

УДК 636.2.033/.082.2(1-13)

КРАМАРЕНКО О.С., аспірант

Науковий керівник – ГИЛЬ М.І., д-р с.-г. наук

Миколаївський національний аграрний університет

KSSNAIL@mail.ru

## АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ ЗА ЛОКУСАМИ МІКРОСАТЕЛІТІВ ХУДОБИ ПІВДЕННОЇ М'ЯСНОЇ ПОРОДИ

У роботі надано результати аналізу ступеня генетичної диференціації між різними підтипами корів південної м'ясної породи («санта-гертруда» та «зебу») на підставі поліморфізму локусів 12 мікросателітів (TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA122, INRA23, TGLA126, BM1818, ETH3, ETH225 та BM1824). Встановлено, що за кількістю алелів (у т.ч. «унікальних») ці підтипи не відрізняються між собою. Серед досліджених тварин південної м'ясної породи в цілому спостерігається суттєва нестача гетерозигот. Оцінка індексу генетичної диференціації ( $F_{st} = 0,053 \pm 0,013$ ) свідчить про наявність значних генетичних відмінностей між ними за частотами алелів для більшості локусів. Ступінь генетичної унікальності (консолідації) для окремих підтипів складає біля 86 %.

**Ключові слова:** мікросателіти, поліморфізм, генетична диференціація, південна м'ясна порода.

**Постановка проблеми.** Південна м'ясна порода великої рогатої худоби (ВРХ) була створена в результаті поєднання генетичного матеріалу порід шортгорн, санта-гертруда, герефорд, шароле та кубинський зебу [1]. При цьому, аналіз генетичного різноманіття породи було проведено лише з використанням імуногенетичних маркерів та деяких структурних генів [1, 2]. В масиві тварин таврійського типу стада ДПДГ «Асканійське» (Каховський район, Херсонська область) виділяють два підтипи – низькокровний («санта-гертруда») та висококровний («зебу»). Але визначення ступеня генетичної диференціації між ними з використанням надваріабельних ділянок ДНК (мікросателітів) проведено ще не було.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Мікросателіти – короткі тандемні олігонуклеотидні повтори завдовжки 1–8 пар нуклеотидів. Завдяки високому ступеню поліморфізму, кодомінантному типу успадкування, відомій локалізації в геномі вони дають змогу вирішувати широкий спектр теоретичних і практичних завдань у селекційній роботі, а також розробляти питання маркер-допоміжної селекції [3]. Наразі вони набувають все більшого застосування при вивченні рівня генетичної мінливості та генетичної диференціації різних порід свійських тварин: свиней [4, 5], коней [6, 7], великої рогатої худоби [8, 9] та ін.

**Мета і завдання дослідження.** Таким чином, основною метою дослідження було визначення ступеня генетичної диференціації між тваринами різних підтипів південної м'ясної породи. Завданнями дослідження було: на підставі 12 локусів мікросателітів визначити кількість алелів (у т.ч. «унікальних») у тварин різних підтипів; оцінити індекси фіксації *S*. Райта (*F<sub>is</sub>*, *F<sub>st</sub>*, *F<sub>it</sub>*) як для різних локусів окремо, так і в цілому; провести аналіз молекулярної мінливості (AMOVA) та оцінити рівень генетичної диференціації ( $\Phi_{st}$ ) між різними підтипами; на підставі Assignment-тесту визначити ступінь генетичної унікальності (консолідації) тварин різних підтипів.

**Матеріал і методика дослідження.** Біоматеріал для лабораторного дослідження (вушні вищипи) було відібрано від корів південної м'ясної породи ( $n = 192$  голови) стада ДПДГ «Асканійське» НААН України (Каховський район Херсонської області). З них 100 голів належало до низькокровного підтипу («санта-гертруда»), а 92 – до висококровного («зебу»).

Лабораторні дослідження було проведено в умовах лабораторії молекулярної генетики тварин Центру біотехнології та молекулярної діагностики тварин ВІТ ім. Л.К. Ернста (РФ).

Екстракцію ДНК проводили на колонках Nexttec (Nexttec Biotechnologie GmbH, Germany) згідно з рекомендаціями виробника і перхлоратним методом – за методиками ВІТ ім. Л.К. Ернста. Аналіз ДНК і постановку ПЛР проводили згідно з методичними розробками Центру біотехнології і молекулярної діагностики ВІТ [3].

У дослідженнях використовували наступні локуси мікросателітів: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA122, INRA23, TGLA126, BM1818, ETH3, ETH225, BM1824. Для

їх аналізу виконували одну мультиплексну ПЛР, що дозволяла діагностувати поліморфізм всіх локусів одночасно.

Аналіз ампліфікованих фрагментів здійснювали за допомогою приладу для капілярного електрофорезу ABI 3130xl (Applied Biosystems, США). Для ідентифікації алелів мікросателітних локусів використовували програму GeneMapper ID v. 3.2.

Обробку даних капілярного електрофорезу проводили шляхом переведення довжин фрагментів у числове вираження на підставі порівняння їх рухливості зі стандартом ДНК.

Оскільки як для різних локусів, так і для різних підтипів було проаналізовано різну кількість особин, оцінку кількості алелів (та «унікальних» алелів) було проведено на підставі rarefaction-методу (для вибірки, що складається зі 100 випадково обраних особин) за допомогою програми HP-Rare [10].

Ступінь відмінностей між тваринами різних підтипів за частотами алелів 12 локусів мікросателіт було розраховано з використанням критерію Хі-квадрат К. Пірсона із визначенням рівня значущості на підставі методу Монте-Карло. Всі розрахунки було проведено з використанням програми PAST [11].

Індекси фіксації (або F-статистики С. Райта), що дозволяють визначити ступінь генетичної диференціації, було розраховано на підставі методу, запропонованому у роботі [12] як для кожного локусу окремо, так і для всіх локусів у цілому з використанням програми FSTAT [13].

Аналіз молекулярної мінливості (AMOVA) із визначенням рівня значущості оцінки  $\Phi_{st}$  на підставі permutation-методу (використано 999 перестановок) та Assignment-тест на підставі мультилокусних генотипів тварин було проведено за алгоритмом [14] з використанням програми GenAIEx [15].

**Результати дослідження та їх обговорення.** Кількість алелів (у перерахунку на 100 випадково обраних особин) значно варіює як для тварин різних підтипів, так і для різних локусів (табл. 1). Найвище алельне різноманіття відмічено для тварин низькокривного підтипу за локусом TGLA53 (11,68), а найнижче – для тварин висококривного підтипу за локусом TGLA126 (4,00).

Таблиця 1 – Кількість алелів та «унікальних» алелів, розрахованих на підставі rarefaction-методу ( $n = 100$ ) для 12 локусів мікросателітів корів південної м'ясної породи різних підтипів

Локус	Підтип			
	низькокривний		висококривний	
	алелів	у т.ч. «унікальних»	алелів	у т.ч. «унікальних»
TGLA227	9,65	0,94	13,00	4,29
BM2113	7,50	1,09	8,58	2,17
TGLA53	11,68	1,90	10,96	1,18
ETH10	7,37	0,60	7,44	0,67
SPS115	7,22	1,09	6,43	0,30
TGLA122	7,94	0,00	8,54	0,61
INRA23	8,42	0,10	9,89	1,57
TGLA126	5,00	3,00	4,00	2,00
BM1818	7,87	1,01	7,41	0,55
ETH3	9,50	2,08	9,43	2,02
ETH225	10,00	2,00	11,00	3,00
BM1824	6,50	1,19	5,99	0,68
В цілому	8,22 ± 0,51	1,25 ± 0,25	8,56 ± 0,72	1,59 ± 0,34

В цілому, тварини різних підтипів вірогідно не відрізнялися за кількістю алелів – 8,22 та 8,56 алелів на локус, відповідно (непараметричний парний критерій Уїлкоксона:  $p < 0,05$ ).

Кількість «унікальних» алелів була найвищою серед корів висококривного підтипу для локусу TGLA227 (4,29), а найнижчою – серед ровесниць іншої дослідної групи для локусу TGLA122 (0,00). У цілому, кількість «унікальних» алелів була дещо вищою серед тварин висококривного підтипу (1,59 та 1,25 «унікальних» алелів на локус, відповідно), але ця різниця не була вірогідною (непараметричний парний критерій Уїлкоксона:  $p < 0,05$ ).

Незважаючи на однакову кількість (у т.ч. «унікальних») алелів, що була відмічена серед корів південної м'ясної породи різного походження, отримані оцінки критерію Хі-квадрат Пірсона дозволяють стверджувати про високовірогідні відмінності (для 11 локусів із 12 використаних в аналізі) стосовно їх розподілу за частотами (табл. 2).

Таблиця 2 – Ступінь генетичної диференціації між підтипами південної м'ясної породи на підставі частот алелів за 12 локусами мікросателітів

Локус	<i>df</i>	$\chi^2$	<i>p</i>
TGLA227	14	40,14	< 0,001
BM2113	9	80,68	< 0,001
TGLA53	12	46,99	< 0,001
ETH10	8	35,27	< 0,001
SPS115	7	16,88	< 0,05
TGLA122	8	81,38	< 0,001
INRA23	9	73,59	< 0,001
TGLA126	6	8,44	<i>ns</i>
BM1818	8	101,17	< 0,001
ETH3	12	38,38	< 0,001
ETH225	12	33,66	< 0,001
BM1824	7	84,92	< 0,001

Примітка: *ns* – різниця не вірогідна.

Лише за локусом TGLA126 співвідношення частот окремих алелів було однаковим серед тварин низько- та висококрівного підтипів. Але це може бути зумовлено невеликою кількістю особин, що було проаналізовано за цим локусом та, відповідно, низькими оцінками їх алельного різноманіття.

Середні значення індексів С. Райта (*Fis* та *Fit*) мають позитивний знак та вірогідно відхиляються від нуля, що свідчить про значний рівень інбредності тварин. Особливо, це стосується мікросателітних локусів ETH3, TGLA53 та ETH225 (табл. 3).

Таким чином, серед досліджених тварин південної м'ясної породи спостерігається значна нестача гетерозигот, що проявляється у вірогідних оцінках індексу фіксації.

Таблиця 3 – Індеси С. Райта (за Weir, Cockerham, 1984) для 12 локусів мікросателітів корів південної м'ясної породи різних підтипів

Локус	<i>f</i> (=Fis)	$\Theta$ (=Fst)	<i>F</i> (=Fit)
TGLA227	0,205	0,024	0,186
BM2113	0,057	0,102	-0,051
TGLA53	0,502	0,067	0,466
ETH10	0,018	0,027	-0,010
SPS115	0,037	0,008	0,029
TGLA122	0,068	0,086	-0,020
INRA23	0,059	0,053	0,007
TGLA126	-0,018	-0,020	0,002
BM1818	0,064	0,088	-0,027
ETH3	0,432	0,037	0,410
ETH225	0,771	0,015	0,767
BM1824	0,228	0,138	0,104
$\bar{X} \pm Sx$	0,210 ± 0,075	0,053 ± 0,013	0,166 ± 0,082
95% CI*	[0,083; 0,358]	[0,030; 0,077]	[0,029; 0,326]

Примітка: 95% CI – 95% довірчий інтервал.

З іншого боку, тварини низько- та висококрівного підтипів характеризуються незначним, але вірогідним рівнем генетичної диференціації (для 12 локусів в середньому:  $Fst = 0,053 \pm 0,013$ ). При цьому, найвищий вклад в цю генетичну диференціацію вносять локуси BM1818, BM2113 та BM1824.

Результати аналізу молекулярної мінливості (AMOVA) свідчать про те, що на 8,9 % генотипова мінливість тварин південної м'ясної породи зумовлена їх походженням (тобто, належністю до двох підтипів), а на 81,1 % – індивідуальними відмінностями між тваринами (табл. 4). Але незважаючи на таке низьке значення, генетична диференціація між тваринами південної м'ясної породи низько- та висококрівного підтипів має високий рівень значущості ( $p < 0,001$ ).

Таким чином, тварини різного походження значно відрізняються за своєю генетичною структурою.

Таблиця 4 – Результати аналізу молекулярної мінливості (AMOVA) між різними підтипами корів південної м'ясної породи на підставі поліморфізму за 12 локусами мікросателітів

Джерело мінливості	SS	df	MS	E(MS)	$\Phi_{st}$	p
Між підтипами	110,411	1	110,411	1,041		
Всередині підтипів	2018,952	190	10,626	10,626	0,089	0,001
Загальна	2129,363	191	121,037	11,667		

На підставі емпіричного розподілу мультилокусних генотипів, результати Assignment-тесту свідчать про те, що в цілому точність прогнозу щодо віднесення певної тварини до низько- чи висококрівного підтипу складає біля 86 % (табл. 5).

Таблиця 5 – Результати Assignment-тесту між різними підтипами корів південної м'ясної породи на підставі поліморфізму за 12 локусами мікросателітів

Фактично	Теоретично		Точність прогнозу
	низькокрівний	висококрівний	
Низькокрівний	88	12	88,0 %
Висококрівний	14	78	84,8 %

Це свідчить про достатньо високий рівень генетичної унікальності (та, відповідно, консолідованості) тварин, що належать до різних підтипів.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** На підставі поліморфізму 12 локусів мікросателітів та ступеня генетичної диференціації між двома підтипами корів південної м'ясної породи встановлено, що за кількістю алелів (у т.ч. «унікальних») ці підтипи не відрізняються між собою. Індекс генетичної диференціації свідчить про наявність значних генетичних відмінностей між ними за частотами алелів для більшості локусів. Ступінь генетичної унікальності (консолідації) для окремих підтипів складає біля 86 %.

Перспективою подальших досліджень є вивчення ступенів генетичної диференціації за локусами мікросателітів, на підставі частот алелів для різних підтипів м'ясних порід.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. М'ясне скотарство в степовій зоні України / [Вдовиченко Ю.В., Вороненко В.І., Найдюнова В.О. та ін.]. – Нова Каховка: ПІЕЛ, 2012. – 307 с.
2. Копилова К.В. Особливості генетичної структури різних порід великої рогатої худоби за локусами кількісних ознак (QTL) / К.В. Копилова, К.В. Копилов, К.О. Арнаут // Науковий вісник Національного університету біоресурсів та природокористування України. – 2009. – Вип. 138. – С. 239–246.
3. Зиновьева Н.А. Генетическая экспертиза сельскохозяйственных животных: применение тест-систем на основе микросателлитов / Н.А. Зиновьева, Е.А. Гладырь // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 9. – С. 19–20.
4. Луговой С.І. Оцінка внутрішньопородної мінливості української м'ясної породи свиней за локусами мікросателітів ДНК / С.І. Луговой // Збірник наукових праць Вінницького НАУ. Серія: Сільськогосподарські науки. – 2013. – Вип. 2 (72). – С. 109–114.
5. Луговой С.І. Оцінка внутрішньопородної мінливості свиней породи дюрок за локусами мікросателітів ДНК / С.І. Луговой // Вісник Житомирського національного агроєкологічного університету. – 2013. – Вип. № 1. (35), т. 2. – С. 105–113.
6. Генотипування коней української верхової породи з використанням панелі SSR-маркерів / А.В. Шельов, В.Г. Спиридонов, М.Ф. Парій [та ін.] // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2009. – Т. 7. – С. 257–261.
7. Дзіцюк В. Мікросателітні ДНК-маркери у збереженні генетичного різноманіття коней / В. Дзіцюк, О. Мельник // Тваринництво України. – 2013. – № 12. – С. 7–10.
8. Мохначова Н.Б. Застосування мікросателітних маркерів для генотипування великої рогатої худоби / Н.Б. Мохначова // Розведення і генетика тварин. – 2008. – Вип. 42. – С. 198–203.
9. Зиновьева Н.А. Оценка роли ДНК-микросателлитов в генетической характеристике популяции черно-пестрого скота / Н.А. Зиновьева, Н.И. Стрекозов, Л.А. Молофеева // Зоотехния. – 2009. – № 1. – С. 2–4.
10. Kalinowski S.T. HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity / S.T. Kalinowski // Molecular Ecology Notes. – 2005. – Vol. 5. – P. 187–189.
11. Hammer O. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis / O. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan // Palaeontologia Electronica. – 2001. – Vol. 4. – P. 1–9.
12. Weir B.S. Estimating F-statistics for the analysis of population structure / B.S. Weir, C.C. Cockerham // Evolution. – 1984. – Vol. 38. – P. 1358–1370.
13. Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics / J. Goudet // Journal of Heredity. – 1995. – Vol. 86. – P. 485–486.
14. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears / D. Paetkau, W. Calvert, I. Sterling [et al.] // Molecular Ecology. – 1995. – Vol. 4. – P. 347–354.
15. Peakall R. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update / R. Peakall, P.E. Smouse // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – P. 2537–2539.

## REFERENCES

1. Vdovychenko, Yu.V., Voronenko, V.I., Nayd'onova, V.O., Omel'chenko L.O. (2012). M'yasne skotarstvo v stepoviy zoni Ukrayiny [Beef cattle in the steppe zone of Ukraine]. Nova Kakhovka: PYEL [in Ukrainian]
2. Kopylova, K.V., Kopylov, K.V., Arnaut, K.O. (2009). Osoblyvosti henetychnoyi struktury riznykh porid velykoyi rohatoyi khudoby za lokusamy kil'kisnykh oznak (QTL) [Features of the genetic structure of different breeds of cattle based on quantitative traits loci (QTL)]. Naukovyy visnyk Natsional'noho universytetu bioresursiv ta pryrodokorystuvannya Ukrayiny – Scientific Bulletin of National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 138, 239–246 [in Ukrainian].
3. Zinov'eva, N.A., Gladyr, H.A. (2011). Geneticheskaya ekspertiza selskohozyaystvennykh zhyvotnykh: primeneniye test-sistem na osnove mikrosatelitov [Genetic examination of farm animals: the use of test systems based on microsatellites]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK – Advances in science and technology agriculture, 9, 19–20 [in Russian]
4. Luhovyy, S.I. (2013a). Otsinka vnutrishn'oporodnoyi minlyvosti ukrayins'koyi m'yasnoyi porody svyney za lokusamy mikrosatelitiv DNK [Assessment intrabreed variability of the Ukrainian Meat pig breed by microsatellite DNA loci]. Zbirnyk naukovykh prats' Vinnyts'koho NAU. Seriya: Sil's'kohospodars'ki nauky – Scientific works of Vinnytsia NAU. Series: Agriculture, 2(72), 109–114 [in Ukrainian].
5. Luhovyy, S.I. (2013b). Otsinka vnutrishn'oporodnoyi minlyvosti svyney porody dyurok za lokusamy mikrosatelitiv DNK [Assessment intrabreed variability of the Duroc pig breed by microsatellite DNA loci]. Visnyk Zhytomyrs'koho natsional'noho ahroekolohichnoho universytetu – Journal of Zhytomyr National Agroecological University, 1(35), 105–113 [in Ukrainian].
6. Shelyov, A.V., Spirydonov, V.H., Pariy, M.F., Mel'nychuk, S.D. (2009). Henotypuvannya koney ukrayins'koyi verkhovoyi porody z vykorystanniam paneli SSR-markeriv [Genotyping of Ukrainian rider horse breed using panel of SSR-markers]. Visnyk Ukrayins'koho tovarystva henetykiv i selektsioneriv – The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine, 7, 257–261 [in Ukrainian].
7. Dzitsyuk, V., Mel'nyk, O. (2013). Mikrosatelitni DNK-markery u zberezheni henetychnoho riznomanittya koney [Microsatellites of DNA in the preservation of genetic diversity of horses]. Tvarynystvo Ukrayiny – Livestock of the Ukraine, 12, 7–10 [in Ukrainian].
8. Mokhnachova, N.B. (2008). Zastosuvannya mikrosatelitnykh markeriv dlya henotypuvannya velykoyi rohatoyi khudoby [The use of microsatellite markers for genotyping of cattle]. Rozvedennya i henetyka tvaryn – Animal Breeding and Genetics, 42, 198–203 [in Ukrainian].
9. Zinov'eva, N.A., Strekozov, N.I., Molofeeva, L.A. (2009). Ocenka roli DNK-mikrosatelitov v geneticheskoyi charakteristike populjacji cherno-pestrogo skota [Assessing the role of DNA microsatellites in the genetic characteristics of the populations of black and white cattle]. Zootechniya – Animal husbandry, 1, 2–4 [in Russian].
10. Kalinowski, S.T. (2005). HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. Molecular Ecology Notes, 5, 187–189.
11. Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4, 1–9.
12. Weir, B.S., Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38, 1358–1370.
13. Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. Journal of Heredity, 86, 485–486.
14. Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Molecular Ecology, 4, 347–354.
15. Peakall, R., Smouse, P.E. (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. Bioinformatics, 28, 2537–2539.

**Анализ генетической дифференциации в отношении локусов микросателлитов скота южной мясной породы А.С. Крамаренко**

В работе предоставлены результаты анализа степени генетической дифференциации между разными подтипами коров южной мясной породы («санта-гертруда» и «зебу») на основании 12 локусов микросателлитов (TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA122, INRA23, TGLA126, BM1818, ETH3, ETH225 и BM1824). Установлено, что по количеству аллелей (в т.ч. «уникальных») эти подтипы не отличаются между собой. Среди исследованных животных южной мясной породы в целом наблюдается существенный дефицит гетерозигот. Оценка индекса генетической дифференциации ( $F_{st} = 0,053 \pm 0,013$ ) свидетельствует о наличии значительных генетических различий между ними в отношении частот аллелей для большинства локусов. Степень генетической уникальности (консолидации) для отдельных подтипов составляет около 86 %.

**Ключевые слова:** микросателлиты, полиморфизм, генетическая дифференциация, южная мясная порода.

*Надійшла 14.04.2015*