

УДК 636.27(477):575.113/.17:577.22
DOI: <https://doi.org/10.31073/abg.69.08>

ВИКОРИСТАННЯ МУЛЬТИЛОКУСНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ПІДТВЕРДЖЕННЯ УНІКАЛЬНОСТІ ЛЕБЕДИНСЬКОЇ ХУДОБИ

Н. Б. МОХНАЧОВА, О. М. ЖУКОРСЬКИЙ

Інститут розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН (Чубинське, Україна)

<https://orcid.org/0000-0001-5982-6542> – Н. Б. Мохначова

<https://orcid.org/0000-0001-5381-8517> – О. М. Жуковський

nataliia.mokhnachova82@gmail.com

Метою даного дослідження є аналіз інформативності ISSR-маркерів при дослідженні внутрішньопопуляційного генетичного поліморфізму популяції великої рогатої худоби лебединської локальної породи.

Матеріали та методи досліджень. Для підтвердження унікальності та консолідації популяції корів лебединської породи було проведено оцінку генетичного поліморфізму досліджуваних корів за допомогою молекулярної діагностики (ISSR-fingerprinting). Матеріалом для оцінки внутрішньопопуляційної генетичної мінливості були зразки крові відібрані від корів локальної лебединської породи (n = 33 гол.), які утримуються в Київській області Бориспільському районі в господарстві «Голосіївське», Україна. Молекулярно-генетичні дослідження проводили на базі лабораторії генетики тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН.

Результати. Виконано аналіз генетичної структури популяції місцевої малочисельної лебединської породи великої рогатої худоби України за використанням 8 ISSR-систем на основі таких мікросателітів: (ACC)₆G, (CTC)₆C, (GAG)₆C, (GA)₆CC, (AG)₈CG, (AG)₈CA, (GA)₉C та (AG)₉C. Спектри продуктів ампліфікації з використанням в якості праймерів різних мікросателітних локусів як ділянок випалу праймерів і ампліфікації ділянок, які знаходяться між їх інвертованим повтором, суттєво відрізнялися один від одного. Різниця була як за кількістю отриманих ампліконів, їх довжиною (в парах нуклеотидів), так і за їх поліморфізмом. Виявлено 88 ампліфікованих фрагментів ДНК, з яких тільки 18 були поліморфними. Загальна кількість поліморфних локусів склала 20,45%. За результатами популяційно-генетичного аналізу найменш поліморфним виявився (AG)₈CG- маркер (PIC = 0,115).

Висновок. Ці результати свідчать про високу ступінь генетичної консолідації та можливу репродуктивну ізоляцію популяції досліджених тварин.

Ключові слова: генотип, корови, лебединська порода, ISSR-маркери, внутрішньопопуляційне різноманіття

USE OF MULTILOCUS MARKERS TO CONFIRM THE UNIQUENESS OF LEBEDYN CATTLE

N. B. Mokhnachova, O. M. Zhukorskyi

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V. Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

The aim of this study is to analyze the informativeness of ISSR markers in the study of intrapopulation genetic polymorphism of the Lebedyn local breed cattle population.

Materials and methods of research. To confirm the uniqueness and consolidation of the Lebedyn breed cow population, an assessment of the genetic polymorphism of the studied cows was carried out using molecular diagnostics (ISSR-fingerprinting). The material for assessing intrapopulation genetic variability was blood samples taken from cows of the local Lebedyn breed (n = 33 heads), which are kept in the Boryspil district of the Kyiv region in the Holosiyivske farm,

Ukraine. Molecular genetic studies were carried out on the basis of the animal genetics laboratory of the M.V. Zubets Institute of Animal Breeding and Genetics of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

Results. The genetic structure of the population of the local small-sized Lebedyn cattle breed of Ukraine was analyzed using 8 ISSR systems based on the following microsatellites: (ACC)₆G, (CTC)₆C, (GAG)₆C, (GA)₆CC, (AG)₈CG, (AG)₈CA, (GA)₉C and (AG)₉C. The spectra of amplification products using different microsatellite loci as primers annealing sites and amplification of sites located between their inverted repeats significantly differed from each other. The difference was both in the number of amplicons obtained, their length (in nucleotide pairs), and their polymorphism. 88 amplified DNA fragments were identified, of which only 18 were polymorphic. The total number of polymorphic loci was 20.45%. According to the results of population genetic analysis, the (AG)₈CG- marker was the least polymorphic (PIC = 0.115).

Conclusion. These results indicate a high degree of genetic consolidation and possible reproductive isolation of the population of the studied animals.

Keywords: genotype, cows, Lebedyn breed, ISSR-markers, intrapopulation diversity

Вступ. Внутрішньовидове біологічне різноманіття порід великої рогатої худоби (ВРХ) цікаве з точки зору популяційної генетики та збереження генофонду, а також є джерелом цінних генотипів для практичної селекції. Слід зазначити, що локальні (місцеві) популяції ВРХ зберігають індивідуальну мінливість в порівнянні з комерційними породами (Golidjow et al., 1999).

Здатність адаптуватися до змін зовнішнього середовища в процесі природного відбору залежить від генетичної різноманітності популяції. При низьких показниках внутрішньопопуляційного поліморфізму знижується кількість можливих комбінацій генів, які сприяють адаптації до зовнішніх впливів, що зменшує ймовірність виникнення в цій популяції нових пристосувальних генотипів. Тому популяція потребує на відповідному рівні генетичної різноманітності для виживання постійно мінливих біотичних та абіотичних компонентів екосистеми. В процесі штучного відбору сільськогосподарських тварин спостерігаються закономірності, аналогічні природнім популяціям. Рівень генетичного поліморфізму найбільш ефективно визначається за допомогою ДНК-маркерів. Крім оцінки біорізноманіття, молекулярні маркери застосовуються для дослідження походження, доместикації видів та їх подальшої міграції, отримання інформації з філогенетичних взаємовідносин між видами, а також для географічної локалізації популяцій, що мають різне генетичне походження (Diamond, 2002).

Місцеві породи можуть бути носіями унікальних, притаманних тільки їм комбінацій алелів та бути важливим резервом генетичної варіабельності для комерційних порід. Очевидно, що такі алелі мають бути виявлені, збережені та використані в селекційній роботі. Тому актуальним є виявлення унікальних порід, зокрема ВРХ.

Локальною вітчизняною породою в Україні є лебединська порода великої рогатої худоби, виведена методом відтворного схрещування корів місцевих порід (переважно сірої української породи) з бугаями швіцької породи і з наступним розведенням найкращих помісей «у собі». Наразі лебединська порода за проведеними розрахунками популяційних параметрів, тенденцій та статусів ризику відповідно до рекомендацій FAO перебуває в стані ризику, а за даними *European Federation of Animal Science* – в стані потенційної небезпеки (Hladii et al., 2018).

Геномне сканування набуває особливого значення в дослідженнях генофондів тварин, оскільки тільки наявність достатньої кількості геномних молекулярно-генетичних маркерів дозволяє зберігати, контролювати і удосконалювати необхідне біорізноманіття таких видів, сканування може проводитися як на рівні декількох десятків або сотень маркерів, так і в об'ємі повного секвенування геномів (Lowry, 2010). На сьогодні розроблено достатньо багато методів подібного сканування, до одного з них відноситься геномне полілокусне генотипування за фрагментами ДНК різної довжини, фланкованих інвертованим повтором мікросателітних послідовностей.

телітних локусів (Inter-SimpleSequenceRepeat – ISSR-PCR маркери) (Zietkiewicz et al., 1994). Інвертовані повтори викликають особливу цікавість, оскільки схильність до формування вторинних структур ДНК складає основу для геномної нестабільності в ділянках їх локалізації (Cook et al., 2011).

Застосування нейтральних молекулярних маркерів (ISSR-PCR) нерівномірно розподілених по тваринному геному, дозволяє одночасно визначити мінливість по групі не пов'язаних між собою локусів, що особливо цінно для збереження та використання генетичних ресурсів. Така інформація дає можливість оцінити генетичний дрейф, що відбувається в екосистемах, а також ефективно проводити моніторинг популяцій рідкісних і зникаючих видів тварин, що знаходяться на територіях, що охороняються (Van de Wouw et al., 2010).

Спроби застосування генотипування мультилокусних спектрів для вирішення традиційних проблем вивчення існуючих порід ВРХ, контролю їх консолідації і ряду інших задач проводяться достатньо давно, проте до цих пір цей напрямок залишається недостатньо розробленим (Flori et al., 2019). Раніше вже були виконані порівняльні дослідження полілокусних спектрів фрагментів геномної ДНК, фланкованих інвертованими повторами мікросателітів, у деяких порід ВРХ (Maherovska, 2021; Putra et al., 2024). У зв'язку з тим, що існує багато суперечливих даних про відмінність різних типів ДНК-маркерів та можливості їх застосування для аналізу таксонів різного рівня (Starodub et al., 2024), метою даного дослідження є аналіз інформативності ISSR-маркерів при дослідженні внутрішньопопуляційного генетичного поліморфізму великої рогатої худоби лебединської породи.

Матеріали та методи досліджень. Для підтвердження унікальності та консолідації популяції корів лебединської породи було проведено оцінку генетичного поліморфізму досліджуваних корів за допомогою молекулярної діагностики (*ISSR-fingerprinting*).

Матеріалом для оцінки внутрішньопопуляційної генетичної мінливості були зразки крові відібрані від корів локальної лебединської породи (n = 33 гол.), які утримуються в Київській області Бориспільському районі в господарстві «Голосіївське», Україна. Молекулярно-генетичні дослідження проводили на базі лабораторії генетики тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН. Геномну ДНК з цільної крові виділяли із використанням стандартного комерційного набору «ДНК-сорб-В» (*AmpliSens*). Концентрацію отриманої ДНК в отриманому препараті визначали в агарозному гелі, порівнюючи яскравість смужок аналізованих фрагментів і стандартного препарату ДНК (фрагменти фага λ).

Суміш для проведення ПЛР містила: 2 мкл загального буфера для ДНК-полімерази, 1 мкл суміші трифосфатів (*AmpliSens*), 0,8 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази (*Fermentas*). Геномну ДНК додавали у кількості 1,5 мкл, об'єм ДНК-суміші доводили до 10 мкл бідистильованою водою (Mokhnachova, 2022). Ампліфікацію сумарної ДНК з праймерами проводили на ампліфікаторі *Applied Biosystems* (USA).

Для дослідження поліморфізму ДНК з використанням ISSR-маркерів проведено оптимізацію температурних режимів полімеразної ланцюгової реакції (табл. 1).

1. Послідовності праймерів і температурні режими відпалу використані в дослідженні

№ п/п	Послідовність праймера	Мотив	Температура випалу
1	5'-ACCACCACCACCACCACCG-3'	(ACC) ₆ G	64°C
2	5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTCC-3'	(CTC) ₆ C	64°C
3	5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGC-3'	(GAG) ₆ C	64°C
4	5'-GAGAGAGAGAGACC-3'	(GA) ₆ CC	54°C
5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCG-3'	(AG) ₈ CG	56°C
6	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCA-3'	(AG) ₈ CA	54°C
7	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGA-3'	(GA) ₉ C	56°C
8	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	(AG) ₉ C	57°C

Фракціонування продуктів ампліфікації проводили в 2% агарозному гелі в $1 \times$ TBE-буфері за напруги 90 В (тривалість фореузу 2 год.). Для оцінки довжини продуктів ПЛР використовували ДНК-маркер молекулярних мас 1 Kb *Ready-to-Use* (Fermentas, Литва). Інтерпретацію продуктів ампліфікації здійснювали, фотографуючи гелі цифровою камерою підкороткохвильовим ультрафіолетовим випромінюванням на транслюмінаторі після фарбування гелю бромистим етидієм.

Кожен амплікон розглядали як один локус ДНК. Параметри генетичного різноманіття визначали за допомогою комп'ютерної програми *Microsoft Excel*.

Результати досліджень. В результаті виконаних досліджень виконано аналіз генетичної структури популяції місцевої малочисельної лебединської породи великої рогатої худоби України за використанням 8 *ISSR*-систем на основі таких мікросателітів: $(ACC)_6G$, $(CTC)_6C$, $(GAG)_6C$, $(GA)_6CC$, $(AG)_8CG$, $(AG)_8CA$, $(GA)_9C$ та $(AG)_9C$ та отримані наступні результати. Спектри продуктів ампліфікації з використанням в якості праймерів різних мікросателітних локусів як ділянок випалу праймерів і ампліфікації ділянок, які знаходяться між їх інвертованим повтором, суттєво відрізнялися один від одного. Різниця була як за кількістю отриманих ампліконів, їх довжиною (в парах нуклеотидів), так і за їх поліморфізмом (рис. 1).

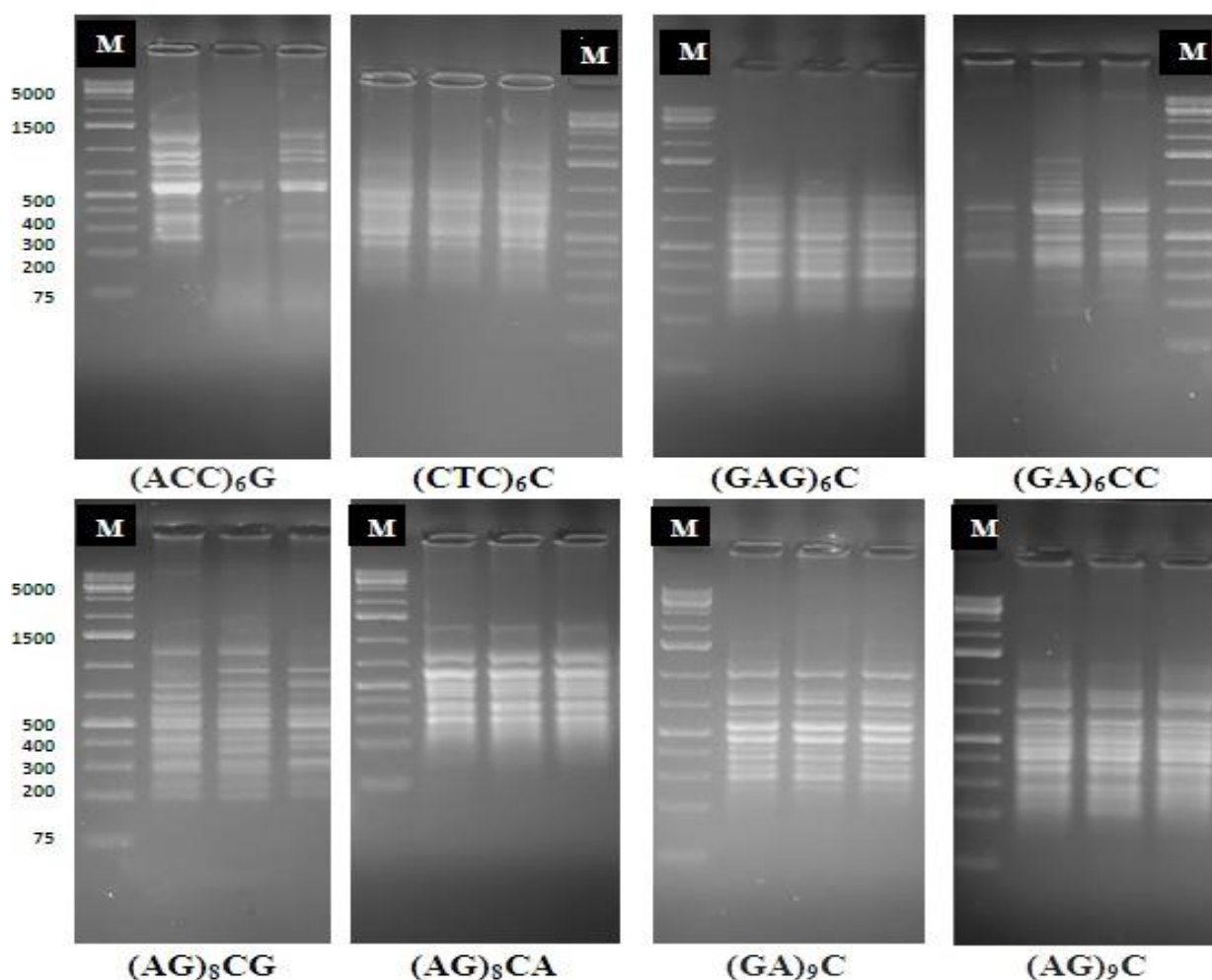


Рис. 1. Електрофореграма в 1,5% агарозному гелі продуктів ампліфікації зразків ДНК тварин лебединської породи методом *ISSR*-ПЛР. М-маркер молекулярних мас (*Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder*, Fisher Scientific)

Протестовані 8 *ISSR*-праймерів містили послідовності ди- та тринуклеотидних мікросателітних мотивів з додаванням якірного нуклеотида на 3'-кінці. Усі 8 протестованих *ISSR*-праймерів показали високу ефективність при дослідженні лебединської породи ВРХ України.

ни. Спектри, отримані з використанням ди- і тринуклеотидних мікросателітних мотивів в якості праймерів, виявилися однаково насичені ампліконами.

ISSR-маркування місцевої малочисельної лебединської породи великої рогатої худоби України виявило 88 ампліфікованих фрагментів ДНК, з яких тільки 18 були поліморфними. Загальна кількість поліморфних локусів склала 20,45% (табл. 2).

2. Параметри використаних ISSR-маркерів

Праймер	(CTC) ₆ C	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(GA) ₆ CC	(AG) ₈ CG	(AG) ₈ CA	(GA) ₉ C	(AG) ₉ C	Σ
К-сть локусів	6	14	10	10	12	9	13	14	88
Межі довжин	410–1450	200–1350	240–1050	300–1450	200–1290	280–1450	280–1550	220–1350	200–1550
Поліморф. локусів	2	7	0	5	3	0	1	0	18

Кількість ампліфікованих фрагментів ДНК змінювалося в залежності від праймера від 6 до 14, а їх розміри – від 200 до 1550 п. н. Найбільшу кількість локусів по 14 виявили праймери (ACC)₆G та (AG)₉C. Якщо у (ACC)₆G – 7 локусів виявилися поліморфними, то у (AG)₉C всі амплікони консервативні. Найменше локусів було виявлено за використання мікросателіта (CTC)₆C – 6 фрагментів, з яких тільки 2 поліморфних.

Для оцінки генетичної різноманітності популяції лебединських корів було здійснено аналіз поліморфізму фрагментів ДНК за ISSR-маркерами: (ACC)₆G, (CTC)₆C, (GAG)₆C, (GA)₆CC, (AG)₈CG, (AG)₈CA, (GA)₉C та (AG)₉C (табл. 3.).

3. ДНК-поліморфізм лебединської породи корів за ISSR-маркерами

№ п/п	ISSR-маркер	P	H _s	I	μ	h _μ	PIC	K
1	(ACC) ₆ G	0,28	0,314	0,137	26,832	0,92	0,205	7
2	(CTC) ₆ C	0,22	0,177	0,084	2,62	0,56	0,150	4
3	(GAG) ₆ C	0	0	0	0	0	0	10
4	(GA) ₆ CC	0,28	0,313	0,134	13,47	0,347	0,204	5
5	(AG) ₈ CG	0,18	0,114	0,055	6,40	0,47	0,115	9
6	(AG) ₈ CA	0	0	0	0	0	0	9
7	(GA) ₉ C	0,04	0,058	0,027	0,5	0,96	0,032	12
8	(AG) ₉ C	0	0	0	0	0	0	14
Середнє		0,125	0,195	0,166	9,964	0,651	0,141	

Примітка: P – частка поліморфних локусів, H_s – середнє на локус генне різноманіття, μ – середня кількість алелей на локус, I – індекс гетерогенності Шеннона, PIC – індекс поліморфізму локусу, h_μ – частка рідкісних локусів, K – кількість консервативних локусів.

За результатами популяційно-генетичного аналізу найменш поліморфним виявився (AG)₈CG- маркер (PIC = 0,115). За цим праймером виявлено 9 консервативних локусів. Загалом консервативні локуси знайдено у всіх ISSR-маркерів, проте тільки 3 мікросателітних праймери (GAG)₆C, (AG)₈CA, (AG)₉C ампліфікували виключно консервативні фрагменти, тобто були мономорфними.

Разом із загальними локусами в нашому дослідженні виявлені і видоспецифічні фрагменти. Для визначення видоспецифічного патерну у доместикованих видів було запропоновано використовувати лише фрагменти, які зустрічаються з частотою 0,4 і вище (рис. 2).

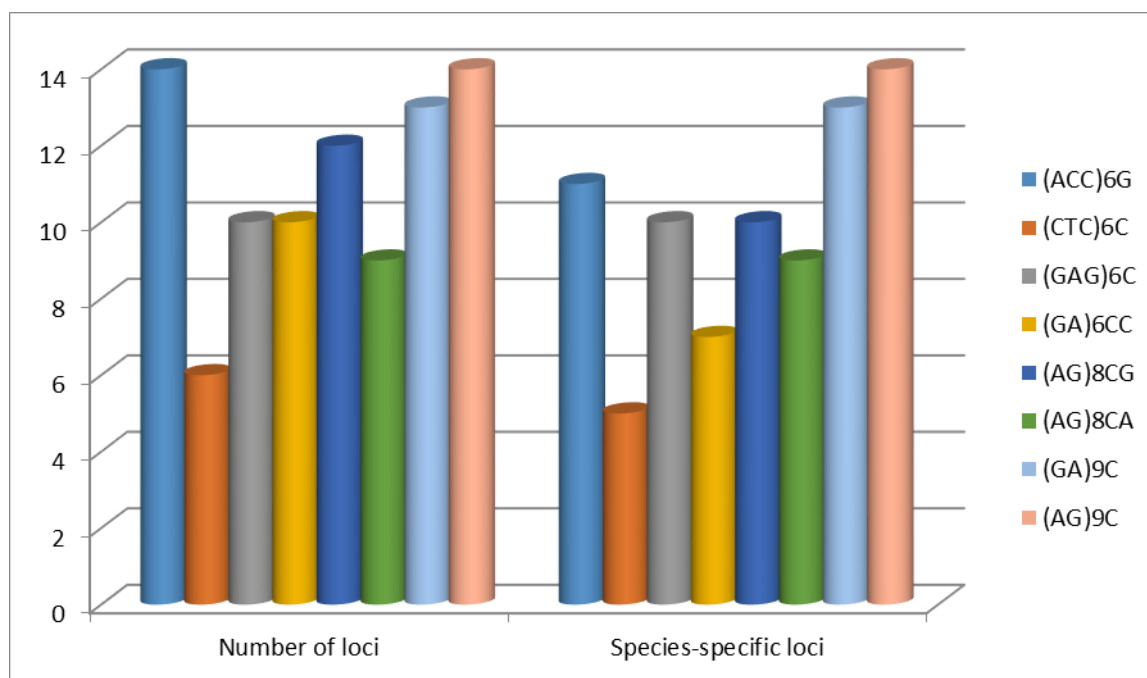


Рис. 2. Розподіл ISSR-фрагментів за досліджуваними праймерами

За результатами молекулярно-генетичного дослідження популяції лебединської породи великої рогатої худоби розроблено систему оцінки рівня генетичного поліморфізму за маркерами $(ACC)_6G$, $(CTC)_6C$, $(GAG)_6C$, $(GA)_6CC$, $(AG)_8CG$, $(AG)_8CA$, $(GA)_9C$ та $(AG)_9C$ для підтвердження унікальності і консолідованості популяцій в якості основи для включення їх в національні програми зі збереження біоресурсів. Аналіз оцінки стану генофонду лебединської породи за використанням ISSR-маркерів встановив низький рівень генетичного різноманіття: частка поліморфних локусів ($P = 0,125$), середнє на локус генне різноманіття ($H_s = 0,195$), тоді як індекс Шеннона склав 0,166. Ці результати свідчать про високу ступінь генетичної консолідації та можливу репродуктивну ізоляцію популяції досліджених тварин.

Висновки. Виконані значні дослідження 88 полілокусних спектрів фрагментів ДНК, фланкованих мікросателітних локусів (ISSR-PCR) у лебединської місцевої породи великої рогатої худоби, дозволили виявити консервативні локуси, варіабельні ділянки породоспецифічні характеристики (спектри) на геномному і генофондному рівнях. Отримані нами результати свідчать про те, що метод ISSR-фінгерпринтингу дозволяє виявляти породоспецифічні локуси та фрагменти, тобто, ідентифікувати породи як за частотою, так і за наявністю того чи іншого локусу ISSR-маркерів. Найбільш консервативними виявились спектри ампліконів праймерів – $(GAG)_6C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_9C$. Поєднавши спектри за частотою 88 локусів, отриманих за допомогою ISSR-маркерів, визначений «Геномний профіль» для української місцевої мало чисельної лебединської породи великої рогатої худоби.

REFERENCES

- Cook, G. W., Konkel, M. K., Major, J. D., Walker, J. A., Han, K., & Batzeret, M. A. (2011). Alu pair exclusions in the human genome. *Mobile DNA*, 2 (10), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-2-10>.
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418, 700–707. <https://doi.org/10.1038/nature01019>.
- Flory, L., Fritz, S., Jaffrezic, F., Boussaha, M. (2019). The genome response to artificial selection: A case study in dairy cattle. *PLoS ONE*, 4 (8), e6595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006595>.
- Golidjow, C. D., Giovambattista, G., Ripoli, M. V., Dulout, F. N., & Lojo, M. M. (1999). Genetic variability and population structure structure in loci related to milk production traits in native

- Argentine Creole and commercial Argentine Holstein cattle. *Genet. Mol. Biol.*, 22 (3), 395–398. <https://doi.org/10.1590/S1415-47571999000300018>.
- Hladii, M. V., Polupan, Yu. P., Basovskyi, D. M., Vyshnevskiy, L. V., Kovtun, S. I., Sydorenko, O. V., Podoba, B. Ye., Biriukova, O. D., Rieznykova, N. L., Voitenko, S. L., Dzhus, P. P., Kuzebnyi, S. V., Sharan, P. I., Kruhliak, O. V., Kruhliak, A. P., Milchenko, Yu. V., Pryima, S. V., Reznikova, Yu. M., Martyniuk, I. S., Bashchenko, M. I., Zhukorskyi, O. M., Kostenko, O. I., Kvasha, M. M., Romanova, O. V., Ladyka, V. I., Khmelnychyi, L. M., Vdovychenko, Yu. V., Kozyr, V. S., & Denysiuk, O. V., Katerynych, O. O. (2018). *Prohrama zberezhennia henofondu lokalnykh i znykaiuchykh pored silskohospodarskykh tvaryn v Ukrainina 2017–2025 roky* [Program for the preservation of the gene pool of local and endangered breeds of agricultural animals in Ukraine for 2017–2025]. [In Ukrainian]. <http://search.nbuv.gov.ua/publ/REF-0000732444>.
- Lowry, D. B. (2010) Landscape evolutionary genomics. *Biol. Lett.*, 6 (4), 502–550. doi:10.1098/rsbl.2009.0969.
- Maherovska, O. M. (2021). Selection and assessment of ISSR-markers for Analysis of separate cattle populations. *Animal Breeding and Genetics*. Kyiv, 61, 137–145. doi: 10.31073/abg.61.15.
- Mokhnachova, N. (2022) Henetychna struktura ukrayins'koyi populyatsiyi vodyanykh buyvoliv za ISSR-PCR markeramy [Genetic structure of the Ukrainian water buffalo population based on ISSR-PCR markers]. *Biologhiia tvaryn – The Animal Biology*. Lviv, 24 (1), 19–24. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/animbiol24.01.019>.
- Putra, W. P. B., Margawati, E. T., Furqon, A., Puja, I. K., Hasbi, H. (2024). Genetic variation in two phenotypes of bali cattle (*bos javanicus*) inferred by (AG)₉C ISSR marker. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 27 (2). doi:<http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.5213>.
- Starodub, L., Porhun, M., Mokhnachova, N., Berezovsky, A., Yasinetska, N., & Kopylov, K. (2024). Genetic structure of the population of Przewalski's horse (*Equus przewalskii*) according to cytogenetic and ISSR markers. *Studia Biologica*, 18 (4), 49–60. doi:10.30970/sbi.1804.792.
- Van de Wouw, M., Van Hintum, Th., Kik, C., Van Treuren, R., & Visser, B. (2010). Genetic diversity trends in twentieth century crop cultivars: a meta-analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 120 (6), 1241–1252. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1252-6>.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 (2), 176–183. doi:10.1006/geno.1994.1151.

*Одержано редколегією 23.04.2025 р.
Прийнято до друку 14.05.2025 р.*