

a PLIN gene in pigs of Mirgorod breed population and high frequency of alleles, which are associated with lowered obesity, define the possibility of this marker use in selection programs. Evaluation of the genetic situation in herds of Mirgorod pigs is an important foundation of evidence-based strategies to eliminate the negative effects of cross-breeding and rational management of the gene pool of the local Ukrainian breed.

Key words: mirgorod breed of pigs, ISSR-PCR, perilipin's gene polymorphism, identification markers of breed



УДК 636.2.082:575.113.1

АНАЛІЗ ДАНИХ СВІТОВОГО ГЕНЕТИЧНОГО БАНКУ: ОДНОНУКЛЕОТИДНІ ПОЛІМОРФІЗМИ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ГЕНОМУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ПОРІД ШАРОЛЕ ТА ЛІМУЗИН

Ю.В. ПОДОБА

*Інститут розведення і генетики тварин НААН (Чубинське, Україна)
yurpo@ukr.net*

*Проведено порівняльний аналіз послідовностей мітохондріального геному великої рогатої худоби порід шароле та лімузин (*Bos taurus*) із Світового генетичного банку. Аналіз доступних 29 сиквенсів мітохондріальної ДНК (мтДНК) породи шароле та 27 сиквенсів мтДНК породи лімузин дав можливість розподілити їх за приналежністю до європейської та африканської гаплогруп за походженням мітохондріального геному. Серед проаналізованих послідовностей гіперваріабельного району виявлено два ідентичні гаплотипи мтДНК у чотирьох тварин породи шароле та двох тварин породи лімузин, які за схожістю одновимірюваних замін у гіперваріабельному районі мтДНК, ймовірно, мають родинний зв'язок за материнською лінією.*

Ключові слова: *Bos taurus*, порода, шароле, лімузин, мтДНК, гаплогрупа, SNP

© Ю.В. Подоба, 2013

Розведення і генетика тварин. 2013. № 47

Введення. Реалізація програм збереження генофонду тварин передбачає розробку і застосування системи генетичного моніторингу, за допомогою якого відстежують межі внутріпопуляційних генних потоків [1, 2]. При збереженні генетичного різноманіття основне завдання полягає в тому, щоб не втратити специфічні генні комплекси, які зумовлюють фенотипічні породні та індивідуальні характеристики, пов'язані з екстер'єрними особливостями, продуктивністю, життєздатністю, резистентністю тварин [3].

Як об'єкт контролю при збереженні порід різних видів сільськогосподарських тварин виступає внутрішньо- і міжпородна генетична різноманітність, здійснюються оцінювання та прогнозування її динаміки, визначаються оптимум і межі допустимих змін. Генетичний поліморфізм структурних генів, полілокусних послідовностей ДНК, хромосомних і геномних мутацій характеризує генетичну структуру породи, що береться за основу при збереженні генофонду рідкісних та зникаючих порід [3].

В останні роки в пошуках поліморфних молекулярно-генетичних маркерів все ширше стала використовуватися мітохондріальна ДНК (мтДНК). Поліморфні варіанти мтДНК можуть бути основою для оцінювання ролі цитоплазматичного фактора у формуванні продуктивних характеристик. Гаплоїдність і материнський характер успадкування у поєднанні з наявністю високополіморфних ділянок надають унікальну можливість використання поліморфізму мтДНК для генетичної ідентифікації особин у рамках материнських родин на основі подібності гаплотипу будь-яких родичів за материнською лінією [4–6]. Індивідууми всередині виду, що походять від різних матерів, є генетично ізольованими один від одного щодо мтДНК, навіть у тому разі, коли вони є членами перехрещуваних популяцій [7].

Мітохондріальний геном великої рогатої худоби представлений кільцевою дволанцюговою ДНК розміром 16337–16341 п.н. У ссавців мітохондріальна ДНК (мтДНК) становить 1% сумарної ДНК і кодує дві субодиниці рибосомальної РНК, 22 транспортні РНК і до 30 мітохондріальних білків, переважно ферментів окисного фосфорилювання дихального циклу. МтДНК має некодуючу послідовність приблизно 910 п.н., так звану D-петлю (D-loop), яка розміщена між генами тРНК фенілаланіну та проліну і контролює реплікацію мтДНК [4, 15]. МтДНК має унікальні властивості: суворе успадкування за материнською лінією, високу швидкість накопичення мутацій і відсутність рекомбінацій, велику кількість копій молекул мтДНК у клітинах, що дає можливість використовувати дані про поліморфізм мтДНК для філогенетичного аналізу, дослідження з походження і підтвердження батьківства за материнською лінією, маркування породних і внутрішньопородних особливостей тварин [8].

Гіперваріабельний регіон D-петлі, який виконує регуляторні функції, є найбільш оптимальною ділянкою пошуку. Інтерес дослідників у сфері популяційної та еволюційної генетики до цього регіону мтДНК обумовлений, насамперед, високою швидкістю накопичення мутацій, унаслідок чого є можливість пошуку специфічних маркерів материнських ліній мтДНК для дослідження питань походження і диференціації популяцій тварин [4, 6–14].

Безперечний інтерес подібні дослідження представляють з огляду на те, що відомості про різноманітність порід великої рогатої худоби України за мтДНК в літературі відсутні. Тому метою даної роботи був аналіз послідовностей мітохондріального геному тварин шаролезької та лімузинської порід великої рогатої худоби різного географічного походження для подальшого порівняння з іншими породами, у тому числі українськими аборигенними породами.

Матеріали і методика досліджень. Секвеновані послідовності мітохондріальної ДНК великої рогатої худоби (*Bos taurus*) від 29 тварин породи шароле та 27 тварин породи лімузин було отримано у вільному доступі із Світового генетичного банку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genebank/>).

Локальне вирівнювання послідовностей мітохондріального геному для різних порід великої рогатої худоби проводили з використанням програми MEGA 4.0. Для виявлення нуклеотидних замін використали сиквенс мітохондріальної ДНК *Bos taurus* герефордської породи [15] як референтний (номер доступу V00645).

Результати досліджень та їхнє обговорення. Проведено вирівнювання та аналіз послідовностей мітохондріального геному для різних порід великої рогатої худоби (*Bos taurus*) із Світового генетичного банку. Найбільша кількість однонуклеотидних замін (переважно транзиції) спостерігається у гіперваріабельних районах некодуючої послідовності. В результаті вирівнювання доступних сиквенсів мтДНК різних порід великої рогатої худоби встановлено однонуклеотидні заміни (транзиції, транзакції, делеції), що характеризують належність мітохондріальної ДНК тварини до визначених гаплогруп, а також надають можливість за мтДНК провести диференціацію тварин у межах досліджених порід (рис. 1). Із представлених сиквенсів мтДНК дві тварини ангуської породи – AY676867 і AY676869 – мають ідентичну послідовність мтДНК, що може свідчити про їхній родинний зв'язок за материнською лінією. Решта проаналізованих тварин різних порід відрізняються одна від одної мінімум однією нуклеотидною заміною.

```
[ 11 1233344556 6776899999 0001222222 2333334455 5566666666 6666666661
[ 1111333801 4535879145 7091901677 3579001278 9336790822 5500000111 1111222231
[ 0667556193 8425850578 3037224938 9840266430 3189707518 1835779012 334414461]
[ 6693457457 6412309491 8297482076 3497966269 1827871551 8700073174 093940141]
#Bos_taurus_V00645.1(2) TAAAC-CGGG GCTTTTGGGG TGCTCTCGGG CGGTTCCTGG AACGCCAAGG CGGTAATGTT TTTCCCTG
#Ukrainian_grey_GQ129208.1 ...G-...A.....TC....C...C...
#Hungarian_Grey_GQ129207.1 ..G..CG...A..C.....C.....C.....C...C...
#Holstein-Friesian_DQ124418.1 .....-...A.....C.....C.....C.....T..C..A...
#Holstein-Friesian_DQ124417.1 .....-...A.....C.....C.T..C.....C..A...
#Holstein-Friesian_DQ124416.1 ..G..C-...A.....A..C.....C.....C..T...
#Holstein-Friesian_DQ124414.1 ..G..C-...A.....C.....C.....T..C..A..G...
#Holstein-Friesian_DQ124412.1 ..G..-...A.....C.....C.....C.....T..C..A.C.....A
#Holstein-Friesian_DQ124411.1 C-...-...A.C.....C.....A.....C...
#Holstein-Friesian_DQ124409.1 ..G..C-...AA.....C.C.C..T.....A.....C...
#Angus_AY676873.1 ..G..G-...A.....T..C.....A..C.....A.....C..C...
#Angus_AY676872.1 .....-...A..C.....C..A..C.....C.....C...
#Angus_AY676871.1 ..G..C-...A.....A.....C.....C.A.T.....A...
#Angus_AY676870.1 C.G.-...A.....A..C.....C.....TCT..T.....C.....C...
#Angus_AY676869.1 ...G..-GT..A..C.C.....C.....C.....C.....C.....TT...
#Angus_AY676868.1 C.G.-G-...A.....A..C.....C.....TCT..T.....C.....C...
#Angus_AY676867.1 ...G..-GT..A..C.C.....C.....C.....C.....C.....TT...
#Charolais_AY676861.1 ..G..C-...A.....A.....C.....C.A.T.....C...
#Charolais_AY676858.1 .....-...A..AC.....CA.....C..T..A.....G...
#Limousin_AY676856.1 ..G..C-...A.....C.....C.....C.....G..A.....T...
```

Рис.1. Однонуклеотидні поліморфізми мітохондріальної ДНК у тварин великої рогатої худоби

Швидкість мутування мтДНК у 5–10 разів вища за ядерну і становить 10^{-9} п.н. за 1 млн років [8]. Дослідження поліморфізму гіперваріабельного регіону D-петлі, який виконує регуляторні функції, надають інформацію для популяційної та еволюційної генетики. Аналіз гіперваріабельної послідовності D-петлі мітохондріальної ДНК (мтДНК) дав можливість встановити два центри доместикації і два диких предки сучасної великої рогатої худоби [6]. Перший розташовується на Близькому Сході, де був одомашнений предок європейської худоби *Bos taurus*. Другий перебуває на території сучасного Пакистану, де був одомашнений зебу *Bos indicus*. За даними філогенетичного аналізу, диких предків цих двох груп порід великої рогатої худоби розійшлися 200–1000 тис. років тому, тобто задовго до доместикації (8–10 тис. років тому). Всі породи європейської худоби належать до виду *Bos taurus*. Більш детальний аналіз походження європейської худоби (понад 400 тварин 34 порід і археологічні зразки туру) показав, що найбільшу різноманітність типів мтДНК виявлено на Близькому Сході [9]. Автори зробили висновок, що худоба Європи має не місцеве походження, а бере початок від доместикованої в епоху неоліту худоби Близького Сходу. З розповсюдженням худоби з центру походження на північний захід генофонд популяцій збіднюється.

Нині у світовій літературі щодо великої рогатої худоби описано п'ять мітохондріальних гаплогруп – *Bos taurus* T1, T1a (африканська); T2 (західноазіатська); T3 (європейська), T4 (східноазіатська), T5 (Італія, Ірак); Q (італійські аборигенні породи); AA (Creole), які різняться за характерними дляожної гаплогрупи однонуклеотидними замінами у визначених положеннях послідовності мтДНК [9, 10, 11, 12, 13, 14]. Окремо виділяють гаплогрупу *Bos indicus*.

Аналіз однонуклеотидних замін у гіперваріабельному районі мтДНК тварин породи шароле показав (рис. 2), що серед 29 представлених генотипів три (FJ815863, FJ815861, FJ815858) належать до гаплогрупи T1a африканського походження за мтДНК, для якої характерна заміна Т на С в позиції 16255. Тварини FJ815861 та FJ815858 характеризуються однаковими однонуклеотидними замінами в положеннях C16050T, T16113C, T1625C, що може свідчити про їхні родинні зв'язки за материнською лінією. Така подібність спостерігається і для тварин FJ815851 та FJ815849 із заміною T16074C. Виявлено 16 тварин (FJ815862, FJ815860, FJ815852–FJ815854, FJ815850, FJ815848, AF336532, AF336523–AF336530), які за дослідженням гіперваріабельним районом мтДНК ідентичні референтній послідовності мітохондріальної ДНК породи герефорд (V00654).

Серед 27 генотипів мтДНК великої рогатої худоби породи лімузин (рис. 3) одна тварина (AF336509) має мітохондріальний гаплотип T1a африканського походження (заміна T16255C), решта належать до гаплогрупи T3 європейського походження.

Рис. 2. Однонуклеотидні поліморфізми гіперваріабельного району мтДНК у тварин породи шароле

```
[ 1111111111 1111]
[ 6666666666 66666]
[ 0000011111 12222]
[ 5556712334 80456]
[ 0782432031 50850]
[ CGCATTTTT GGCTC
#Bos_taurus_V00654.1 ..... .
#Bos_taurus_V00654.1(2) ..... .
#Charolais_AY676861.1 ..... C ..
#Charolais_AY676858.1 ..... G ..
#Charolais_FJ815863.1_Portugal .C..... A..C.
#Charolais_FJ815862.1_Portugal ..... .
#Charolais_FJ815861.1_Portugal T...C....C.
#Charolais_FJ815860.1_Portugal ..... .
#Charolais_FJ815859.1_Portugal ..... C..
#Charolais_FJ815858.1_Portugal T....C....C.
#Charolais_FJ815857.1_Portugal .A..... A..
#Charolais_FJ815856.1_Portugal ..T....C.....
#Charolais_FJ815855.1_Portugal ..... A..
#Charolais_FJ815854.1_Portugal ..... .
#Charolais_FJ815853.1_Portugal ..... .
#Charolais_FJ815852.1_Portugal ..... .
#Charolais_FJ815851.1_Portugal ....C...
#Charolais_FJ815850.1_Portugal ..... .
#Charolais_FJ815849.1_Portugal ....C...
#Charolais_FJ815848.1_Portugal ..... .
#charolais_AF336533.1 ..... C... T
#charolais_AF336532.1 ..... .
#charolais_AF336531.1 ..... T..
#charolais_AF336530.1 ..... .
#charolais_AF336529.1 ..... .
#charolais_AF336528.1 ..... .
#charolais_AF336527.1 ..... .
#charolais_AF336526.1 ..... .
#charolais_AF336525.1 ..... .
#charolais_AF336524.1 ..... .
#charolais_AF336523.1 ..... .
```

```
[ 1111111111 1111111111 11]
[ 6666666666 6666666666 66]
[ 0000000011 1111112222 22]
[ 4455667811 1268990234 56]
[ 2978784803 8245795917 50]
#Bos_taurus_V00654.1 TCGGATTACT ATTGGACACC TC
#Bos_taurus_V00654.1(2) ..... .
#Limousin_AY676856.1 ..... T...
#Limousin_FJ815895.1_Portugal ..... .
#Limousin_FJ815894.1_Portugal ..... A...
#Limousin_FJ815893.1_Portugal ..... .
#Limousin_FJ815892.1_Portugal .T....T...
#Limousin_FJ815891.1_Portugal ..... CC...
#Limousin_FJ815890.1_Portugal ..... .
#Limousin_FJ815889.1_Portugal C.... .
#Limousin_FJ815888.1_Portugal ..A.... .
#Limousin_FJ815887.1_Portugal ..A...TG...
#Limousin_FJ815886.1_Portugal ..... .
#Limousin_FJ815885.1_Portugal ..... G...
#Limousin_FJ815884.1_Portugal ..... .
#Limousin_FJ815883.1_Portugal ..... C...
#Limousin_FJ815882.1_Portugal ..... .
#Limousin_FJ815881.1_Portugal ..... C...
#Limousin_FJ815880.1_Portugal ..... G.C...
#Limousin_AF326511.1 C....C.... .
#Limousin_AF326510.1 ..... C.... .
#Limousin_AF326509.1 ..C.... A....T C.
#Limousin_AF326508.1 ..... G.... .
#Limousin_AF326507.1 ..... C.... .
#Limousin_AF326506.1 ...T.... ..... T.
#Limousin_AF326505.1 ..... ..... T...
#Limousin_AF326504.1 ..... ..... .
#Limousin_AF326503.1 ...T.... G.... .
#Limousin_AF326502.1 ..... T.... .
```

Рис. 3. Однонуклеотидні поліморфізми гіперваріабельного району мтДНК у тварин породи лімузин

Тварини FJ815881 та AF336510 характеризуються однаковими однонуклеотидними замінами Т на С в положенні 16122, що може свідчити про їхні родинні зв'язки за материнською лінією. Варто зазначити, що сиквенси FJ815881 та AF336510 отримано різними авторами від територіально віддалених тварин (Португалія та Англія). Виявлено шість тварин (FJ815895, FJ815893, FJ815890, FJ815886, FJ815884, FJ815882), які за дослідженням гіперваріабельним районом мтДНК ідентичні референтній послідовності мітохондріальної ДНК породи герефорд (V00654), а також описаним вище 16 тваринам породи шароле.

Висновки. Аналіз однонуклеотидних замін у гіперваріабельному районі мітохондріальної ДНК тварин шаролезької та лімузинської порід великої рогатої худоби показав приналежність більшості тварин до європейської гаплогрупи Т3.

За однонуклеотидними поліморфізмами послідовностей мтДНК виявлено три тварини породи шароле та одну тварину породи лімузин, які за мтДНК належать до гаплогрупи Т1а африканського походження.

Результати аналізу показують ідентичність характеру розщеплення мтДНК помісних і чистопородних тварин та узгоджуються з материнським типом успадкування мітохондріального геному. Подібність гаплотипів вихідних чистопородних і помісних тварин підкреслює збереження інтактної материнської основи при міжпородних схрещуваннях у гібридів у низці поколінь, що впливає на оцінку генетичної гетерогенності.

Подяка. За науковий супровід роботи висловлюємо вдячність завідувачу відділу генетики Інституту розведення і генетики тварин НААН доктору сільськогосподарських наук К.В. Копилову, завідувачу відділу селекції і розведення Інституту свинарства та агропромислового виробництва НААН доктору сільськогосподарських наук К.Ф. Почерняєву.

1. Генетико-селекційний моніторинг у м'ясному скотарстві / М.В. Зубець [та ін.]; за ред. М.В. Зубця. — К.: Аграр. наука, 2000. — 187 с.
2. Генетико-селекційний моніторинг у молочному скотарстві / М.В. Зубець [та ін.]; наук. ред. В.П. Бурката. — К.: Аграр. наука, 1999. — 88 с.
3. Столповский Ю.А. Концепция и принципы генетического мониторинга для сохранения *in situ* пород доместицированных животных / Столповский Ю.А. // Сельскохозяйственная биология. — 2010. — № 6. — С. 3–8.
4. Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle / T. Cymbron [et al.] // Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological sciences. — 1999. — V. 266. — P. 597–603.
5. Почерняєв К.Ф. Установлення породності свиней з використанням поліморфізму мітохондріального геному / К.Ф. Почерняєв, А.А. Гетя // Розведення і генетика тварин. — 2007. — Вип. 41. — С. 233–239.
6. Evidence for two independent domestications of cattle / R.T. Loftus [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1994. — V. 91. — P. 2757–2761.
7. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*) / J. Kantanen [et al.] // Heredity. — 2009. — V. 103. — P. 404–415.

8. *Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics* / J.C. Avise [et al.] // An. Rev. Ecol. Syst. – 1987. – V. 18. – P. 489–522.
9. *Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle* / C.S. Troy [et al.] // Nature. – 2001. – V. 410. – P. 1088–1091.
10. *Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle* / A. Achilli [et al.] // Current Biology. – 2008. – V. 18. – P. 157–158.
11. *Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms* / C. Ginja [et al.] // Animal Genetics. – 2010. – V. 41, № 2. – P. 128–141.
12. *Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation* / S. J. Lai [et al.] // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2006. – V. 38. – P. 146–154.
13. *Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle* / H. Mannen [et al.] // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2004. – V. 32. – P. 539–544.
14. *African-derived mitochondria in South American native cattle breeds (*Bos taurus*)*: evidence of a new taurine mitochondrial lineage / M.M. Miretti [et al.] // Journal of Heredity. – 2002. – V. 93. – P. 323–330.
15. *Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome* / S. Anderson [et al.] // Journal of Molecular Biology. – 1982. – V. 156. – P. 683–717.

АНАЛИЗ ДАННЫХ МИРОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО БАНКА: ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПОРОД ШАРОЛЕ И ЛИМУЗИН

Ю.В. Подоба

Институт разведения и генетики животных НААН (Чубинское, Украина)

*Проведен сравнительный анализ последовательностей митохондриального генома крупного рогатого скота пород шароле и лимузин (*Bos taurus*) с мирового генетического банка. Анализ доступных 29 сиквенсов гипервариабельного района митохондриальной ДНК (мтДНК) породы шароле и 27 сиквенсов мтДНК породы лимузин дал возможность распределить их по принадлежности к европейской и африканской гаплогруппам за происхождением митохондриального генома. Среди проанализированных последовательностей мтДНК обнаружены два идентичные гаплотипы у четырех животных породы шароле и у двух животных породы лимузин, которые по сходству однонуклеотидных замен в гипервариабельном районе мтДНК, вероятно, имеют родственную связь по материнской линии.*

Ключевые слова: *Bos taurus*, порода, шароле, лимузин, мтДНК, гаплогруппа, SNP

GENEBANK ANALYSIS: SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF ANIMALS MITOCHONDRIAL GENOME CHAROLAIS AND LIMOUSIN CATTLE BREEDS

Y.V. Podoba

Institute of Animal Breeding and Genetics NAAS (Chubinskoe, Ukraine)

*A comparative analysis of animals mitochondrial genome sequences Charolais and Limousin cattle breeds (*Bos taurus*) with global genetic bank. Analysis of the available 29 mitochondrial DNA (mtDNA) sequences of Charolais animals and 27 mtDNA sequences of Limousin animals allowed to distribute them as belonging to the European and African haplogroups by the origin of mtDNA. Among the sequences were revealed two identical mtDNA haplotypes in four animals of Charolais breed and two animals of Limousin breed, which by the similarity of single nucleotide substitutions in the mtDNA hypervariable region probably have a family relationship from the parent line.*

Key words: *Bos taurus, breed, Charolais, Limousin, mtDNA, haplogroups, SNP*

УДК 577.21:57.08:633.15

ОЦІНЮВАННЯ ВПЛИВУ ГЕННИХ МОДИФІКАЦІЙ НА МІНЕРАЛЬНИЙ СКЛАД ВЕГЕТАТИВНОЇ МАСИ КУКУРУДЗИ ЯК СКЛАДОВОЇ КОРМУ ДЛЯ ТВАРИН

Т.Е. ТКАЧИК

*Інститут тваринництва НААН (Харків, Україна)
tim.tkachik@gmail.com*

Велике значення в організації повноцінного мінерального живлення сільськогосподарських тварин відіграють мікроелементи. У даній роботі наведено аналіз та порівняльну оцінку вмісту Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} у силосі, виготовленому з вегетативної маси генетично модифікованої та звичайної кукурудзи в господарствах Харківської області. Встановлено, що вбудовані генні конструкції, які зумовлюють появу принципово нових для даного виду ознак, не впливають на кількість досліджених есенційних мікроелементів у силосі. Зафіксовані незначні відмінності у мінеральному складі досліджених зразків носили випадковий характер.

© Т.Е. Ткачик, 2013

Розведення і генетика тварин. 2013. № 47