

## СЕЛЕКЦІЯ ТА РОЗВЕДЕННЯ ТВАРИН

УДК 636.293.2:575

ГУЗЄЄВ Ю. В., здобувач

ТОВ «Голосіво», Броварський р-н, Київська обл.

[p-george@i.ua](mailto:p-george@i.ua)

МЕЛЬНИК О. В., канд. с.-г. наук

Національний університет біоресурсів та природокористування України

ГЛАДИРЬ О. О., канд. біол. наук

ЗІНОВ'ЄВА Н. А., д-р біол. наук, академік

Всеросійський науково-дослідний інститут тваринництва

ім. академіка Л.К. Ернста, Московська обл., Подольський р-н, с. Дубровиці

### ПОПУЛЯЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МОНІТОРИНГ УКРАЇНСЬКОЇ ПОПУЛЯЦІЇ БУЙВОЛІВ (*BUBALUS* *BUBALIS*) ЗА 11 МІКРОСАТЕЛІТНИМИ ЛОКУСАМИ ДНК

Наведені результати досліджень генетичного різноманіття вітчизняної популяції буйволів (*Bubalus bubalis*) з використанням 11 мікросателітних локусів (BM1818, BM2113, BM1824, INRA023, ILST006, ETH10, ETH185, ETH225, SPS115, TGLA126, TGLA227), які належать до переліку рекомендованих ISAG для генотипування великої рогатої худоби.

У результаті проведених досліджень було ідентифіковано 73 алельні варіанти та визначено частоти, з якими вони зустрічалися. Середня кількість алелів на локус становила 6,55. Фактична гетерозиготність коливалася в межах від 0,26 (BM2113) до 0,980 (INRA023), у той час як теоретично очікувана була від 0,291 (BM2113) до 0,753 (TGLA227).

Перевищення середнього значення фактичної гетерозиготності над теоретично очікуваною свідчить про наявність надлишку гетерозиготних генотипів у популяції. Це ж підтвердив і індекс фіксації, який характеризує рівень інбридингу особини відносно популяції. В середньому за одинадцятьма локусами він становив 5,5 %. Загалом за половиною з досліджуваних локусів зафіксовано надлишок гетерозиготних генотипів, причому найвищим він був за локусом TGLA126 (34,2 %). Максимальний дефіцит гетерозигот зафіксовано за локусом BM1818 – 27,3 %.

Незважаючи на те, що генетичне дослідження української популяції буйволів проводили за мікросателітними локусами, рекомендованими для дослідження великої рогатої худоби, ефективність їх використання виявилася надзвичайно високою і становила понад 99 %. Найменш ефективним виявився локус BM2113, у той час як ефективність використання локусу INRA023 становила 96 %.

**Ключові слова:** буйволи, генетичне різноманіття, популяція, мікросателітні локуси, алелі.

**Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій.** З настанням 21 сторіччя стрімкий приріст людської популяції зумовив науково-технічні зміни, і тим самим посилювався прямий та опосередкований тиск на різноманіття життя на Землі. У результаті антропогенної дії відбувається інтенсивне знищення флори та фауни. Вважається, що за минуле 20 сторіччя з Землі зникло більше як 1000 видів хребетних тварин. Процес скорочення біологічного різноманіття не обмежується лише дикою природою.

Проблема збереження існуючого біорізноманіття на планеті набула глобального характеру, що спричинило стурбованість міжнародної спільноти, адже резерви генетичної мінливості рослинного і тваринного світу розглядаються у світлі зростання вимог до сортів рослин і порід тварин з погляду їх відповідності щодо зміни споживчого попиту на якість продукції, адаптованості до навколишнього середовища, здатності протистояти хворобам, що виникають в процесі запровадження інтенсивних технологій.

Бурхливий розвиток біотехнології, яка використовує біологічні процеси для одержання високо-ефективних форм організмів з потрібними властивостями, не зменшує, а навпаки збільшує цінність того, що було створено протягом тисячоліть. Особливе місце в збереженні біорізноманіття надається сільському господарству, де актуальним стало збереження генетичних ресурсів тварин. Великі

втрати різноманіття через зникнення порід, яке виявила комісія з генетичних ресурсів тварин у сфері продовольства і сільського господарства (ФАО), привели до розроблення заходів щодо спільних зусиль світового співтовариства зі збереження племінних ресурсів тварин [7].

Зокрема, в останні десятиріччя прийнято низку документів (Глобальний план дій в області генетичних ресурсів тварин та Інтерлакенська декларація, Нагойський протокол щодо доступу до генетичних ресурсів та спільного одержання на справедливій і рівній основі вигод, пов'язаних з їх використанням) [4, 6].

Проблема збереження генетичного різноманіття, племінних генетичних ресурсів тваринництва як складової біоценозу у світі викликає особливе занепокоєння. Наразі ситуація із збереження генетичного різноманіття великої рогатої худоби, овець, кіз, свиней, птиці та буйволів в Україні виглядає плачевно. До сьогодні в Україні відсутні скоординовані дії щодо розведення української популяції буйволів, не розроблено жодної програми за збереження генофонду буйволів і відповідно не виділяються з бюджету кошти на їх збереження, не внесені вони і до реєстру статистичної звітності України, а це означає що буйволів в Україні не існує, хоча всі буйволи ідентифіковані. Незважаючи на те, що від буйволів отримують молоко, м'ясо і використовують їх як тяглову силу, широкого розповсюдження в Україні вони не набули. Основним регіоном з розведення буйволів є карпатський регіон. Проте останніми десятиліттями їх чисельність, у тому числі й у підсобних господарствах, де вони в основному й утримувались, скоротилася, хоча кількість буйволів у світі постійно зростає – у 1961 році кількість буйволів складала 88,32 млн голів, а у 2011 році буйволів вже нараховувалося близько 182 млн. голів, за 50 років кількість буйволів зросла на 93,68 млн голів або 206,1 %. Буйволів розводять на всіх континентах, але основна їх кількість (95,6 %) світового поголів'я знаходиться в країнах Азії. Протягом 50 років (1961–2011 рр.) спостерігається тенденція щорічного збільшення кількості буйволів на 4,12 % [2].

Саме тому дослідження генетичного різноманіття буйволів є особливо актуальним. Одним із методів його вивчення є використання молекулярно-генетичних маркерів, зокрема послідовностей ДНК, поліморфізм яких обумовлений відмінностями в послідовності нуклеотидів різних алелів одного локусу. Одним із таких типів генетичних маркерів є мікросателітні локуси ДНК. Останніми роками генетична характеристика буйволів за використання мікросателітів набула особливого поширення. Це підтверджують численні дослідження іноземних авторів [8, 9, 10].

Незважаючи на ряд існуючих мікросателітних локусів, які використовують для дослідження буйволів, досить ефективним є генетичний аналіз буйволів за використання мікросателітних локусів для великої рогатої худоби [14, 15].

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи – характеристика генофонду популяції буйволів, які розводяться на території України в особистих господарствах Закарпатської обл. та підсобному господарстві монастиря Свято-Покровська Голосіївська пустинь. Комплектацію поголів'ям згаданого господарства проводили за рахунок закупівлі тварин у власників буйволів у Закарпатській обл. з метою подальшого підтримання і збереження біологічного різноманіття домашніх видів тварин.

Для досягнення мети цієї роботи нами були поставлені такі завдання:

– виконати аналіз стану генофонду Української популяції річкових буйволів за 11 мікросателітними локусами;

– провести оцінку генетичного різноманіття (середнє число алелів на локус); рівня гетерозиготності, заінбредованості популяції, їх консолідованості; наявності приватних (специфічних) алелів, індексів  $F_{is}$ ,  $F_{it}$ ,  $F_{st}$ ; генетичної віддаленості між індивідуумами.

**Матеріал і методика досліджень.** Під час експедиційного обстеження 2007–2008 років за лишків водяних буйволів в Україні (Гузєєв Ю.В., Демчук М.П.) відбирали біопробы (вищип з вушної раковини) для подальших генетичних досліджень. Генетичний аналіз 64 голів буйволів здійснювали на базі лабораторії молекулярної генетики і цитогенетики тварин Центру біотехнології і молекулярної діагностики Державної наукової установи Всеросійський науково-дослідний інститут тваринництва. Відбір зразків у тварин для досліджень проводили за життя, відбираючи біопроб з вушної раковини (вищип тканини) для досліджень ДНК. Геномну ДНК виділяли за методикою Н.А. Зінов'євої та співавт. [3].

Для аналізу було обрано 11 мікросателітних локусів (BM1818, BM2113, BM1824, INRA023, ILST006, ETH10, ETH185, ETH225, SPS115, TGLA126, TGLA227), які належать до переліку реко-

мендованих ISAG для генотипування великої рогатої худоби. Розділення продуктів ампліфікації проводили шляхом капілярного електрофорезу на приладі Mega Base500. Для ідентифікації алелів досліджуваних мікросателітних локусів використовували програму MegaBase GeneticProfiler 2.0.

Під час проведення досліджень визначали частоти ідентифікованих алелів, кількість алелів на локус ( $N_a$ ), фактичну ( $H_o$ ) і теоретично очікувану ( $H_e$ ) гетерозиготність, індекс поліморфізму (PIC), індекс фіксації (F), вірогідність виключення випадкового збігу алелів (PE). Для статистичної обробки даних використовували програмне забезпечення PowerStats V12 (Promega), GENALEX 6 [13].

Стандартні відхилення для ознак, виражених у відсотках, знаходили за формулою:

$$\sigma = \sqrt{p \times q},$$

де  $p$  і  $q$  – частоти ознак.

Помилку середньої знаходили за формулою:

$$Mx = \sigma / \sqrt{n},$$

де  $n$  – число значень ознаки.

Достовірність різниці між ознаками визначали на основі порівняння коефіцієнта достовірності ( $T_d$ ) з коефіцієнтами за таблицею Стьюдента.

За проведення популяційно-генетичних досліджень визначали такі показники: алельні профілі, включаючи мінімальне, максимальне і середнє число алелів, частоти алелів, число інформативних алелів, число ефективних алелів, число та частоти видоспецифічних алелів. Частоти алелів розраховували окремо для кожного локусу за такою формулою:

$$p_i = (2 \times N_{ii} + N_{iy}) / (2 \times N), \quad (I)$$

де  $p_i$  – частота I-го алеля;

$N_{ii}$  – число тварин, гомозиготних за I-им алелем;

$N_{iy}$  – число тварин, гетерозиготних за I-им алелем ( $y$  – будь-який інший алель);

$N$  – число голів у вибірці.

Число інформативних алелів розраховували як число алелів у популяції з частотою більше 5 %.

Число ефективних алелів – це число алелів, що зустрічаються з рівною частотою в ідеальній популяції, яке необхідно для отримання гомозиготності такого ж ступеня, або генетичного різноманіття в реальній популяції, розраховували за формулою:

$$Ne = 1 / (1 - He), \quad (II)$$

Де  $Ne$  – число ефективних алелів у популяції,

$He$  – очікуваний ступінь гомозиготності.

Число видоспецифічних алелів розраховували як і число алелів, які зустрічаються тільки у одній з досліджуваних субпопуляцій (груп).

Генетичну консолідованість популяції буйволів оцінювали на основі аналізу розділення популяції за D. Paetkau зі співавт. [11].

Для кожного зразка розраховували очікувану частоту генотипу в кожному локусі, враховуючи випадковий характер спаровування в середині популяції, переводили в логарифм з метою отримання логарифмічного значення схожості.

Спостережуваний ступінь гетерозиготності ( $H_o$ ): розраховували для кожного локусу як відношення числа гетерозигот до загальної кількості досліджуваних тварин. Для розрахунку  $H_o$  індивідууму знаходили середнє арифметичне значення  $H_o$  за всіма досліджуваними локусами МС.

Очікуваний ступінь гетерозиготності ( $He$ ) розраховували для кожного локусу, використовуючи таку формулу:

$$He = 1 - \sum p_i^2, \quad (III)$$

де  $p_i$  – частота II-го алеля.

Для розрахунку  $He$  індивідууму знаходили середнє арифметичне значення  $He$  за всіма локусами МС.

Індекс фіксації  $F_{is}$ : коефіцієнт інбридингу в індивідуумів відносно субпопуляції (групи) слугує мірою вимірювання зниження рівня гетерозиготності індивідууму внаслідок невідповідного спаровування в середині групи тварин. Для розрахунку використовували формулу:

$$F_{is} = (He - H_o) / He \quad (IV)$$

Генетичні дистанції (*NEI*) розраховували за Nei M. [10], статистичну обробку даних проводили за Б. Вейр [1], використовували програмне забезпечення MSExcel, GenAlEx 6.0, PAST [13].

**Результати досліджень та їх обговорення.** У результаті проведених досліджень було ідентифіковано 73 алельні варіанти та визначено частоти, з якими вони зустрічалися (табл. 1).

Таблиця 1 – Частоти ідентифікованих алелів в українській популяції буйволів

Локус	Алель (частота)												
	256 (0,070)	260 (0,020)	264 (0,020)	266 (0,040)	268 (0,740)	272 (0,010)	274 (0,050)	280 (0,050)					
BM1818													
BM2113	127 (0,150)	129 (0,830)	133 (0,020)										
BM1824	176 (0,070)	178 (0,220)	180 (0,050)	182 (0,040)	188 (0,070)	190 (0,020)	192 (0,530)						
INRA023	202 (0,070)	206 (0,370)	208 (0,040)	210 (0,030)	212 (0,200)	214 (0,290)							
ILST006	287 (0,010)	289 (0,050)	291 (0,100)	295 (0,230)	297 (0,030)	299 (0,530)	301 (0,010)	305 (0,040)					
ETH10	209 (0,290)	215 (0,130)	217 (0,460)	219 (0,040)	221 (0,060)	223 (0,020)							
ETH185	234 (0,010)	236 (0,280)	240 (0,170)	242 (0,540)									
ETH225	140 (0,450)	144 (0,050)	148 (0,030)	150 (0,160)	152 (0,150)	154 (0,010)	156 (0,020)	158 (0,110)	164 (0,020)				
SPS115	250 (0,420)	254 (0,140)	256 (0,270)	260 (0,010)	264 (0,160)								
TGLA126	115 (0,190)	117 (0,350)	125 (0,430)	127 (0,030)									
TGLA227	71 (0,130)	73 (0,030)	75 (0,340)	77 (0,340)	79 (0,020)	81 (0,020)	85 (0,010)	89 (0,010)	91 (0,060)	95 (0,010)	97 (0,020)	99 (0,010)	

Кількість алелів на локус коливалася від 3 (BM2113) до 12 (TGLA227). Середня кількість алелів на локус становила 6,55 (табл. 2).

Таблиця 2 – Генетична характеристика української популяції буйволів за мікросателітними локусами ДНК

Локус	Кількість алелів	Фактична гетерозиготність	Теоретично очікувана гетерозиготність	Індекс фіксації	Індекс поліморфізму	Вірогідність виключення випадкового збігу алелів
BM1818	8	0,320	0,444	0,273	0,426	0,072
BM2113	3	0,260	0,291	0,098	0,257	0,048
BM1824	7	0,480	0,663	0,269	0,620	0,171
INRA023	6	0,980	0,739	-0,340	0,687	0,960
ILST006	8	0,740	0,658	-0,137	0,611	0,493
ETH10	6	0,900	0,689	-0,320	0,633	0,795
ETH185	4	0,740	0,607	-0,231	0,534	0,493
ETH225	9	0,760	0,740	-0,037	0,704	0,527
SPS115	5	0,600	0,713	0,149	0,656	0,291
TGLA126	4	0,880	0,662	-0,342	0,587	0,755
TGLA227	12	0,740	0,753	0,008	0,708	0,493
Середнє значення	6,55	0,673	0,633	-0,055	0,584	-
Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелів						0,999939

Фактична гетерозиготність коливалася в межах від 0,260 (BM2113) до 0,980 (INRA023), у той час як теоретично очікувана – від 0,291 (BM2113) до 0,753 (TGLA227). Перевищення середнього значення фактичної гетерозиготності над теоретично очікуваною свідчить про наявність надлишку гетерозиготних генотипів у популяції. Це ж підтвердив і індекс фіксації, який характеризує рівень інбридингу особи відносно популяції. В середньому за одинадцятьма локусами

ми він становив 5,5 %. Загалом за половиною з досліджуваних локусів зафіксовано надлишок гетерозиготних генотипів, причому найвищим він був за локусом TGLA126 (34,2 %). Максимальний дефіцит гетерозигот зафіксовано за VM1818 – 27,3 %.

Згідно з Botstein D. та ін. [5], локуси зі значенням  $PIC > 0,500$  є високополіморфними,  $PIC$  в межах 0,250–0,500 характеризує помірно поліморфні локуси, а якщо  $PIC < 0,250$ , то маркери є низькополіморфними. В середньому за досліджуваними локусами популяція виявилася високополіморфною ( $PIC = 0,584$ ). Виняток становили локуси VM1818, VM2113 та ETH185, для яких було зафіксовано середній рівень поліморфізму. Найбільш поліморфним у досліджуваній популяції був локус TGLA227.

Аналіз вірогідності виключення випадкового збігу алелів дозволив провести оцінку ефективності використання мікросателітних локусів для проведення генетичної експертизи походження. Незважаючи на те, що генетичне дослідження української популяції буйволів проводили за мікросателітними локусами, рекомендованими для дослідження великої рогатої худоби, ефективність їх використання виявилася надзвичайно високою і становила понад 99 %. Найменш ефективним виявився локус VM2113, у той час як ефективність використання локусу INRA023 становила 96 %.

Згідно зі схемою філогенетичного дерева (рис. 1), за розгляду їхніх зв'язків з походженням, доцільно відмітити, що інбредні тварини на плідників фенотипово більш подібні з родоначальником, а за кількістю локусів та алелів у популяції спостерігається генетичне різноманіття.

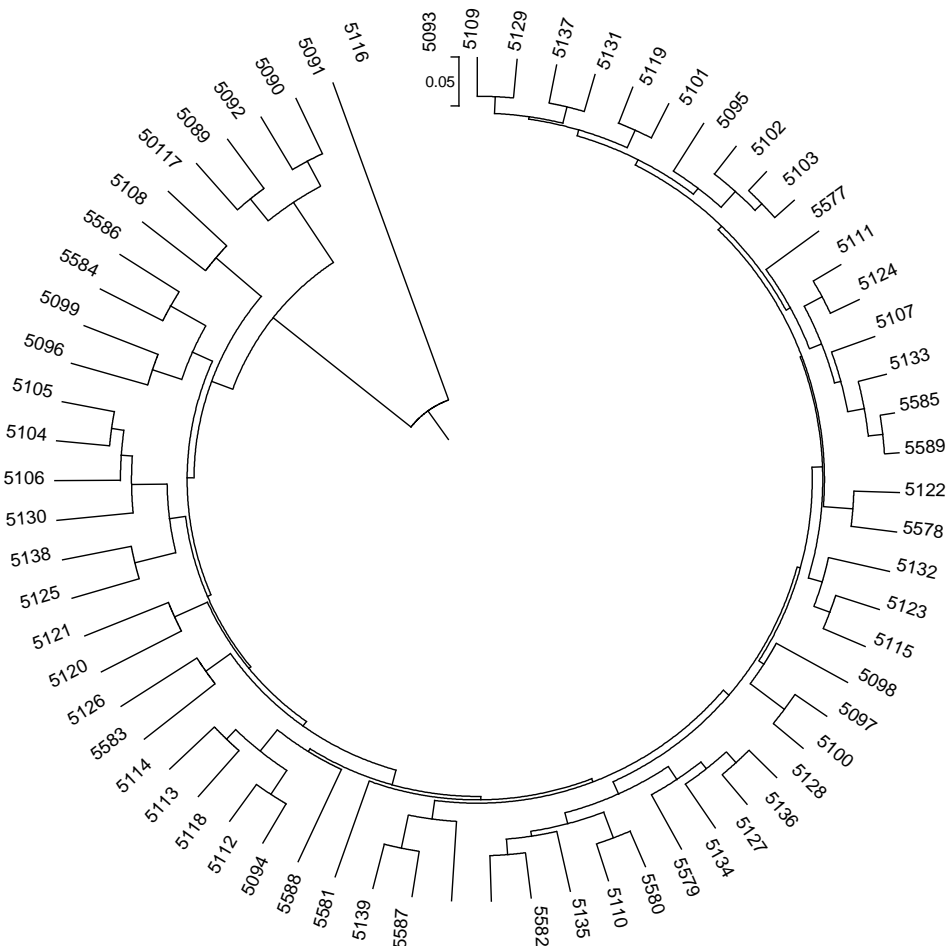


Рис. 1. Філогенетичне дерево української популяції буйволів.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Проблема, яка виникла на сьогодні в Україні щодо розведення буйволів, на жаль, залишається невирішеною. Незважаючи на високу якість молока та м'яса, які отримують від буйволів, їх кількість в нашій країні залишається мізерною.

У результаті проведених генетичних досліджень української популяції буйволів звуження генетичного різноманіття не зафіксовано. Використання мікросателітних локусів, які рекомендовані для генетичного аналізу великої рогатої худоби, показали високий рівень поліморфізму у буйволів, що підтверджує результати досліджень інших авторів. Ефективність використання наведеного переліку мікросателітів виявилася надзвичайно високою, що свідчить про доцільність їх застосування для генетичного аналізу буйволів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вейр Б. Анализ генетических данных / Б. Вейр; пер. с англ. Д.В. Зайкина, А.И. Пудовкина, А.Н. Татаренкова. – М.: Мир, 1995. – 400 с.
2. Гузєєв Ю. Буйволи – унікальне біорізноманіття великої рогатої худоби України / Ю. Гузєєв // Тваринництво України. – 2014. – № 3–4. – С. 5–8.
3. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве / [Зиновьева Н.А., Попов А.П., Эрнст Л.К. и др.] – Дубровицы: ВИЖ, 1998. – 47 с.
4. Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity: Text and Annex / Secretariat of the Convention on Biological Diversity. – Montreal: Convention on Biological Diversity United Nations, 2011. – 25 p.
5. Construction of a genetic link age map in manusing restriction fragment length polymorphisms // The American Journal of Human Genetics. – 1980. – Vol. 32 (3). – P. 314–331.
6. Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration: adopted by the International Technical Conference on Animal Genetic Resources for Food and Agriculture Interlaken, Switzerland, 3–7 September 2007. – Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2007. – 37 p.
7. Animal Genetic Resources for Food and Agriculture: the State of the World's; edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. – Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, 2007. – 512 p.
8. Genetic variation and relationships among Turkish waterbuffalo populations / M. Gargani, L. Pariset, M.I. Soysal [et al.] // Animal Genetics. – 2010. – Vol. 41. – P. 93–96.
9. Jaayid T.A. Genetic diversity and conservation of animal genetic resources in Iraqi buffalo using microsatellite markers / T.A. Jaayid, M.A.K. Dragh // Buffalo Bulletin. – 2014. – Vol. 33 (3). – P. 271–276.
10. Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds / S. Kumar, J. Gupta, N. Kumar [et al.] // Molecular Ecology. – 2006. – Vol. 15. – P. 593–600.
11. Nei M. Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution / M. Nei, R. Koehn // Evolution Genes and Proteins. – 1983. – P. 165–190.
12. Paetkau D. Genetic assignment methods for the direct, real time estimation of migration rate: a simulation-base exploration of accuracy and power / D. Paetkau, R. Slade, M. Burdens // Molecular Ecology. – 2004. – Vol. 13. – P. 55–65.
13. Peakall R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetics teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 288–295.
14. Analysis of Genetic Diversity of the Thai Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Using Cattle Microsatellite DNA Markers / K. Triwitayakorn, B. Moolmuang, S. Sraphet [et al.] // Asian-Australasian Journal of Animal sciences. – 2009. – Vol. 19. – P. 617–621.
15. Applicability of bovine microsatellite markers for population genetic studies on African buffalo (*Syncerus caffer*) / W.F. Van Hooft, O. Hanotte, P.W. Wenink [et al.] // Animal Genetics. – 1999. – Vol. 30. – P. 214–220.

#### REFERENCES

1. Vejr B. Analiz geneticheskikh dannyyh / B. Vejr; per. s angl. D.V. Zajkina, A.I. Pudovkina, A.N. Tatarenkova. – М.: Mir, 1995. – 400 s.
2. Guzjejev Ju. Bujvoly – unikal'ne bioriznomanittja velykoi' rogotoi' hudoby Ukrai'ny / Ju. Guzjejev // Tvarynnnyctvo Ukrai'ny. – 2014. – № 3–4. – S. 5–8.
3. Metodicheskie rekomendacii po ispol'zovaniju metoda polimeraznoj cepnoj reakcii v zhivotnovodstve / [Zinov'eva N.A., Popov A.P., Jernst L.K. i dr.] – Dubrovicy: VIZh, 1998. – 47 s.
4. Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity: Text and Annex / Secretariat of the Convention on Biological Diversity. – Montreal: Convention on Biological Diversity United Nations, 2011. – 25 p.
5. Construction of a genetic link age map in manusing restriction fragment length polymorphisms // The American Journal of Human Genetics. – 1980. – Vol. 32 (3). – P. 314–331.
6. Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration: adopted by the International Technical Conference on Animal Genetic Resources for Food and Agriculture Interlaken, Switzerland, 3–7 September 2007. – Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2007. – 37 p.
7. Animal Genetic Resources for Food and Agriculture: the State of the World's; edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. – Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, 2007. – 512 p.
8. Genetic variation and relationships among Turkish waterbuffalo populations / M. Gargani, L. Pariset, M.I. Soysal [et al.] // Animal Genetics. – 2010. – Vol. 41. – P. 93–96.
9. Jaayid T.A. Genetic diversity and conservation of animal genetic resources in Iraqi buffalo using microsatellite markers / T.A. Jaayid, M.A.K. Dragh // Buffalo Bulletin. – 2014. – Vol. 33 (3). – P. 271–276.

10. Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds / S. Kumar, J. Gupta, N. Kumar [et al.] // *Molecular Ecology*. – 2006. – Vol. 15. – P. 593–600.
11. Nei M. Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution / M. Nei, R. Koehn // *Evolution Genes and Proteins*. – 1983. – P. 165–190.
12. Paetkau D. Genetic assignment methods for the direct, real time estimation of migration rate: a simulation-base exploration of accuracy and power / D. Paetkau, R. Slade, M. Burdens // *Molecular Ecology*. – 2004. – Vol. 13. – P. 55–65.
13. Peakall R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetics teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – Vol. 6. – P. 288–295.
14. Analysis of Genetic Diversity of the Thai Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Using Cattle Microsatellite DNA Markers / K. Triwitayakorn, B. Moolmuang, S. Sraphet [et al.] // *Asian-Australasian Journal of Animal sciences*. – 2009. – Vol. 19. – P. 617–621.
15. Applicability of bovine microsatellite markers for population genetic studies on African buffalo (*Syncerus caffer*) / W.F. Van Hooft, O. Hanotte, P.W. Wenink [et al.] // *Animal Genetics*. – 1999. – Vol. 30. – P. 214–220.

**Популяционно-генетический мониторинг украинской популяции буйволов (*Bubalus bubalis*) за 11 микросателлитными локусами ДНК**

**Ю. В. Гузеев, О. В. Мельник, О. О. Гладырь, Н. А. Зиновьева**

Приведены результаты исследований генетического разнообразия отечественной популяции буйволов (*Bubalus bubalis*) с использованием 11 микросателлитных локусов ДНК (BM1818, BM2113, BM1824, INRA023, ILST006, ETH10, ETH185, ETH225, SPS115, TGLA126, TGLA227), которые рекомендованы ISAG для генотипирования крупного рогатого скота.

В результате проведенных исследований было идентифицировано 73 аллельных варианта и определено частоты, с которыми они встречаются, среднее количество аллелей на локус составило 6,55. Значение наблюдаемой гетерозиготности колебалось в пределах от 0,260 (BM2113) до 0,980 (INRA023), ожидаемой – от 0,291 (BM2113) до 0,753 (TGLA227). За всеми локусами, кроме BM1818, ETH185 и BM2113, установлен высокий уровень полиморфизма. Наиболее полиморфным оказался локус TGLA227. Несмотря на ограниченную численность поголовья буйволов, в исследуемой популяции зафиксирован избыток гетерозиготных генотипов на уровне 5,5 %, что свидетельствует об отсутствии сокращения генетического разнообразия в ней. Наибольший избыток гетерозиготных генотипов установлен за локусом TGLA126 – 34,2 %, в то время как за BM1818 зафиксирован максимальный дефицит гетерозигот – 27,3 %.

Превышение среднего значения фактической гетерозиготности над теоретически ожидаемой свидетельствует о наличии избытка гетерозиготных генотипов в популяции. Это же подтвердил и индекс фиксации, который характеризует уровень инбридинга особи по отношению к популяции. В среднем по одиннадцати локусах он составил 5,5 %. В целом по половине из исследуемых локусов зафиксирован избыток гетерозиготных генотипов, причем самым высоким он был по локусу TGLA126 (34,2 %). Максимальный дефицит гетерозигот зафиксировано по локусу BM1818 – 27,3 %.

Несмотря на то, что генетические исследования украинской популяции буйволов проводили с использованием микросателлитных локусов, рекомендованных для генотипирования крупного рогатого скота, эффективность их использования для генетического анализа буйволов оказалась достаточно высокой и составила более 99 %.

**Ключевые слова:** буйволы, генетическое разнообразие, популяция, микросателлитные локусы, аллели.

**Population-genetic monitoring of the Ukrainian population of buffaloes (*Bubalus bubalis*) using 11 microsatellite DNA loci**

**Yu. V. Guzeyev, O. Melnyk, O. Gladyr, N. Zinovyeva**

The problem of preservation of existing biodiversity on the Earth has acquired the global nature that has caused concern of the international community. A special place in biodiversity conservation is given to agriculture where the preservation of genetic resources of livestock breeding as a part of the biological community in the world has become actual.

Whereas in Ukraine for the preservation of genetic diversity of cattle there are programs designed for several years, the situation with buffaloes seems to be worse. The number of buffaloes in the world is constantly increasing. In 1961 the number of buffaloes was 88.32 million head, in 2011 there were already about 182 million heads, for 50 years the number of buffaloes increased to 93.68 million heads or by 206.1 %. Buffaloes are bred on all continents, but most of them – 95 % of the total livestock population – are in Asian countries. For 50 years (1961–2011) the trend of annual increase in the number of buffalo by 4.12 % has been observed.

Therefore, the study of genetic diversity of buffaloes is particularly important. A way of its studying is using molecular genetic markers, including sequences of DNA, the polymorphism of which is caused by differences in the nucleotide sequences of different alleles at one locus. One of these types of genetic markers is microsatellite DNA loci. Recent years genetic characteristics of buffaloes by using microsatellite acquired special distribution.

Despite a number of existing microsatellite loci used for the research of buffaloes genetic analysis by using microsatellite loci for cattle is very efficient.

11 microsatellite loci (BM1818, BM2113, BM1824, INRA023, ILST006, ETH10, ETH185, ETH225, SPS115, TGLA126, TGLA227) included in the list are recommended by ISAG for genotyping of cattle were selected for the analysis.

Genetic analysis of 64 buffaloes was conducted at the Laboratory of Molecular Genetics and Cytogenetics of animals of the Center of Biotechnology and Molecular Diagnostics of the State Scientific Institution Russian Research Institute of livestock. Sampling for animal studies was performed *in vivo*, by select in samples from ears (plucking tissue) for studies of DNA.

As a result of the research 73 allelic variants were identified and the frequency they met with was determined. The number of alleles by locus varied from 3 (BM2113) to 12 (TGLA227). The average number of alleles by locus was 6.55.

The actual heterozygote varied from 0.260 (BM2113) to 0.980 (INRA023), while the theoretically expected one varied from 0.291 (BM2113) to 0.753 (TGLA227).

The excess of the average value of the actual heterozygote theoretically expected indicates the surplus of heterozygous genotypes in the population. This is confirmed by the fixation index, which reflects the level of inbreeding of the individuals in relation to the population. On average it was 5.5 % for the eleven loci. Overall, half of the studied loci recorded a surplus of heterozygous genotypes with the highest level for the locus TGLA126 (34.2 %). The maximum deficit of heterozygotes was observed in BM1818 (27.3 %).

Loci with the value  $PIC > 0.500$  are highly polymorphic,  $PIC$  within 0.250–0.500 characterizes moderately polymorphic loci and if the value is  $PIC < 0.250$  markers are lowly polymorphic. On average after the studied loci the population was highly polymorphic ( $PIC = 0.584$ ). Exceptions were loci BM1818, BM2113 and ETH185, which recorded the average polymorphism. The locus TGLA227 was the most polymorphic in the studied population.

The analysis of probability of exclusion of casual coincidence of alleles allowed to assess the efficiency of using the microsatellite loci for the genetic examination of the origin. Despite the fact that the genetic study of the Ukrainian population of buffaloes was conducted on microsatellite loci recommended for studying cattle, the effectiveness of their use was extremely high and amounted to 99.99 %. The locus BM2113 was the least effective, while the efficiency of INRA 023 was 96 %.

As a result of the genetic studies of the Ukrainian population of buffaloes narrowing of genetic diversity is not fixed. Using microsatellite loci recommended for genetic analysis of cattle showed high level of polymorphism among buffaloes. The efficiency of using the mentioned list of microsatellites was extremely high, what indicating the suitability of their application for genetic analysis of buffaloes.

**Key words:** buffalo, genetic diversity, population, microsatellite loci, alleles.

*Надійшла 18.04.2016 р.*