

пород в сравнении с чёрно-пестрыми. Авторы дают интерпретацию наблюдаемого феномена как следствие перераспределения в результате мутации «ред» биохимического субстрата-3,4 диоксифенилаланина.

Голштины, меланины, свободные радикалы, хромосомы, мутагенез

MUTATION «RED» AS PROVOCATION OF SPONTANEOUS MUTAGENESIS OF RED-PIED CATTLE. Konovalov V., Starodub L.

The comparative estimation of level of spontaneous mutagenesis in Zvisimosti from the specific of biosynthesis of melaninovich pigments for the home animals of eu(black) or feo (brown) row shows the more than double increase of spontaneous a mutagenesis at red-pied breeds by comparison to blackly-pied one. Authors give interpretation of the looked after phenomenon as a result of redistribution as a investigation of mutation of «red» of biochemical substrata -3,4 of dioksifenilalanin (DOFA).

Golshtiny, melaniny, free radicals, chromosomes, mutagenesis

УДК 575.113:636.03

К.В. КОПИЛОВ

Институт розведення і генетики тварин УААН

СУЧАСНІ МЕТОДИ ДНК-АНАЛІЗУ В СЕЛЕКЦІЙНО-ПЛЕМІННІЙ РОБОТІ

Розглянуто питання можливості застосування різних молекулярно-генетичних методів у селекційно-племенній роботі.

ПЛР, ДНК, мікросателіти, QTL, ISSR-маркери

Розведення і генетика тварин. 2009. № 43 © К.В. Копилов, 2009

В останні роки тваринництво України переживає кризу зменшення поголів'я сільськогосподарських тварин і, як наслідок, зниження обсягів виробництва тваринницької продукції.

Широке використання схрещування різних місцевих популяцій сільськогосподарських тварин з імпортованими з-за кордону дало змогу в надзвичайно короткий термін підвищити генетичний потенціал продуктивності великих масивів тварин. Методи створення і поліпшення порід в основному ґрунтувались на виявленні та використанні тварин з бажаними показниками, але стає більш очевидним, що лише традиційні методи розведення не в змозі забезпечити суттєвого селекційного прогресу.

Внаслідок проведення інтенсивної селекції і породоутворення накопичений резерв мінливості зменшується, і це не може не впливати на стратегічні можливості селекційної роботи.

Сучасні генетичні підходи до удосконалення порід сільськогосподарських видів тварин ґрунтуються на більш детальній оцінці генотипу тварини, її генетичного потенціалу з використанням маркер-допоміжної селекції (Marker-assisted selection - MAS) [1].

Перехід на сучасний рівень селекційно-плеємної роботи в Україні потребує впровадження нових методів та підходів, які дадуть можливість проводити індивідуальний контроль походження, генотипування тварин за QTL (локусами кількісних ознак), а також формувати генетичну структуру популяції.

Застосування методів ДНК-технологій в європейських країнах та США дає можливість отримувати великі прибутки завдяки скороченню часу генераційного інтервалу поголів'я в процесі відтворення та застосування MAS, тобто проводити підбір та добір батьківських пар певних генотипів та отримувати нащадків відповідного генетичного потенціалу щодо основних показників продуктивності. Генетичний контроль походження тварин, їхні паспортизація та оцінка структури

популяцій за мікросателітними маркерами широко застосовуються в селекційно-племінній роботі у більшості країн з розвиненим тваринництвом і практично стали обов'язковим елементом первинного зоотехнічного обліку. Міжнародним комітетом із племінних книг (ISBC) було висунуто вимогу щодо обов'язкового генотипування чистокровних верхових коней за мікросателітними ДНК-маркерами з метою ідентифікації та контролю їхнього походження. У скотарстві генетичний аналіз набуває особливої цінності при формуванні масивів тварин, які створюються шляхом використання невеликої кількості плідників.

Разом з тим при оцінці генетичного потенціалу тварин постає завдання: з одного боку, враховувати генотип окремих тварин, з іншого, – контролювати генетичну структуру всього стада та окремих ліній з метою підтримки рівня гетерозиготності, контролю лінійної структури стада, оптимізації підбору.

У зв'язку з цим актуальною є розробка комплексної системи оцінки тварин, зокрема великої рогатої худоби за різними ДНК-маркерами.

Матеріал і методика досліджень. Найбільш інформативними для вирішення цих завдань вважаються молекулярно-генетичні методи ДНК-аналізу, які ґрунтуються на застосуванні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [2].

Множинний алелізм мікросателітних локусів STR (short tandem repeat) визначається різним копіюванням мономерних одиниць у кластері. Кількість (ди-, три-, тетра-) нуклеотидних тандемних повторів ДНК у різних організмів індивідуальна. Перевагою мікросателітних локусів є їхня велика гетерозиготність, наявність досить великої кількості алелів (у середньому 6–10 на локус), які мають кодомінантний характер успадкування. Це дає змогу чітко відрізнити гомозиготу від гетерозиготи і контролювати гени, отримані від батьків. Гіперваріабельні мікросателіти є універсальною системою генетичних маркерів для аналізу змін, що успадковуються на рівні ядерної ДНК і широко застосовуються як при експер-

тизі походження, так і в дослідженнях генетичного поліморфізму різних видів та порід тварин.

У даний час відповідно до вимог та рекомендацій International Society of Animal Genetics – SAG/FAO, IKAR та інших нормативних європейських документів запропоновано панелі найбільш інформативних мікросателітних маркерів, наприклад для великої рогатої худоби (таблиця), які дають можливість оцінки достовірності походження племінних тварин та племінного матеріалу для їхньої паспортизації з вірогідністю 99,99 %.

Характеристика панелей мікросателітів, рекомендованих ISAG для підтвердження походження великої рогатої худоби

Локус	Хромо-сома	Розмір, п.н.	Праймер (5'-3') F/R
BM1824 (D1S34)	1	178-190, п.н.	F- GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC R- CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG
BM2113 (D2S26)	2	125-143, п.н.	F- GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC R- CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC
INRA023 (D3S10)	3	197-223, п.н.	F- GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTC R- TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C
SPS 115 (D15S21)	15	235-265, п.н.	F- AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC CAG R- AAC GAG TGT CCT AGT TTG GCT GTG
TGLA 122 (D21S6)	21	130-164, п.н.	F- CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC R(1)- AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C R(2)- AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA
TGLA 126 (D20S1)	20	108-129, п.н.	F- CTA ATT TAG AAT GAG AGA GGC TTC T R- TTG GTC TCT ATT CTC TGA ATA TTC C
TGLA 227 (D18S1)	18	80-100, п.н.	F- CGA ATT CCA AAT CTG TTA ATT TGC T R- ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA
ETH 10 (D5S3)	5	210-226, п.н.	F- GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA R- CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC
ETH225 (D9S1)	9	140-156, п.н.	F GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T R- ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT

Для виявлення між- та внутрішньовидової генетичної мінливості, ідентифікації видів, популяцій, ліній існує ще одна група маркерів Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), які також у деяких випадках можуть бути використані для картування геномів та маркірування господарськи корисних ознак. Для аналізу ISSR-маркерів використовують праймери комплементарні ди-, тринуклеотидним мікросателітним повторам. У результаті проведення ПЛР такі праймери дають змогу ампліфікувати фрагменти ДНК, знаходяться між мікросателітними послідовностями (унікальна ДНК) і які представлені на гелелектрофореграмі дискретними слугами (ISSR – фінгерпринтинг). ISSR-маркери тестуються за наявністю/відсутністю смуг (продуктів ампліфікації – фрагментів ДНК, що знаходяться між мікросателітними повторами).

Результати досліджень. З метою впровадження у практику тваринництва сучасних методів оцінки генотипу у відділі генетики Інституту розведення і генетики тварин УААН проводяться дослідження щодо аналізу та використання молекулярно-генетичних ДНК-маркерів для вирішення широкого спектра селекційних завдань, а саме паспортизації та підтвердження походження племінних тварин, генотипування тварин за локусами кількісних ознак, визначення ступеня гомозиготності, генетичної спорідненості, рівня внутрішньопородної генеалогічної диференціації.

За останній період було проведено роботу з визначення найбільш інформативних мікросателітних маркерів, які доцільно використовувати як праймери для проведення міжвидового аналізу генетичної структури сільськогосподарських і диких видів ссавців. Установлено відмінності сільськогосподарських видів тварин від диких близькородинних за перевагою фрагментів малої довжини в спектрах продуктів ампліфікації ДНК, фланкованих тринуклеотидними мікросателітними локусами (ISSR-PCR-маркери). Найбільшу кількість ISSR-PCR маркерів дає використання як праймерів тринуклеотидних мікросателітних локусів, що належать до пурин-піримідинових послідовностей [3, 4].

Одним з важливих завдань удосконалення порід великої рогатої худоби є визначення генетичних детермінант формування продуктивності й використання їх у селекційно-племінній роботі.

Ефективність селекції на поліпшення якісних показників тварин різного напрямку продуктивності можна підвищити шляхом використання нових генетичних методів, а саме методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним рестрикційним аналізом (ПЛР-ПДРФ).

Одним із основних напрямків у цій роботі є пошук та використання ДНК-маркерів, що дають змогу маркірувати окремі господарськи цінні ознаки. Дослідження тварин за генами кількісних ознак (QTL) дає можливість визначати генотип тварин та передбачати господарськи цінні ознаки на рівні ДНК, а саме алельних варіантів генів, незалежно від статі, віку та фізіологічного стану особин. Поряд з традиційним методом добору тварин селекція за маркерами сприяє швидкому введенню у популяцію тварин бажаного генотипу і, як результат, зниження економічних витрат на виробництво продукції.

Так у країнах з розвиненим молочним скотарством впроваджується, наприклад, тестування тварин, особливо плідників, за геном капа-казеїну, який бере участь у синтезі білків молока [5].

Капа-казеїн і бета-лактоглобулін – два найбільш важливих білки молока ссавців. Білки синтезуються епітеліальними клітинами молочних залоз і відіграють ключову роль у гарантуванні якості молока. Вони впливають на коагуляцію, важливі процеси для виробництва сирів і масла [6].

У відділі генетики були проведені дослідження щодо розподілу алельних варіантів генів асоційованих з господарськи корисними ознаками у тварин різних за напрямком продуктивності 10 порід великої рогатої худоби за генами: капа-казеїну (CSN3), бета-лактоглобуліну (BLG), гормону росту (GH), лептину (LEP), міостатину (MSTN).

За частотою розподілу алельних варіантів за геном капа-казеїну (CSN3) найбільш схожі за генетичною структурою виявилися тварини української червоно-рябої молочної породи та української червоної молочної породи, частота за В-алельним варіантом, асоційованим з підвищеним вмістом білка в молоці, становила 0,250 і 0,240 відповідно. Наявність у молоці великої рогатої худоби В-алеля CSN3 дає змогу одержувати з такого молока високоякісні сири. У тварин абердин-ангуської і голштинської порід встановлено найнижчу частоту алеля В (0,150 і 0,155 відповідно). У тварин української червоної молочної і симентальської порід спостерігався гомозиготний варіант ВВ з частотою 0,020 і 0,130 відповідно. У тварин породи санта-гертруда частота алеля В гена капа-казеїну становила 0,750, причому спостерігалися як генотипи АВ, так і ВВ.

За геном бета-лактоглобуліну (BLG) найбільшу частоту алеля В (0,835) за даним геном, яка корелює з жирномолочністю і більшим відсотком вмісту казеїнових білків, встановлено у тварин української червоно-рябої молочної породи. За розподілом генотипів гомозиготи АА виявлено в української червоної молочної (частота 0,050) та голштинської порід (частота 0,077).

За геном гормону росту (GH), який корелює з жирністю молока, виявлено схожість за розподілом алельних варіантів між групами тварин м'ясного та молочного напрямків продуктивності. Так у тварин абердин-ангуської та південної м'ясної породи алельний варіант L спостерігався з частотою 0,800 і 0,810, а українських червоно-рябої молочної та червоної молочної порід його частота становила 0,715 і 0,710 відповідно.

У тварин м'ясного напрямку продуктивності переважав генотип АВ за геном лептину, у породи лімузин його частота сягала 1,000, а у абердин-ангуської породи – 0,440. У останньої було виявлено рідкісний генотип АС з частотою 0,220. У порід молочного напрямку переважала частота генотипу АА,

зокрема в української червоно-рябої молочної породи спостерігалася одноманітність за даним генотипом.

У результаті проведеної роботи було встановлено, що із селекційної точки зору найбільш цінним сполученням алелів генів, асоційованих із вмістом білка та жиру в молоці, характеризувались тварини української червоно-рябої молочної породи: CSN3 (A – 0,750, B – 0,250), BLG (A – 0,165, B – 0,835) та GH (L – 0,715, V – 0,285); у тварин м'ясного напрямку продуктивності (породи абердин-ангус, південна м'ясна, лімузин, симентал) не виявлено мутації за геном міостатину.

Висновки. Таким чином, з розвитком сучасних методів молекулярної генетики стала можливою ідентифікація генів, які безпосередньо пов'язані з показниками продуктивності тварин. Виявлення бажаних з точки зору селекції варіантів таких генів дає змогу додатково до традиційного добору тварин проводити селекцію на рівні ДНК-технологій, тобто за генотипом. Централізоване впровадження сучасних технологій ДНК-тестування племінного матеріалу відповідно до вимог міжнародних вимог та стандартів ISAG/FAO, ICAR, Standards for Parentage Testing Laboratories, USA у практику селекційної роботи в Україні є одним з першочергових завдань.

1. *Буркат, В. П.* Деякі біотехнологічні та генетичні методи при створенні тварин майбутнього / В. П. Буркат та ін. // Розведення і генетика тварин: міжвід. темат. наук. зб. – К. : Аграр. наука, 2008. – Вип. 42. – С. 3–10.

2. *Копилова, К. В.* Впровадження у практику тваринництва генетичної експертизи за ДНК-методами / К. В. Копилова // Розведення і генетика тварин : міжвід. темат. наук. зб. – К. : Аграр. наука, 2008. – Вип. 42. – С. 125–133.

3. *Копилов, К. В.* Особенности распределения инвертных повторов микросателлитных локусов (ISSR-PCR) у представителей Ungulata и Delphinidae / К. В. Копилов, В. И. Глазко // Доп. НАН України. – 2005. – № 9. – С.179–186.

4. *Копылов, К. В.* Генетична компонента агроecosистем на прикладі різних порід великої рогатої худоби: дис. ... канд. с.-г. наук : 03.00.15 / К. В. Копылов. — К., 2005. — 136 с.

5. *Schaar, J.* Effects of genetic variants of kappa-casein and beta-lactoglobulin on cheese-making / J. Schaar, B. Hansson, H. Pettersson // *J. Dairy Res.* — 1985. — V.52. — P. 429–437.

6. *Patel, R. K.* Allelic frequency of kappa-casein and beta-lactoglobulin in Indian crossbreed (*Bos taurus*×*Bos indicus*) dairy bulls / R. K. Patel, J. B. Chauhan, K. M. Singh // *J. Vet. Anim. Sci.* — 2007. — Vol. 31 (6). — P. 399–402.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДНК-АНАЛИЗА В СЕЛЕКЦИОННО-ПЛЕМЕННОЙ РАБОТЕ. КОПЫЛОВ К.

Рассмотрен вопрос возможности применения различных молекулярно-генетических методов в селекционно-племенной работе.

ПЦР, ДНК, микросателлиты, QTL, ISSR-маркеры

MODERN METHODS OF DNA-ANALYSES IN SELECTION PEDIGREE WORK. Kopylov K.

The question of possibility application of different molecular genetic methods in selection pedigree work is considered.

PCR, DNA, microsatellites, QTL, ISSR-markers