

10. Хмельничий Л.М. Оцінка екстер'єру тварин в системі селекції великої рогатої худоби: Автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук: 06.02.01 / ІРГТ УААН. — Чубинське, 2005. — 40 с.

11. Чижик И.А. Альбом по конституции и экстерьеру сельскохозяйственных животных. — Л.: Колос, 1972. — 208 с.

12. Эйсер Ф.Ф. Селекция на уровне современных требований // Животноводство. — 1982. — № 10. — С. 32.

13. Эйсер Ф.Ф. Генетические проблемы селекции крупного рогатого скота // Вестн. с.-х. науки. — 1987. — № 3. — С. 381.

### **ОСОБЕННОСТИ ЭКСТЕРЬЕРА БЫЧКОВ МЯСНЫХ ПОРОД.**

Мельник Ю.Ф.

*Представлены материалы экспериментальных исследований углубленной оценки бычков мясных пород по экстерьеру с определением фенотипической изменчивости ведущих промеров и индексов телосложения в возрастной динамике в условиях породиспытания.*

**Бычки, экстерьер, порода**

### **FEATURE OF EXTERIOR OF OF MEATS BREEDS.** Melnyk U.

*Materials of experimental researches of deep estimation of bull-calves of meats breeds are presented on an exterior with determination of phenotypical changeability of leading measurements and indexes of build in an age-dependent dynamics in the conditions of trial breeds.*

**Bull-calves, exterior, breed**

**УДК 575.113:636.03**

**О.І. МЕТЛИЦЬКА**

*Інститут свинарства ім. О.В. Квасницького УААН*

## **МЕТОДИЧНІ І ПРИКЛАДНІ ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ISSR-PCR МАРКІРУВАННЯ ВНУТРІШНЬО- ТА МІЖПОРОДНОЇ МІНЛИВОСТІ СВИНЕЙ**

*Молекулярно-генетичні маркери, що ґрунтуються на технології ПЛР, є найбільш зручним методологічним підходом щодо вирішення питань дослідження мінливості в популяціях еукаріот. Акцентовані найважливіші методичні аспекти ефективного типування тварин за полілокусними системами ISSR, що базуються на ампліфікації ділянок між інвертованими послідовностями мікросателітів. Доведено можливість використання ISSR-маркування для оцінки внутрішньо- і міжпородної мінливості, вирішення стратегічних питань селекції і збереження малочисельних популяцій свиней, дослідження генетичних процесів породної дивергенції.*

**ПЛР-ампліфікація, ISSR-маркування, популяція, мінливість, генетична схожість, локус, амплікон**

Вирішення теоретичних та прикладних завдань генетики сільськогосподарських тварин неможливо без використання надійних високополіморфних молекулярно-генетичних маркерних систем, що дають змогу проводити адекватну оцінку внутрішньо- і міжпородної мінливості тварин, особливостей мікроеволюційних процесів, що відбуваються внаслідок породоутворення, або селекційно-племінної роботи, спрямованої на поліпшення показників продуктивності в замкнених малочисельних популяціях.

В останні роки на зміну широкорозповсюдженим імунологічним маркерам з'являються методи "прямого" контролю

© О.І. Метлицька, 2008

Розведення і генетика тварин. 2008. Вип. 42.

рівня генетичної мінливості біологічних об'єктів, оснований на дослідженні поліморфізму ДНК. Починаючи з середини 80-х років геномна ідентифікація швидко прогресувала за допомогою технології ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції). Отримала розвиток низка зручних генетичних систем ідентифікації мінливості, які потребують незначної кількості ДНК для досліджень і відповідають основним вимогам, що висуваються до молекулярних маркерів, специфічністю, відтворюваністю (повторюваністю результатів), поліморфністю. Найбільш розповсюдженими маркерами, основаними на ПЛР, є RAPD (поліморфізм випадково ампліфікованих ДНК-фрагментів) [1], SSR (прості послідовності, що повторюються), або мікросателіти [2], і AFLP (поліморфізм довжини ампліфікованої ділянки) [3].

Кожна вказана маркерна техніка має свої переваги і недоліки. Маркери RAPD швидко і точно ампліфікуються (через довільну послідовність праймерів), але характеризуються недостатньою відтворюваністю при повторенні експериментів [4, 5], AFLP мають середні показники відтворюваності, але вимагають спеціального обладнання значної вартості, висококваліфікованого лабораторного персоналу і суттєвих затрат часу [6]. Мікросателіти – специфічні і надзвичайно поліморфні [4, 6], але конструювання цих маркерних систем вимагає знання структури геномної послідовності для проектування специфічних праймерів і тому їхнє використання обмежується економічно важливими біологічними об'єктами.

На нашу думку, особливої уваги заслуговує відносно нова техніка молекулярного типування різноманітних груп живих організмів – ISSR (Inter Simple Sequence Repeat – інвертовані прості послідовності, що повторюються). Це довільні маркери, які ампліфікуються в ПЛР за наявності одного праймера, комплексного до обраного мікросателіта. Така ампліфікація не потребує інформації про послідовність генома досліджуваного об'єкта, а її результатом є мультилокусні і надзвичайно поліморфні спектри ДНК-продуктів [7, 8].

**Метою** наших досліджень було створення маркерних систем типування тварин з використанням праймерів, що дають змогу отримати спектр ампліконів з високою відтворюваністю і специфічністю при проведенні оцінки міжпородної диференціації

свиней, оцінки генетичної гетерогенності популяцій і окремих особин.

**Матеріали і методи досліджень.** Зразки крові в кількості 1 мл відбирали з вушної вени свиней [9] миргородської породи (племзавод ім. Декабристів Миргородського району Полтавської області, племзавод "Мрія-1" Чернігівської області) в поліетиленові пробірки типу "Еппендорф", що містили 200 мкл 3,8%-го цитрату натрію. Виділення ДНК проводили за допомогою реагента "Chelex-100" [10]. Окрім цього в досліді використовували матеріал банку ДНК лабораторії генетики, виділеної з венозної крові тварин сольовим методом [11] від типових представників порід великої білої англійської селекції (ВБА), внутрішньопородних типів УВБ-1, УВБ-2 великої білої породи місцевої селекції, миргородської (М), полтавської м'ясної (ПМ), уессекс-седлбекської (УС) та червонопоясої спеціалізованої м'ясної лінії (ЧПСЛ). Ліофілізовану ДНК від тварин порід мейшан і п'єтрен люб'язно надали співробітники генетичної лабораторії Хохенхаймського університету (Німеччина).

ДНК-генотипування свиней проводили шляхом ампліфікації ДНК у полімеразній ланцюговій реакції з використанням ISSR-праймерів: S1 – (AGC)<sub>6</sub>C [12,13], S2 – (AGC)<sub>6</sub>G [12–15], S5 – (ATG)<sub>6</sub>C. Олігонуклеотидні послідовності синтезовано НВО "Літех", НДІ фізико-хімічної медицини (м. Москва, Росія). ПЛР проводили в 25 мкл реакційної суміші, складеної із компонентів стандартного набору "Тапотілі" (НДІ генетики, м. Москва): 2,5 мкл буфера, до складу якого входить MgCl<sub>2</sub> і суміш трифосфатів, 100 pm праймера (1 мкл/реакцію), 1,25 од. полімерази (0,3 мкл), геномну ДНК додавали в кількості 10–12 нг на реакцію, суміш доводили до загального об'єму 25 мкл деіонізованою водою. Температура відпалу виявилася універсальною для перелічених праймерів і становила 57°C. Синтез фрагментів ДНК проходив за 30 циклів ампліфікації на термоциклері "Терцик" ("ДНК-технологія", м. Москва) при 94°C початкової денатурації з використанням "гарячого старту" – 1 хв, відпал праймерів – 57°C, 1 хв, синтез – 72°C, 4 хв, денатурація – 94°C, 1 хв. Реакцію завершували етапом елонгації – 72°C, 7 хв.

Для тестування продуктів ампліфікації використовували 2%-ві агарозні гелі з наступним фарбуванням їх у розчині бромистого

етидію. Візуалізацію фінгерпринтів здійснювали на транс-ілюмінаторі в УФ світлі з наступним фотографуванням електрофореграм цифровою камерою. Диференціацію ампліконів за розмірами проводили за допомогою маркера молекулярної маси DNA-Ladder 10 000bp ("Fermentas", Литва). Аналізу підлягали "мажоритарні" смуги, що виявлялися в результаті трьох паралельно виконаних реакцій ампліфікації. Взаємне розташування смуг фінгерпринту виконували з огляду на масштаб довжини пробігу між фрагментами маркерної ДНК в агарозному гелі.

Отримані дані статистично обробляли за допомогою стандартних комп'ютерних програм GELSTAT і TREES. Вихідний файл для першої з них формували за присутністю (1) і відсутністю (0) амплікону в певному положенні ISSR-спектрів. Побудову генетичних дерев (дендрограм) здійснювали за допомогою програми TREES після розрахунку генетичних дистанцій за формулою:  $1 - I_n$ , де  $I_n$  – індекс генетичної схожості, розрахований в GELSTAT.

**Результати та їхнє обговорення.** Враховуючи нечисленні літературні дані щодо використання ISSR-маркерів для характеристики генотипу біологічних об'єктів, слід відмітити, що вибір саме цього методу виявився найбільш придатним для організмів з низьким рівнем генетичної рекомбінації. Так, наприклад, система полілокусного типування за допомогою мікросателітних праймерів широко застосовується при вирішенні складних питань генетичного картування, пошуку "головних генів продуктивності" у тутового шовкопряда [16, 17], дослідженні різноманітності деяких видів комах з низьким рівнем міжпопуляційної мінливості [15, 18]. Використання ISSR-ПЛР аналізу в рослинництві вважається майже традиційним, і нині сконструйовано велику кількість праймерів, що дають змогу вирішувати не тільки спірні питання таксономії окремих видів рослин [19], але і проводити сортову паспортизацію, оцінювати міжсорткову диференціацію під впливом добору [12], здійснювати ефективну селекцію за локусами кількісних ознак, застосовуючи певні ISSR-маркерні системи [20]. Для вирішення означених питань генетики комах ISSR-маркери домінантного типу успадкування є досить вдалим науковим заходом завдяки існуванню явища ахіазматичного овогенезу (відсутності рекомбінаційних процесів у мейозі), характерного

для представників жіночої статі. Стосовно до рослин домінантні маркери дають можливість віддеференціювати "чисті лінії", отримані внаслідок самозапилення.

Очевидно, засновані на поліморфізмі мікросателітних послідовностей системи генетичного типування ссавців не дають змоги відстежити існуючі групи зчеплення з "головними" генами продуктивності, що належать до групи QTL (локуси кількісних ознак). Окрім цього виникає низка складнощів при інтерпретації результатів такого тестування тварин унаслідок невідомої хромосомної локалізації ISSR-локусів, але завдяки високому рівню їхнього поліморфізму дослідник отримує цінну інформацію про певні генетичні зміни в малочисельних популяціях (породах сільськогосподарських тварин) під дією двох видів відбору – природного і штучного.

Для вищих організмів характерною рисою є високий рівень генної рекомбінації і мутаційних процесів, переважно в гетерохроматичних регіонах хромосом, насичених повторюваними нуклеотидними послідовностями. Тому еволюційні події в цих ділянках відбуваються значно швидше, ніж у висококонсервативних накопиченнях еухроматину, що містить структурні гени [21].

Враховуючи ці особливості, ми вважали доцільним вибір маркерних систем, заснованих на виявленні мікросателітних повторів, як зручних методів оцінки мінливості сільськогосподарських тварин, що виникає не тільки внаслідок мейотичних рекомбінацій, а і в результаті селекційного тиску, процесів породного становлення, природної адаптації, генетичного дрейфу тощо.

При виборі і самостійному конструюванні послідовностей праймерів керувалися тим фактом, що геном свині містить 9% повторів типу GT і майже 3% – AC (65000–100000 копій), повторюваність GA при цьому становить до 5000 копій на гаплотидний набір хромосом *Sus scrofa* [22, 23]. Виходячи з хімічних властивостей будови нуклеотидів пуринової та піримідинової груп, можна передбачити більшу частоту мутаційних подій у пуриннасичених ділянках ДНК. Крім цього дослідження інших авторів довели, що для вивчення поліморфізму окремих локусів ДНК і розрахунку рівня гетерозиготності особин найбільш придатними виявилися зонди з високим вмістом азотистих основ

групи пуринів – А + G [17,18] або пурин-піримідинових сполук А + С [18, 24].

У ході роботи за індивідуального генотипування тварин миргородської породи за двома маркерними системами – S1 і S2 – сумарно був отриманий спектр із 23 ампліконів, гетерозиготність окремих особин коливалася в межах 0,038–0,680, а індекси генетичної схожості між ними сягали 0,17–0,58. При зіставленні результатів оцінки генетичної схожості з параметрами інбридингу за Райтом і Шапоружем на основі даних племінного обліку знайдено значні розходження між цими показниками. Даний факт може пояснюватися тим, що оцінка генетичної схожості тварин може бути об'єктивною лише після підтвердження їхнього походження методом STR (локусспецифічні мікросателітні маркери) або імуногенетичного типування, оскільки відсоток помилок у записах племінного обліку в зв'язку з недоліками системи мічення тварин дещо значний.

У результаті генетичного типування кнурів і свиноматок миргородської породи, що належали різним господарствам, за локусами ISSR S1, S2 було встановлено низький рівень генетичної гетерогенності: гетерозиготність поголів'я кнурів і свиноматок племзаводу "Мрія-1" була на рівні 0,29–0,28, тоді як фактична гетерозиготність груп за ознаками статі племзаводу ім. Декабристів дорівнювала 0,35. Оскільки племзавод "Мрія-1" є дочірнім господарством, дещо занижені показники гетерозиготності тварин у ньому є характеристикою малочисельної популяції, що не набула стану генетичної рівноваги і підлягає жорсткому селективному тиску та інбридингу. Показник гетерозиготності для поголів'я кнурів і свиноматок племзаводу ім. Декабристів був однаковим, але дещо вищим, ніж у дочірній популяції. Очевидно, що поголів'я кнурів-плідників недостатньо генетично консолідоване, а однаковий рівень гетерозиготності для обох статевих груп є свідченням невіправданого кросування генеалогічних структур, яке проводиться для запобігання негативним ефектам інбридингу, але водночас створює несприятливі умови для селекціонера при роботі з цим стадом. Справедливість таких висновків підтверджується в результатах підрахунку внутрішньогрупових індексів схожості: в господарстві "Мрія-1" схожість кнурів (0,74) і свиноматок (0,76)

була дещо вищою, ніж в іншому стаді (0,73; 0,75 відповідно). Генетична подібність між свиноматками і кнурами різних господарств на рівні 0,70 (свиноматки п/з ім. Декабристів, кнури "Мрія-1") та 0,69 (реципрокний варіант) також створює проблему для обміну племінним матеріалом. Побудована нами дендрограма філогенетичних відносин між кнурами і свиноматками різних господарств методом UPGMA дала змогу отримати два окремих підкластери, в які ввійшли тварини, що належали одній популяції. Це є ще одним додатковим свідченням можливості використання ISSR для оцінки генетичних процесів у популяціях сільськогосподарських тварин.

Використання ISSR-маркірування для вирішення деяких селекційних питань, на нашу думку, вважається перспективним, оскільки за ступенем поліморфізму кожна з описаних у цій роботі систем перевищує імуногенетичні (так, наприклад, ISSR S1, S2 сумарно характеризують 19 локусів генома).

Не зважаючи на безсумнівні переваги, оцінка індивідуального ISSR-типування є доволі суб'єктивною. З методичної точки зору, з метою усунення помилок при генотипуванні аналіз повинен проводитися обов'язково в трьох повторях, виділення ДНК бажано проводити сольовим або фенолхлороформним методом, що дасть можливість отримати цілісний генетичний матеріал високого ступеня очищення (сорбентні експрес-методи, як свідчить досвід, є малоприсадними внаслідок "розривів" ДНК за довготривалого збереження та багатократного заморожування-відтаювання). Концентрація ДНК досліджуваних тварин має бути виміряна спектрофотометрично і в різних пробах приведена до єдиного показника. Агароза для проведення досліджень повинна характеризуватися високими показниками роздільної здатності. Дуже важливим є використання стандартного маркера молекулярної маси і повторна ампліфікація з наступним електрофорезом проби, яку було ідентифіковано на попередньому гелі, оскільки обладнання, що є в наявності у нашій (або подібній за рівнем) лабораторії, дає змогу на одній електрофореграмі протипувати не більше 9 особин. З урахуванням відсутності спеціальної відеосистеми візуалізації гелів недопущення помилок за індивідуального генотипування тварин залишається відкритим питанням.

Існує методичний підхід, який дає можливість високоефективно проводити генетичну паспортизацію порід та внутрішньопородних груп тварин. Кількість похибок, затрат часу і праці на проведення досліджень при цьому зводиться до мінімуму. Це так званий метод групового ISSR-тестування, заснований на використанні пропорційних ДНК-сумішей з урахуванням репрезентативності вибірки. Спектр отриманих ампліконів є своєрідним "паспортом" групи і містить "мажоритарні фрагменти", найбільш характерні для досліджуваної вибірки, що стабільно відтворюються при повторних ампліфікаціях [17].

Використання набору вищезазначених трьох ISSR-систем дало змогу отримати генетико-популяційні характеристики 9 порід свиней – велика біла англійської селекції (ВБА), внутрішньопородні типи великої білої породи УВБ-1, УВБ-2, мейшан, п'єтрен, полтавська м'ясна, миргородська, червонопояса спеціалізована м'ясна лінія (ЧПСЛ), уссекс-седлбекська (УС) – і оцінити ступінь їхньої генетичної диференціації під впливом різних екологічних, адаптивних та селекційних факторів. Найбільш низький рівень гетерозиготності зафіксовано у тварин ВБА (0,2320), порівняно високий – у мейшан (0,4363). Розрахунок рівня генетичної схожості продемонстрував, що найбільш подібними в генетичному відношенні є ПМ і УВБ-2 (батьківський тип), ( $I=0,623$ ), а різними – уссекс-седлбекська і миргородська ( $I=0,350$ ).

Проведення кластерного аналізу на основі генетичних дистанцій дало змогу наочно оцінити диференціацію порівнюваних порід. Тварини місцевої селекції увійшли в окремий кластер, а породи мейшан, п'єтрен і ЧПСЛ відокремилися у вигляді підкластерних гілок. Значну зацікавленість викликає підкластер, сформований породами ПМ, М і УВБ-2, оскільки за даними імуногенетичного аналізу було отримано ідентичну конфігурацію підкластера, що повністю відповідає історії створення й еволюції цих тварин у процесі відбору [25].

Таким чином, методологія ISSR-PCR-типування свиней, не зважаючи на всю очевидну перспективність, потребує дальших поглиблених досліджень, а саме характеру успадкування

ампліконів (алелів, сумарних електроморф), розщеплення в ряді поколінь (якщо не приділяти уваги апіорі твердженню про їхній менделівський характер), функцій і хромосомної локалізації. На деякі з цих питань можна знайти відповідь шляхом елюювання з наступним секвенуванням у поліакриламідних гелях окремих, маркерних для порід, смуг. У разі встановлення зв'язку певних ISSR-ампліконів з показниками продуктивності тварин не виключена можливість створення специфічних QTL-маркерів шляхом прицільного підбору праймерів і рестриктаз до виявлених послідовностей генома.

1. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers systems* / J. Williams, A. Kubelik, K. Livak et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – N 18. – P. 6231–6235.

2. *Tautz D. Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers* // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – V. 17, N 16. – P. 6463–6471.

3. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting* / P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – N 23. – P. 4407–4414.

4. *Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories* / C. Jones, K. Edwards, S. Castaglione et al. // *Mol Breed.* – 1997. – N 3. – P. 381–390.

5. *Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (Oryza sativa) germplasm* / P. Virk, J. Zhu, H. Newbury et al. // *Euphytica.* – 2000. – N 112. – P. 275–284.

6. *Molecular Tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies* / A. Karp, S. Kresovich, K. Bhat et al. // *IPGRI technical bulletin.* – 1997. – N 2. – International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

7. *Zietkiewicz, Rafalski A., Labuda D. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification* // *Genomics.* – 1994. – V. 20. – P. 176–183.

8. *Tsumura Y., Ohba K., Strauss S. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii) and sugi (Cryptomeria Japonica)* // *Theor. Appl. Genet.* – 1996. – N 92. – P. 40–45.

9. *Тихонов В.М. Иммуногенетика и биохимический полиморфизм домашних и диких свиней.* – Новосибирск: Наука, 1991. – 300 с.

10. *Claude R., Serge A. Pommier., Haude A.* Rapid DNA purification for Hal gene PCR diagnosis in porcine tissues and extension to other meat species // *Meat Science.* – 1997. – V. 45, N 1. – P. 17–22.

11. *Соколов Б.П., Джемелинский В.В.* Выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК с использованием ацетата калия // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* – 1989. – № 6. – С. 45–46.

12. *Генетические* взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR-маркеров / В.И. Глазко, А.В. Дубин, Р.Н. Календарь и др. // *Цитология и генетика.* – 1999. – Т. 33, № 5. – С. 47–51.

13. *Глазко В.И., Глазко Г.В.* Введение в ДНК технологии и биоинформатику / Под ред. Т.Т. Глазко. – К.: Нора-друк, 2001. – 544 с.

14. *Брик А.Ф., Сиволап Ю.М.* Молекулярно-генетический полиморфизм сои, детектированный ПП ПЦР, SSRP и ISSR // *Цитология и генетика.* – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 3–9.

15. *Березовская О.П., Мороз О.Ю., Сидоренко А.П.* Внутри- и межвидовые различия в ISSR-PCR характеристике шмелей (HYMENOPTERA: BOMBINAE) // *Цитология и генетика.* – 2002. – 36, № 3. – С. 28–35.

16. *Nagaraju J., Goldsmith M.R.* Silkworm genomics – progress and prospects // *Current Science.* – 2002. – V. 83, N 4. – P. 2–15.

17. *Appukttan R. Pradeep, Shankar N. Chatterjee, Chirakkara V.Nair.* Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems // *J. Appl Genet.* – 2005. – V. 46, N 3. – P. 291–298.

18. *Abot P.* Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple sequence Repeats (ISSRs) // *Journal of Insect Science.* – 2001. – V.1, N 8. – P. 15–18.

19. *Гут Р.Т., Радченко М.В., Криницький Г.Т.* Використання ISSR-маркерів для встановлення конвергентних еволюційних зв'язків роду *Fagus* // *Цитология и генетика.* – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 60–65.

20. *Доменюк В.П., Белоусов А.О., Сиволап Ю.М.* Ефективність добору за ДНК-маркерами локусів кількісних ознак в популяціях кукурудзи // *Цитология и генетика.* – 2004. – Т. 38, № 1. – С. 44–48.

21. *Рогозин Н.Б., Соловьев В.В., Колчанов Н.А.* Контекстная предтерминированность мутационного процесса (соматические, спонтанные, индуцированные точковые мутации). – Новосибирск, 1988. – 70 с.

22. *Wintero A.K., Fredholm M., Thomsen P.D.* Variable (dG-dT) n – (dC-dA) n sequences in the porcine genome // *Genomics.* – 1992. – V. 12. – P. 281–288.

23. *Johansson M., Ellegren H., Andersson L.* Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites // *J. Hered.* – 1992. – V. 83. – P. 196–198.

24. *Тряпицина Н.В., Глазко В.И.* Полиморфизм фрагментов ДНК, фланкированных микросателлитными локусами (ISSR-PCR) у воспроизводящегося в условиях низкодозового ионизирующего облучения крупного рогатого скота // *Цитология и генетика.* – 2005. – Т. 39, № 5. – С. 41–51.

25. *Метлицька О.І.* Застосування молекулярно-генетичних маркерів різних класів при визначенні внутрішньо- та міжпородної мінливості свиней: Дис. ... канд. с.-г. наук: 03.00.15 / Інститут розведення і генетики тварин. – Чубинське, 2001. – 150 с.

#### **МЕТОДИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ISSR-PCR МАРКИРОВАНИЯ ВНУТРИ- И МЕЖПОРОДНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ СВИНЕЙ.** Метлицкая О.И.

*Молекулярно-генетические маркеры, которые основываются на технологии ПЦР, являются наиболее удобным методологическим подходом в решении вопросов исследования изменчивости в популяциях эукариот. Акцентируются важнейшие методические аспекты эффективного типирования животных на основе полилокусных систем ISSR, базирующихся на амплификации участков, заключенных между инвертированными последовательностями микросателлитов. Продемонстрированы возможности использования ISSR-маркирования для оценки внутри- и межпородной изменчивости, решения стратегических вопросов селекции и сохранения малочисленных популяций свиней, изучения генетических процессов породной дивергенции.*

**ПЦР-амплификация, ISSR-маркирование, популяция, изменчивость, генетическое сходство, локус, ампликон**

#### **METHODIC AND PECULIARITIES OF USING ISSR-PCR MARKING OF INTRA- AND INTERBREED VARIABILITY IN PIG.** Metlytska O.I.

*Molecular and genetic markers basing on PCR technology are the most convenient methodological approach to solving problems of research on eukaryotes population variation. The most important methodical aspects of effective animal typing on the basis of polylocus ISSR systems grounded upon amplification of zones contained among inverted microsatellite sequences have been accentuated.*

*ed. Possibilities of using ISSR-marking for intra- and interbreed variation estimation for resolving strategic questions of selection and scanty pig population preservice as well as for studying genetic processes of breeding divergence were demonstrated.*

**PCR-amplifikaciya, ISSR-marketing, population, changeability, genetic likeness, lokus, amplikon**

**УДК 577.21:575.113:636.2**

**Н.Б. МОХНАЧОВА**

*Институт розведення і генетики тварин УААН*

## **ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

*Висвітлено результати застосування мікросателітних локусів при дослідженні генотипу великої рогатої худоби.*

**ДНК-технології, мікросателіти, генетичні маркери, поліморфний локус, ПЛР, ампліфікація, праймер**

На сучасному етапі реорганізації тваринництва ДНК-технології стають одним з ключових факторів, які повинні забезпечувати не тільки реалізацію комплексу завдань у системі збереження генетичного різноманіття структури порід і виявлення генетичного потенціалу тварин щодо показників продуктивності, а й генотипування та підтвердження походження племінних тварин.

Унаслідок високого рівня поліморфізму при дослідженні генома та генотипування тварин широко застосовуються поліморфні локуси, значна частина яких представлена тандемними повтора-

ми. Цей клас поліморфних локусів складається з міні-сателітів (VNTRs) та мікросателітів (STRs), які виступають у ролі генетичних маркерів відповідного генетичного матеріалу [1].

Алельний поліморфізм мікросателітів і міні-сателітів у першу чергу ґрунтується на різниці чисел тандемних повторів, що містяться в різних алелях, тобто на поліморфізмі "довжини". Число тандемних повторів у конкретному алелі може змінюватись від одного до декількох десятків. Зазвичай у популяції виявляється спектр алелів, що відрізняються один від одного за кількістю повторюваних одиниць, а у кожної тварини є строго по 2 алелі кожного поліморфного локусу рівної (гомозиготний генотип) або різної (гетерозиготний генотип) довжини. Таким чином, алельний поліморфізм міні-сателітів і мікросателітів може бути ефективно використаний для ідентифікації тварин, оскільки профіль генотипів за декількома поліморфними локусами є унікальним для кожної тварини (виключаючи однайцевих близнюків).

Відповідно до International Society of Animal Genetics- ISAG/FAO 2004 визначено дев'ять мікросателітів як стандарт при генотипуванні та підтвердженні походження тварин великої рогатої худоби, а саме: ETH10, ETH225, BM 1824, BM2113, INRA 023, SPS 115, TGLA 122, TGLA 126, TGLA 227 [7].

Генотипування великої рогатої худоби за мікросателітними локусами розпочали проводити з початку 90-х років. Результати цих робіт на даний час дають змогу ідентифікувати тварин за генотипами. Мікросателітний локус ETH10 (D5S3) розташований на 5-й хромосомі і має розміри 207–231 п.н. При дослідженні цього локусу у польської червоної худоби було виявлено 8 алелів, у німецьких сименталів – 4, у шведських сименталів – 3, у голштинів – 7, у польської чорно-рябої – 7, у польської червоно-рябої – 7, у п'яти аборигенних порід Китаю – 36 [2–6].

ETH 225 (D9S1) визначений на 9-й хромосомі і має розміри 131–159 п.н. Ряд авторів відмічають, що при роботі з ETH 225 у польської червоної худоби виявлено 8 алелів, у німецьких сименталів – 7, у шведських сименталів – 6, у голштинів – 7, у польської чорно-рябої – 6, у польської червоно-рябої – 6, у п'яти аборигенних порід Китаю – 34 [2–6].

© Н.Б. Мохначова, 2008

Розведення і генетика тварин. 2008. Вип. 42.