

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА УКРАЇНСЬКОЇ ГІРСЬКОКАРПАТСЬКОЇ ПОРОДИ ОВЕЦЬ ЗА ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ

Т. В. ЧОКАН, А. РАДКО¹, С. І. ТАРАСЮК², А. ШУМЕЦЬ¹, Д. РУБІС¹

Інститут біології тварин НААН (Львів, Україна)

tchokan@ukr.net

¹*Інститут зоотехніки (Краків, Польща)*

anna.radko@izoo.krakow.pl

²*Інститут рибного господарства НААН (Київ, Україна)*

tarasjuk@ukr.net

Наведені результати досліджень генетичної структури української гірськокарпатської породи овець на основі поліморфізму 11 мікросателітних (STR) маркерів. Виявлено специфічні особливості структури генофонду. Проведений аналіз показав значну генетичну мінливість досліджуваних мікросателітних локусів. Сумарно ідентифіковано 106 алелів, які були використані для визначення поліморфізму обговорюваних маркерів. Найвищим поліморфізмом характеризувалися локуси Oar 11, INRA063 і SPS113, які мали понад 9 алелів, при цьому значення індексу поліморфізму (PIC) і фактичної гетерозиготності (Ho) перевищувало 0,80. Найнижчий поліморфізм був встановлений для локусу Oar304 при наявності 9 алелів значення PIC і Ho були 0,53 і 0,47 відповідно. Середнє значення коефіцієнту інбридингу мало низьке від'ємне значення (0,070), що свідчить про майже відсутній інбридинг у досліджуваній породі.

Ключові слова: генетична структура, вівці, мікросателітні локуси, поліморфізм, генотип, алель

GENETIC STRUCTURE OF UKRAINIAN MOUNTAIN CARPATHIAN SHEEP BY USE OF MICROSATELLITE LOCI

T. Chokan, A. Radko¹, S. Tarasjuk², A. Szumiec¹, D. Rubiś¹

Institute of Animal Biology of NAAS, (Lviv, Ukraine)

¹*National Research Institute of Animal Production (Krakow, Poland)*

²*Institute of Fisheries of NAAS (Kyiv, Ukraine)*

The study results of Ukrainian Mountain Carpathian sheep genetic structure, based on polymorphism of 11 microsatellite (STR) markers are shown. The specific features of the structure of the gene pool were revealed. The analysis showed a significant genetic variability of the studied microsatellite loci. Totally 106 alleles were identified that were used to determine polymorphism of the discussed markers. The highest polymorphism of loci characterized Oar 11, INRA063 and SPS113 which had more than 9 alleles, while the index of polymorphism (PIC) and actual heterozygosity (Ho) exceeded 0.80. The lowest polymorphism of loci was set for Oar304 and at the presence of 9 allele, values of PIC and Ho were 0,53 and 0,47 respectively. Average inbreeding coefficient had low negative value (0,070), indicating almost absent inbreeding within the studied breed.

Keywords: genetic structure, sheep, microsatellite loci, polymorphism, genotype, allele

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА УКРАИНСКОЙ ГОРНОКАРПАТСКОЙ ПОРОДЫ ОВЕЦ ЗА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

Т. В. Чокан, А. Радко¹, С. И. Тарасюк², А. Шумец¹, Д. Рубис¹

Інститут біології тварин НААН (Львів, Україна)

¹ Інститут животноводства (Краков, Польща)

² Інститут рибного господарства НААН (Київ, Україна)

Изложены результаты исследований генетической структуры украинской горнокарпатской породы овец, на основе полиморфизма 11 микросателлитных (STR) маркеров. Выявлены специфические особенности структуры генофонда. Проведенный анализ показал значительную генетическую изменчивость исследуемых микросателлитных локусов. Суммарно идентифицировано 106 аллелей, которые были использованы для определения полиморфизма обсуждаемых маркеров. Высоким полиморфизмом характеризовались локусы Oar 11 INRA063 и SPS113 которые имели более 9 аллелей, при этом значение индекса полиморфизма (PIC) и фактической гетерозиготности (Ho) превышало 0,80. Самый низкий полиморфизм был установлен для локуса Oar304 при наличии 9 аллелей значение PIC и Ho были 0,53 и 0,47 соответственно. Среднее значение коэффициента инбридинга мало низкое отрицательное значение (0,070), что свидетельствует о почти отсутствии инбридинга в исследуемой породе.

Ключевые слова: генетическая структура, овцы, микросателлитные локусы, полиморфизм, генотип, аллель

Вступ. В сучасних умовах господарювання проблеми вівчарства висувують необхідність проведення фундаментальних досліджень в напрямку вдосконалення існуючих порід, порідних груп і типів високопродуктивних овець, спроможних конкурувати з іншими галузями тваринництва. Успіх у цій справі визначається організацією селекційно-генетичної роботи у вівчарстві із застосуванням прогресивних ресурсозберігаючих технологій ведення галузі, які забезпечують повне і всебічне використання біологічних можливостей тварин [2, 4].

В Україні шляхом тривалого відтворювального схрещування місцевих грубововняних маток типу цакель з баранами цигайської породи була виведена українська гірськокарпатська порода овець. Це тварини комбінованого вовново-молочно-м'ясо-овчинного напрямку продуктивності середньої величини, міцної конституції, пропорційної будови тіла добре пристосовані до специфічних умов вологого гірського клімату і перехідно-пасовищного утримання. Розводиться порода на території передгірських та гірських районів Закарпатської, Івано-Франківської, Львівської та Чернівецької областей [4].

Генетична оцінка тварин стала значно ефективнішою в результаті відкриття сімейств повторюваних послідовностей, дислокованих по всьому геному (мінісателітів і микросателітів). Найбільш інформативними виявилися маркери, що належать до фракції геномної ДНК – микросателіти (STR), що демонструють надзвичайно високий рівень поліморфізму. Микросателітні локуси з великою частотою зустрічаються в геномі і досить рівномірно розподілені по довжині геному. В основі їх поліморфізму лежать відмінності в числі повторюваних одиниць. Вони є нейтральними маркерами, це робить можливим їх використання для оцінки генетичної різноманітності популяцій. Вони так само підходять для проведення тесту на достовірність походження потомства, дають теоретичну можливість визначити терміни проходження «пляшкової шийки» в популяції, генетичної кластеризації порід. Микросателіти наслідують з покоління в покоління і мають відносно високу швидкість мутацій, що дає змогу використовувати їх для оцінки дивергенції і встановлення еволюційно-генетичних зв'язків між популяціями. Породи і популяції овець різняться за кількістю алельних варіантів і рівню гетерозиготності вивчених микросателітних локусів [1, 3].

З метою вивчення поліморфізму микросателітних локусів та молекулярно-генетичної оцінки української гірськокарпатської породи овець нами проведені дослідження за використання молекулярно-генетичних маркерів – микросателітних послідовностей ДНК, рекомендованих ФАО для оцінки біорізноманіття овець [5].

Матеріали та методи досліджень. Матеріал відібраний від різновікових груп овець обох статей у г-вах СФГ «Банський» с. Луг, Рахівського р-ну – гірська зона, та СФГ

«Салдобош» с. Стеблівка Хустського району Закарпатської області – низинна зона в кількості 49 голів.

Генетичний аналіз груп овець за використання ДНК-маркерів проводили, виходячи зі списку, рекомендованого Міжнародною організацією генетики тварин (ISAG), для оцінки біорізноманіття овець за використання різних флуоресцентних барвників для мічення фрагментів. З огляду на критерії і рекомендації ISAG були обрані 11 мікросателітних локусів: Oar304, HSC, Oar129, MAF214, Oar11, INRA063, CSRD247, SPS113, D5S2, MAF65, McM527 [5].

Геномну ДНК виділяли з лейкоцитів за використанням комерційного набору для виділення ДНК (Wizard® Genomic DNA Purification Kit from Promega). Для ампліфікації ДНК були використані послідовності 11 мікросателітних локусів. Послідовності праймерів для ампліфікації фрагментів ДНК аналізованих локусів були отримані з комп'ютерної бази даних онлайн [10]. Мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили відповідно до рекомендацій протоколу виробника. Реакцію ПЛР проводили на генетичному аналізаторі ABI GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США) за наступними температурними режимами: початкова денатурація – 3 хв. при 98°C; 30 циклів: денатурація 15 сек. при 98° С, відпал при 58°C протягом 75 сек, синтез 30 сек. при при 72° С; термінальна елонгація – 5 хв. при 72° С.

Отримані ПЛР-продукти аналізували за використання капілярного секвенатора ABI 3130xl (Life Technology). Фрагменти ДНК різної довжини розділяли електрофорезом в 7% поліакриламідному гелі, за використання стандарту 500 LIZ і еталонного зразка. Результати електрофоретичного розділення аналізували автоматично за допомогою програмного забезпечення GeneMapper.

Популяційно-генетичну обробку результатів здійснювали за використання комп'ютерних програм Cervus 3.0.3 та PowerStatsV12, Excel 2010. На підставі частот конкретних алелів мікросателітних послідовностей за використання математично-статистичних програм були розраховані індекси очікуваної (He) та наявної гетерозиготності (Ho), ступінь гетерозиготності – H [8], коефіцієнт інбридингу – FIS [9], індекс поліморфізму мікросателітних локусів – PIC [7] на основі результатів досліджень всіх 11 мікросателітних локусів.

Результати та обговорення. Мікросателіти (STR), в більшості випадків, характеризуються видовим консерватизмом, однак існує ряд маркерів, специфічних для кількох близькоспоріднених видів. Такі маркери незамінні при оцінці генофонду. Вони характеризуються високою варіабельністю, кодомінантним характером успадкування, високим ступенем поліморфізму, відомою локалізацією в геномі. Це дає можливість використовувати їх для внутрішньо- та міжпородної диференціації порід, вивчення генетичної різноманітності [6].

Проведений нами аналіз показав значні генетичні відмінності за використання мікросателітних маркерів у овець гірськокарпатської породи. Нами виявлено в цілому 106 алелів, кількість яких коливалася від 6 (локус D5S2) до 13 (локус INRA63). Виявлені алелі були використані для визначення поліморфізму маркерів. На підставі розрахунку частот алелів, які зазначені в табл. 1, розраховано значення гетерозиготності (H), індекс поліморфізму зазначених мікросателітних локусів (PIC) та коефіцієнт інбридингу (F_{IS}) (табл. 1). Отримані результати показали, що маркери мають високий ступінь поліморфізму. Індекс поліморфізму зазначених мікросателітних локусів (PIC) у середньому становив 0,740 і коливався від 0,53 (локус Oar304) до 0,84 (локус HSC). В наших дослідженнях найвищий поліморфізм був характерний для локусу INRA063, який нараховував 13 алелів, з індексом поліморфізму мікросателітних локусів (PIC) 0,838 і значенням теоретично очікуваної гетеризиготності (H_o), який становив 0,86.

1. Частоти зустрічальності визначених алелів у овець української гірськокарпатської породи за дослідженими 11-ти мікросателітними локусами ДНК (n=49)

Маркер	Алель	Частота	Маркер	Алель	Частота	Маркер	Алель	Частота	
Oar304	148	0,0204	MAF214	183	0,0306	CSRD247	209	0,0102	
	162	0,0102		187	0,1020		213	0,3265	
	164	0,2857		189	0,4388		223	0,1735	
	166	0,0204		191	0,2347		225	0,0510	
	170	0,5714		223	0,0510		227	0,1939	
	174	0,0204		225	0,0510		229	0,1020	
	176	0,0306		229	0,0102		231	0,0408	
	178	0,0102		255	0,0102		233	0,0306	
	186	0,0306		257	0,0102		235	0,0102	
	HSC	263		0,1429	INRA063		259	0,0204	D5S2
267		0,0816	263	0,0204		253	0,0102		
269		0,1122	265	0,0204		257	0,0306		
271		0,1531	167	0,0408		259	0,0102		
273		0,1531	169	0,1939		186	0,3265		
275		0,2245	171	0,0306		188	0,0408		
277		0,0408	173	0,0306		190	0,3469		
279		0,0102	175	0,2755		192	0,2245		
287		0,0408	177	0,0612		198	0,0510		
291		0,0102	179	0,1020		200	0,0102		
Oar129	295	0,0306	SPS113	181	0,0612	McM527	123	0,0204	
	135	0,3163		183	0,0510		125	0,2959	
	137	0,0204		195	0,0102		127	0,2959	
	14	0,0102		199	0,0306		129	0,2449	
	145	0,3571		201	0,0918		131	0,0204	
	147	0,2551		203	0,0204		133	0,0510	
	165	0,0408		126	0,03061		135	0,0510	
	Oar11	120		0,1531	134		0,23469	137	0,0204
		122		0,1224	136		0,03061	162	0,0510
		124		0,1837	138		0,08163	164	0,1531
126		0,0408	140	0,02041	166	0,2653			
128		0,0408	142	0,38776	168	0,0918			
132		0,1531	144	0,12245	170	0,2449			
134		0,2653	146	0,01020	172	0,0612			
136		0,0306	152	0,05102	174	0,0408			
140		0,0102	154	0,03061	176	0,0714			
					178	0,0204			

Висока мінливість також була виявлена для локусів HSC, Oar11 і SPS113, де було ідентифіковано більше 9-ти алелів, а значення PIC і H_o варіювали від 0,74 і 0,84 (SPS113) до 0,89 і 0,81 (Oar11). Найнижчий поліморфізм був відзначений для локусу Oar304, де було виявлено 9 алельних варіантів, але два з них (164 і 170 пар основ), мали значно вищу частоту 0,28 і 0,57. Значення PIC і H_o для цього локусу були 0,53 і 0,47, відповідно (табл. 2).

Інші маркери характеризувались подібним поліморфізмом, з числом алелів в діапазоні 6–13, індексом поліморфізму та значенням гетерозиготності в діапазоні від 0,66 і 0,61 (локус Oar129) до 0,72 і 0,70 (локус MAF65) відповідно.

2. Показники генетичної мінливості у овець української гірськокарпатської породи за використання 11 мікросателітних локусів ДНК (n=49)

Локус	Кількість алелів на локус	Межі спектру ампіконів, (п.о.)	PIС ¹	Н _о ²	Н _Е ²	F _{IS} ³
Oar304	9	148-186	0,5325	0,4694	0,5885	0,2024
HSC	11	263-295	0,8429	0,7959	0,8586	0,0730
Oar129	6	135-165	0,6574	0,6122	0,7114	0,1393
MAF214	12	183-265	0,7039	0,7143	0,7343	0,0272
Oar11	9	120-140	0,8081	0,8980	0,8297	-0,0823
INRA063	13	167-203	0,8382	0,8571	0,8526	-0,0054
CSRД247	13	209-259	0,7858	0,6531	0,8086	0,1924
SPS113	10	126-154	0,7386	0,8367	0,7670	-0,0910
D5S2	6	186-200	0,6673	0,6939	0,7182	0,0339
MAF65	8	123-137	0,7190	0,6939	0,7584	0,0851
McM527	9	162-178	0,8026	0,7755	0,8242	0,0591
Середнє	9,64	120-295	0,740	0,730	0,770	0,0700

Примітка. ¹PIС – індекс поліморфізму мікросателітних локусів; ²Н – індекси теоретично очікуваної (Н_Е) та наявної гетерозиготності(Н_о); ³ F_{IS} – коефіцієнт інбридингу.

Показники очікуваної гетерозиготності використовували для обчислення коефіцієнту інбридингу (F_{IS}), що виражає ступінь інбридингу в популяції. Розрахункові значення очікуваної (Н_Е) гетерозиготності були в цілому нижче значень наявної (Н_о). Нижчий рівень фактичної гетерозиготності порівняно з очікуваною може свідчити про те, що дана популяція виявляє тенденцію до консолідації. Середнє значення коефіцієнта інбридингу (F_{IS}) становило 0,0700, що говорить про відсутність інбридингу у породі (табл. 2). Найбільша невідповідність між очікуваною гетерозиготністю (Н_о) та наявною (Н_Е) гетерозиготністю свідчить про її дефіцит, який був характерний для популяції гірськокарпатських овець за використання мікросателітних локусів Oar304 і CSRД247, де коефіцієнт інбридингу (F_{IS}) дорівнював 0,202 і 0,192 відповідно. Фактичне збільшення рівня гомозиготності за цим локусом може бути пов'язано з багатьма факторами, в тому числі відбором особин з конкретними продуктивними ознаками, а також можливістю появи нульових алелів, але це припущення потребує проведення низки більш широких досліджень.

Висновки. Таким чином, за використання мікросателітних локусів отримано інформацію про генетичну структуру української гірськокарпатської породи овець і її розмаїття на геномному рівні. Проведені дослідження засвідчили ефективність використання обраних 11 мікросателітних локусів для індивідуальної ідентифікації та популяційно-генетичного аналізу. Усі досліджувані локуси виявилися поліморфними і сумарно налічували 106 алелів. Найвищим поліморфізмом характеризувалися локуси Oar 11, INRA063 і SPS113, які мали понад 9 алелів, при цьому значення індексу поліморфізму і фактичної гетерозиготності перевищувало 0,80. Найнижчий поліморфізм був встановлений для локусу Oar304 при наявності 9 алелів значення PIС і Н_о були 0,53 і 0,47 відповідно. Середнє значення коефіцієнта інбридингу мало низьке від'ємне значення (0,070), що свідчить про майже відсутній інбридинг у досліджуваній породі.

Отримана інформація при відповідній її оцінці разом з класичними методами селекційно-плеїмної роботи дає можливість контролювати генетичну структуру безпосередньо за ДНК-маркерами, а також створювати групи тварин шляхом цілеспрямованого генетичного добору за відповідними господарськими характеристиками.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Алтухов, Ю. П. Генетические процессы в популяциях / Ю. П. Алтухов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. – 431 с.
2. Методичні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин / М. В. Зубець, В. П. Буркат, Ю. Ф. Мельник та ін. ; наук. ред. І. В. Гузев. – К. : Аграрна наука, 2007. – 120 с.

3. Тарасюк, С. І. Молекулярно-генетичні дослідження в рибництві / С. І. Тарасюк, І. І. Грициняк. – К. : Аграрна наука, 2013. – 310 с.
4. Чокан, Т. В. Стан і перспективи розвитку гірськокарпатського вівчарства: / Т. В. Чокан, П. В. Стапай, В. В. Гавриляк // НТБ ІБТ та ДНДКІ вет. препаратів та кормових добавок. – 2009. – Вип. 10, № 1–2. – С. 437–444.
5. Applied Genetics in Sheep and Goats Workshop. In: 32th International Conference on Animal Genetics. Available at. (www.isag.us/Docs/Applied_Genetics_Sheep_Goats_CT.pdf. ISAG, Edinburgh. Accessed April, 2011).
6. Beckman, J. S. Molecular marker in the genetic improvement of farm animals / J. S. Beckman, M. Soller // *Biotegnology*. – 1987. – V. 5. – P. 573–576.
7. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism / D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick, R. W. Davis // *Am. J. Hum. Genet.* – 1980. – 32. – P. 314–331
8. Nei, M. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance / M. Nei, A. K. Roychoudhury // *Genetics*. – 1974. – 76. – P. 379–390
9. Wright, S. Evolution and the Genetics of Populations / S. Wright // University of Chicago Press. – Chicago, 1978. – Vol. 4. – P. 314–331
10. <http://www.projects.roslin.ac.uk/sheepmap>

REFERENCES

1. Altukhov, Yu. P. 2003 *Henetycheskye protsessy v populyatsyyakh – Genetic processes in populations*. YKTs Akademknyha. 431 (in Russian).
2. Zubets', M. V., V. P. Burkat, and Yu. F. Mel'nyk. 2007. *Metodychni aspekty zberezhennya henofondu sil's'kohospodars'kykh tvaryn – Methodological aspects preserve the gene pool of farm animals*. Ahrarna nauka. 120 (in Ukrainian).
3. Tarasyuk, S. I., and I. I. Hrytsynyak. 2013. *Molekulyarno-henetychni doslidzhennya v rybnytstvi – Molecular genetic studies in fish culture*. Ahrarna nauka. 310 (in Ukrainian).
4. Chokan, T. V., P. V. Stapay, and V. V. Havrylyak. 2009. *Stan i perspektyvy rozvytku hirs'kokarpat's'koho vivcharstva – The modern state and prospects of Mountain Carpathian sheep breeding development*. NTB IBT ta DNDKI vet. preparativ ta kormovykh dobavok. 437–444 (in Ukrainian).
5. Applied Genetics in Sheep and Goats Workshop. 2011. In: *32th International Conference on Animal Genetics*. Available at. (www.isag.us/Docs/Applied_Genetics_Sheep_Goats_CT.pdf. ISAG, Edinburgh. Accessed April).
6. Beckman, J. S., and M. Soller. 1987. Molecular marker in the genetic improvement of farm animals. *Biotegnology*. 5:573–576.
7. Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314–331.
8. Nei, M., and A. K. Roychoudhury. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*. 76:379–390.
9. Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. *University of Chicago Press*. Chicago. 4:314–331
10. <http://www.projects.roslin.ac.uk/sheepmap>. – Заголовок з екрана. – Доступ вільний.

