТА^{1,3}

Інститут розведення і генетики тварин НААН (Чубинське, Україна)¹

Черкаська дослідна станція біоресурсів ІРГТ НААН (Черкаси, Україна)²

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна (Харків, Україна)³

shevchenko.e.a.ser@gmail.com

Представлено результати генотипування кролів новозеландської білої породи за поліморфними варіантами C34T гена міостатину (*MSTN*) та G2464A гена прогестеронового рецептора (*PGR*). Розподіл частот алелів досліджуваних генів становив: С – 0,471 і Т – 0,529, Г – 0,433 і А – 0,567. Доведено вплив генотипу кролів за генами міостатину та прогестеронового рецептора на прояв господарських корисних ознак – середньодобового приросту, багатоплідності, диференційної адаптивності до інфекційних захворювань. Тому в господарствах найбільш ефективним напрямом селекції кролів новозеландської білої породи за поліморфним варіантом C34T гена *MSTN* буде добір на користь гетерозигот СТ.

Ключові слова: кролі, ПЛР-ПДРФ, міостатин, прогестероновий receptor, продуктивність

Введення. Актуальним питанням у кролівництві наразі є вивчення генетичних детермінант високої продуктивності й використання генетичного моніто-

© Є.А. Шевченко, К.В. Копилов, О.М. Федота, 2013

Розведення і генетика тварин. 2013. № 47

рингу при управлінні селекційним процесом [1]. Багатовікова практика ведення цієї галузі тваринництва розробила різні методи створення та поліпшення порід, суть яких зводиться до виявлення та інтенсивного використання тварин із бажаними ознаками [2, 3]. Однак нині стає очевидним, що одні лише традиційні методи селекції не можуть забезпечити відчутного селекційного прогресу в породах, більш того, постає питання про покращання тих господарських корисних ознак, які мають низькі коефіцієнти успадковування [4].

З розвитком молекулярної генетики стала можливою ідентифікація кандидатних генів, прямо чи опосередковано пов'язаних з ростом та формуванням м'ясої продуктивності кролів, наприклад гена міостатину (*MSTN*) [5]. Генна мережа відтворної здатності кролів, на нашу думку, складається з генів прогестеронового рецептора (*PGR*), утероглобуліну (*SCGB1A1*), інсулінподібного фактора росту 1 (*IGF1*), тканинного інгібітору металопротеїнази (*TIMP1*) [6–9].

Ген міостатину (*MSTN*) локалізований у 7-й хромосомі. Міостатин, фактор росту і диференціювання 8, є членом родини трансформувального фактора росту (TGF- β) та бере участь у пригніченні росту і диференціюванні скелетних м'язів тварин. Мутації в гені міостатину та їхні фенотипічні ефекти у вигляді збільшення м'язової маси описано для м'ясних порід великої рогатої худоби, мишей, собак, наприклад малої англійської борзої, людини. Однонуклеотидний поліморфізм гена міостатину кролів (заміна цитозину на тимін у 34-ї позиції першого інтрона) було описано L. Fontanessi у 2008 р. [9].

Ген прогестеронового рецептора міститься у 1-й хромосомі. Прогестероновий receptor є членом суперродини інтрацелюлярних рецепторів, і його фізіологічна роль полягає у сприйнятті дії стероїдних гормонів. Ген прогестеронового рецептора в позиції 2464 у промоторній ділянці має два алельних варіанти – G і A. Відомо, що генотип кролематок за геном PGR має вплив на життєздатність ембріонів кролів [8].

У зв'язку з тим що й досі в Україні не проводилося молекулярних досліджень у напрямі генетики кролів, метою нашої роботи став аналіз зв'язку генотипу кролів новозеландської білої породи за поліморфними варіантами досліджуваних генів з проявом господарських корисних ознак.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведено на поголів'ї (випадкова вибірка) кролів новозеландської білої породи, які утримувалися в умовах кролеферм СГПП «Марчук Н.В.» (с. Ташлик Смілянського району Черкаської області).

Оцінку фенотипу тварин – м'ясну продуктивність та відтворну здатність кролів визначено за даними зоотехнічного обліку згідно з Інструкцією з бонітування кролів [10]. Як господарські корисні ознаки було обрано: середньодобові приrostи, масу парної тушки, витрати корму на 1 кг приросту (60–120 днів), багатоплідність і молочність кролематок.

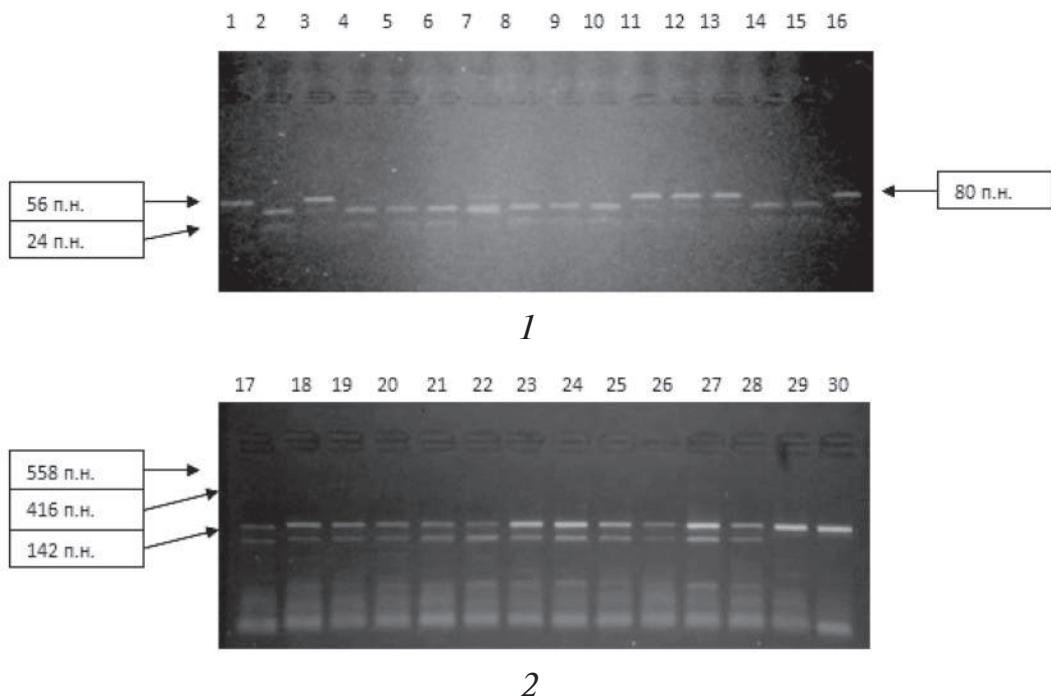
Молекулярно-генетичний аналіз виконано у відділі генетики Інституту розведення і генетики тварин НААН. У роботі використано зразки венозної крові 130 тварин. Виділення ДНК з венозної крові тварин прове-

дено за стандартною методикою [11] за допомогою набору «ДНК-сорб Б» («Амплісенс», Росія). У полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР) використано наступні праймери: F:5'-TAACTGAAAAGAACCCCTCTAGTAGC-3' і R:5'-TCGGTAGTTGTTCCCACTT-3' (ген *MSTN*); F:5'-GAA GCA GGT CATGTCGATTGGAG-3' і R:5'-CGCCTCTGGTGCCAAGTCTC-3' (ген *PGR*). Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 1Х буфер для ДНК полімерази, 200 мкмоль суміші трифосфатів («Амплісенс», Росія), 0,5 мкмоль відповідного праймера, 0,6 од.акт. ДНК-полімерази («Fermentas», Литва). Геномна ДНК додавалась у кількості 50 нг. Загальний об'єм ПЛР-суміші становив 25 мкл. Ампліфікацію проведено у наступних умовах: 5 хв при 95°C («гарячий старт»); 34 цикли: 30 с – 95°C, 30 с – 66°C, 60 с – 72°C; 5 хв – 72°C. Для рестрикційного аналізу використано ендонуклеази рестрикції AluI та Eco31 I («Fermentas», Литва) при 37°C протягом 12–16 год. Рестрикційні фрагменти розділено у 2%-му і 3%-му агарозному гелі. Аналіз електрофорограм проведено за допомогою програмного забезпечення TotalLab 2.01 [12].

При виконанні популяційно-генетичного аналізу структуру популяції тварин оцінено за законом Харді-Вайнберга. Розраховано індекс фіксації Райта, спостережну гетерозиготність H_o і очікувану гетерозиготність H_e .

Під час статистичного аналізу перевірку розподілу кількісних даних за кожною ознакою на відповідність законам нормального розподілу проведено за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Порівняння середніх арифметичних здійснювали за методом Стьюдента. В окремих випадках при проведенні множинних порівнянь вводили поправку Бонферроні. Для оцінювання ступеня впливу генотипу на прояв ознак виконано однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA). У разі відхилення розподілу ознак від нормального використано критерій Краскела-Уоліса. Оцінювання розподілу частот алелів та генотипів, рівності рядів розподілу здійснено за допомогою критерію χ^2 Пірсона. Статистичні гіпотези перевірено на рівнях значущості 0,05; 0,01; 0,001. Бази даних та розрахунки виконано у програмах Microsoft Excel 2010, STATISTICA 8.0, GenAlEx 6.0 [13–16].

Результати досліджень, їхнє обговорення. Результати молекулярно-генетичного аналізу поліморфних варіантів C34T гена *MSTN* та G2464A гена *PGR* наведено на рисунку.



**Рестрикційний аналіз гена міостатину (1) і гена прогестеронового рецептора (2) кролів новозеландської білої породи. Електрофореграма продуктів ПЛР, гідролізованих ендонуклеазами рестрикції AluI в 3%-му агарозному гелі (1) та Eco31 I у 2%-му агарозному гелі (2):
1, 2, 4–10, 12, 14, 15 – гомозиготи TT; 3, 11–13, 16 – гетерозиготи CT;
17 – 28 – гетерозиготи GA; 29, 30 – гомозиготи за алелем А**

Отримані частоти алелів C34 і 34T гена *MSTN* та G2464 і 2464A гена *PGR* подано у табл. 1. Статистично значущої різниці між кролями та кролематками за частотами алелів гена міостатину немає.

1. Частоти алелів C34 і 34T гена *MSTN* та G2464 і 2464A гена *PGR*

Алелі та гени	Алелі C34 і 34T гена <i>MSTN</i>			Алелі G2464 і 2464A гена <i>PGR</i>
Стать тварин	♀ *	♂ *	Всього	♀
Частоти алелів:				
P	0,457	0,5	0,471	0,433
q	0,543	0,5	0,529	0,567
Статистики	* df=1, $\chi^2_{st}=3,84$, $\chi^2_f=0,007$, p>0,05			

Примітка. ♀ – самки кролів, ♂ – самці кролів, df – число ступенів свободи, χ^2 – критерій Пірсона, p – рівень значущості.

На підставі частот аналізованих алелів отримано теоретичне число генотипів для панміксної популяції кролів. Аналіз фактичного й теоретичного розподілу генотипів кролів новозеландської білої породи за поліморфними варі-

антами гена міостатину показав, що структура популяції відповідає співвідношенню Харді-Вайнберга, фактичний розподіл генотипів статистично значуще не відрізняється від теоретично очікуваного при рівновазі ($df=2$, $\chi^2_{st}=5,99$, $\chi^2_f=0,007$, $p>0,05$) (табл. 2).

2. Розподіл генотипів CC, CT, TT гена MSTN у кролів новозеландської білої породи

Розподіл	CC		CT		TT	
	кількість	%	кількість	%	кількість	%
Фактичний	12,0	23,5	24,0	47,1	15,0	29,4
Теоретичний	11,3	22,2	25,4	49,8	14,3	28,0
Статистики	$df=2$, $\chi^2_{st}=5,99$, $\chi^2_f=0,02$, $p>0,05$					

Примітка. df — число ступенів свободи, χ^2 — критерій Пірсона, p — рівень значущості.

Також немає статистично значущої різниці між розподілом частот генотипів у самців та самиць за поліморфним варіантом C34T гена *MSTN*.

Генотипи самиць кролів новозеландської білої породи за геном прогестеронового рецептора розподілились наступним чином: найбільшу кількість становили гетерозиготи AG, кількість гомозигот за алелем G була у 2,7 раза меншою, а кількість гомозигот за алелем C — в 1,6 раза меншою.

Доведено, що структура популяції за поліморфним варіантом G2464A гена прогестеронового рецептора ($df=2$, $\chi^2_f=0,018$, $p>0,05$) відповідає співвідношенню Харді-Вайнберга (табл. 3).

3. Розподіл генотипів GG, GA, AA гена PGR у самок кролів новозеландської білої породи

Розподіл	GG		GA		AA	
	кількість	%	кількість	%	кількість	%
Фактичний	11,0	18,3	30,0	50,0	19,0	31,7
Теоретичний	11,3	18,3	29,5	50,0	19,2	31,7
Статистики	$df=2$, $\chi^2_{st}=5,99$, $\chi^2_f=0,018$, $p>0,05$					

Примітка. df — число ступенів свободи, χ^2 — критерій Пірсона, p — рівень значущості.

Для кожного досліджуваного поліморфізму, C34T гена *MSTN* та G2464A гена *PGR*, було розраховано очікувану гетерозиготність $H_{оч.}$, спостережну гетерозиготність $H_{спост.}$ та індекс фіксації Райта (табл. 4).

4. Показники генного різноманіття кролів новозеландської білої породи

Ген	Гетерозиготність		Індекс фіксації Райта
	$H_{оч.}$	$H_{спост.}$	
Міостатин	0,471	0,477	-0,55
Прогестероновий receptor	0,500	0,491	-0,31

Примітка. $H_{спост.}$ – спостережна гетерозиготність; $H_{оч.}$ – очікувана гетерозиготність, F_{is} – індекс фіксації Райта.

Показник F_{is} для обох поліморфних варіантів має від'ємне значення, що демонструє перевагу гетерозигот у популяції за досліджуваними генами.

За умови, що поліморфні варіанти досліджуваних генів не є зчепленими, слід очікувати, що аналізована вибірка буде рівноважною за всіма незалежними комбінаціями. Однак аналіз рядів розподілу генотипів самок кролів показав статистично значущу різницю між теоретично очікуваними частотами та фактичними (табл. 5). Вибірка тварин демонструє відхилення від рівноваги за комбінаціями алелів аналізованих генів.

5. Частоти генотипів за поліморфізмами C34T гена MSTN та G2464A гена PGR самок кролів

Генотип	Кількість спостережень		Статистики
	теоретична	фактична	
CC GG	1	4	
CC GA	4	2	
CC AA	3	4	
CT GG	2	5	$df=8,$
CT GA	7	4	$\chi^2_{st}=20,09,$
CT AA	5	3	$\chi^2_f=20,65,$
TT GG	2	2	$p<0,01$
TT GA	6	3	
TT AA	4	7	

Примітка. df – число ступенів свободи, χ^2 – критерій Пірсона, p – рівень значущості.

Такі відхилення можуть свідчити про те, що носії одних генотипів, ймовірно, мають селективну перевагу, а інші, навпаки, – знижену адаптивність і життєздатність та підлягають впливу добору.

Тестування випадкової вибірки тварин за аналізованими поліморфізмами, проведене після епідемії еймеріозу в популяції кролів, показало, що розподіл та співвідношення генотипів тварин мають статистично значуще відхилення від теоретично очікуваного (табл. 6).

6. Розподіл генотипів СС, СТ, ТТ гена MSTN у самиць кролів новозеландської білої породи

Розподіл	СС		СТ		ТТ	
	кількість	%	кількість	%	кількість	%
Фактичний	48,0	73,9	8,0	12,3	9	13,8
Теоретичний	16,7	25,7	26,0	40,0	22,3	34,3
Статистики	df=2, $\chi^2_{st} = 13,82$, $\chi^2_f = 79,05$, p<0,001					

Примітка. df – число ступенів свободи, χ^2 – критерій Пірсона, р – рівень значущості.

Майже втрічі зменшилась частка тварин-носіїв алеля Т, який зумовлює порушення функціональної активності міостатину. Відомо, що у кролів, хворих на еймеріоз, з розвитком запалювальних процесів у печінці до інших симптомів додаються паралічі кінцівок та шийних м'язів, а також судоми. Можливо, тварини-носії алеля Т, у яких пригнічено ріст та диференціювання м'язів, мають меншу стійкість проти інфекційних захворювань з подібним патогенезом. З цієї точки зору, алель С та генотип СС мають селективну перевагу порівняно з алелем Т та генотипами СТ і ТТ.

Але за результатами однофакторного дисперсійного аналізу було встановлено статистично значущий вплив генотипу кролів новозеландської білої породи за геном міостатину на прояв середньодобових приростів (45%) та на масу парної тушки (35%) (табл. 7).

7. Ступінь впливу генотипу кролів новозеландської білої породи за геном MSTN на прояв ознак м'ясної продуктивності (n=51)

Ознака	η	p
Середньодобові приrostи	0,45	<0,05
Маса парної тушки	0,35	<0,05
Витрати корму на 1 кг приросту (60–120 днів)	0,24	>0,05

Примітка. η – частка впливу фактора, n – кількість тварин, p – рівень значущості.

Аналіз середньодобових приростів у самців та кролематок з різними генотипами за геном міостатину показав, що найбільш цікавими виявилися як самці, так і кролематки з генотипом СТ, показники при якому статистично значуще вищі, ніж при генотипах СС і ТТ (табл. 8.)

8. М'ясна продуктивність кролів новозеландської білої породи з різними генотипами за геном *MSTN*

Показник	Генотип					
	СС		СТ		ТТ	
	♂(n=2)	♀(n=17)	♂(n=9)	♀(n=15)	♂(n=3)	♀(n=5)
Середньо-добовий приріст, г	27,5±0,35	33,4±0,12	37,2±0,13	37,6±0,09	30±0,75	32,4±0,49
Статистики СС–СТ	$\delta t_f = 9,95, t_{st} = 4,78, df=9, p<0,001$					
	$\delta t_f = 2,57, t_{st} = 2,04, df=30, p<0,05$					
СТ–ТТ	$\delta t_f = 3,78, t_{st} = 3,17, df=10, p<0,01$					
	$\delta t_f = 2,5, t_{st} = 2,10, df=18, p<0,05$					

Примітка. ♀ – самиці кролів, ♂ – самці кролів, t – критерій Стьюдента, df – число ступенів свободи, p – рівень значущості.

Саме тому, на нашу думку, у господарствах найбільш ефективним напрямом селекції кролів новозеландської білої породи за поліморфним варіантом C34T гена *MSTN* буде добір на користь гетерозигот СТ.

Характер впливу генотипу самок кролів новозеландської білої породи за геном прогестеронового рецептора на прояв ознак відтворної здатності наведено у табл. 9. Виявлено вплив генотипу кролематок за геном *PGR* на таку ознаку, як багатоплідність, але статистично значущої різниці між групами тварин з різними генотипами за цією ознакою не знайдено, що, можливо, пов’язано з невеликим обсягом вибірки.

9. Ступінь впливу генотипу кролематок новозеландської білої породи за геном *PGR* на прояв ознак відтворної здатності (n=60)

Ознака	η	p
Молочність	0,3	>0,05
Багатоплідність	0,39	<0,05

Примітка. η – частка впливу фактора, n – кількість тварин, p – рівень значущості.

Згідно з даними в табл. 9 можна стверджувати, що генотип самиць кролів новозеландської білої породи за геном прогестеронового рецептора має статистично значущий вплив на прояв багатоплідності, що також може бути використано в селекційно-племінній роботі господарств.

Висновки. Найбільш ефективним напрямом селекції кролів новозеландської білої породи за поліморфним варіантом C34T гена *MSTN* може бути добір на користь гетерозигот СТ. Перспективними є подальші дослідження впливу генотипів за геном *PGR* на відтворну здатність кролематок на прикладі новозеландської білої породи кролів.

Подяка. Автори висловлюють подяку співробітникам відділу генетики Інституту розведення і генетики тварин НААН за підтримку в проведенні експериментальних досліджень.

1. *Бала В.І.* Технологія виробництва продукції кролівництва і звірівництва: підручник / В.І. Бала [та ін.]. – Вінниця: Нова Книга, 2009. – 272 с.
2. *Бащенко М.І.* Кролівництво / М.І. Бащенко, О.Ф. Гончар, Є.А. Шевченко. – Черкаси, 2011. – 302 с.
3. *Вакуленко І.С.* Кролівництво / Вакуленко І.С. – Х., 2008. – 282 с.
4. *Piles M.* The effect of selection for growth rate on carcass composition and meat characteristics of rabbits / M. Piles, A. Blasco, M. Pla // Meat Science. – 2005. – № 9. – P. 347–355.
5. *Khalil M.H.* Methods criteria, techniques, and genetic responses for rabbit selection: review / M.H. Khalil, A.M. Al-Saef // In Proc. 9th World Rabbit Congress. – Italy, Verona, 2008. – P. 1–22.
6. *Argente M.* Candidate genes analysis for reproductive traits in two lines of rabbit divergently selected for uterine capacity / M. Argente [et al.] // Animal Science. – № 88 (3). – 2009. – P. 1–7.
7. *Rafayova A.* Detection of MSTN polymorphism in rabbit / A. Rafayova [et al.] // Zootehnics si Biotechnologii, 2009. – № 2. – P. 637–641.
8. *Peiro R.* Expression of progesterone receptor related to the polymorphism in the PGR gene in the rabbit reproductive tract / R. Peiro [et al.]. – 2010. – № 88(2). – P. 217–220.
9. *Fontanezi L.* Analysis of candidate genes for meat production traits in domestic rabbit breeds / L. Fontanezi [et al.] // 9th World rabbit congress, Verona, Italy, 2008. – P. 79–84.
10. *Інструкція* з бонітування кролів. Нормативне виробничо-практичне видання. – Офіц. вид., чинний від 25.09.2003 N 351. – К., 2003. – 86 с.
11. *Sambrook J.* Molecular Cloning / J. Sambrook, D. Russel. – N. Y. Cold spring Harbor Lab. Press, 2001. – 2222 p.
12. *TotalLab.* – Режим доступу: <http://www.totallab.com>
13. *Вейр Б.* Анализ генетических данных / Вейр Б. – М., 1995. – 400 с.
14. *Genetic Analysis in Excel.* – Режим доступу: <http://biology.anu.edu.au/GenAlEx>
15. *Statistica*, StatSoft, Inc. – Режим доступу: <http://www.statsoft.com>
16. *Плохинский Н.А.* Руководство по биометрии для зоотехников / Плохинский Н.А. – М.: Колос, 1969. – 255 с.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КРОЛИКОВ НОВОЗЕЛАНДСКОЙ БЕЛОЙ ПОРОДЫ ЗА ПОЛИМОРФИЗМОМ С34Т ГЕНА *MSTN* И G2464A ГЕНА *PGR*

Е.А. Шевченко^{1,2}, К.В. Копылов¹, А.М. Федота^{1,3}

Институт разведения и генетики животных (Чубинское, Украина)¹

Черкасская опытная станция биоресурсов ИРГТ НААН (Черкассы, Украина)²

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (Харьков, Украина)³

shevchenko.e.a.ser@gmail.com

Представлены результаты генотипирования кроликов новозеландской белой породы по полиморфным вариантам C34T гена миостатина (MSTN) и G2464A гена прогестеронового рецептора (PGR). Распределение частот аллелей изучаемых генов составило: C – 0,471 и T – 0,529, G – 0,433 и A – 0,567. Установлено влияние генотипа кроликов по генам миостатина и прогестеронового рецептора на проявление хозяйственно полезных признаков – среднесуточного привеса, многоплодия, дифференциальной адаптивности к инфекционным заболеваниям. Поэтому в хозяйствах наиболее эффективным направлением селекции кроликов новозеландской белой породы по полиморфным вариантам C34T гена MSTN будет отбор в пользу гетерозигот CT.

Ключевые слова: **кролики, ПЦР-ПДРФ, миостатин, прогестероновый рецептор, продуктивность**

GENETIC EVALUATION OF NEW ZEALAND WHITE BREED RABBITS BY POLYMORPHISM C34T MSTN GENE AND G2464A PGR GENE

E.A. Shevchenko^{1,2}, K.V. Kopylov¹, O.M. Fedota^{1,3}

Institute of Animal Breeding and Genetics (Chubinske, Ukraine)¹

Cherkaska Experimental station of Bioresources (Cherkasy, Ukraine)²

V.N. Karazin Kharkiv National University (Kharkiv, Ukraine)³

Present results of genotyping New Zealand White breed rabbits by polymorphic variants of C34T myostatin gene (MSTN) and G2464A progesterone receptor gene (PGR). Distribution allele frequencies of the studied genes was – C – 0,471 and T – 0,529, G – 0,433 and A – 0,567. Set influence of genotype rabbits by myostatin and progesterone receptor genes expression on the manifestation of economically useful traits – average daily gain, fertility, differential adaptability to infectious diseases. Therefore, in farms the most efficient destination of selection of New Zealand White breed rabbits by polymorphic variant of C34T MSTN gene is selection in favor of heterozygotes CT.

Key words: **rabbits, PCR-RFLP, myostatin, progesterone receptor, productivity**