

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**Факультет технології виробництва і переробки
продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології**

**РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОГРАМ СЕЛЕКЦІЙНОЇ
РОБОТИ В СКОТАРСТВІ З ВИКОРИСТАННЯМ
МАРКЕР-ДОПОМІЖНОЇ СЕЛЕКЦІЇ**
(виробничо-практичні рекомендації)



Миколаїв

2019

УДК 636.082

К 78

Рекомендовано до друку рішенням науково-методичної ради Миколаївського національного аграрного університету від «27» листопада 2019 р., протокол № 3.

Укладачі:

- О. С. Крамаренко - канд. с.-г. наук, ст. викладач кафедри технології переробки, стандартизації і сертифікації продукції тваринництва, Миколаївський національний аграрний університет;
- С. І. Луговий - д-р с.-г. наук, доцент, в.о. завідувача кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет;
- С. С. Крамаренко - д-р біол. наук, професор, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет;

Рецензенти:

- Р. Л. Сусол - д-р с.-г. наук, доцент, завідувач кафедри технології виробництва та переробки продукції тваринництва, Одеський державний аграрний університет;
- О. О. Стародубець - канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри птахівництва, якості та безпечності продукції, Миколаївський національний аграрний університет.

З М І С Т

Вступ	4
Основні напрями використання мікросателітів ДНК у скотарстві	8
Лабораторні методи дослідження	14
Методи математико-статистичного аналізу	16
Приклад використання мікросателітів ДНК у маркер-допоміжній селекції	20
Список рекомендованої літератури	23

ВСТУП

Більшість господарсько-корисних ознак сільськогосподарських тварин, що представляють інтерес для селекції, є кількісними. Вони детермінуються багатьма генами, що мають малий ефект (полігенами) і значною мірою схильні до дії чинників зовнішнього середовища. З розвитком молекулярно-генетичних методів були створені маркерні системи, які дозволили проводити пряме дослідження ДНК різних видів тварин. Тим самим стає можливим відбирати тварин безпосередньо за генотипами, тобто у рамках традиційних програм селекції проводити маркер-допоміжну селекцію (Marker-Assisted Selection, MAS) [Goddard, Dekkers, 2004].

Нині ідентифіковані окремі ключові гени або групи зчеплення генів, які зумовлюють формування кількісних ознак у більшості видів сільськогосподарських тварин. Такі генетичні локуси прийнято позначати терміном “локус кількісної ознаки” (Quantitative Trait Loci, QTL). За термінологією INTERBULL, QTL – це локуси, що впливають на фенотипічну варіацію ознак з безперервною мінливістю. Існує істотне уточнення: “QTL – це генетичний локус, варіабельність якого на базі різних алелей веде до статистично значимих змін фенотипічного прояву ознаки”.

Переваги ДНК-технологій полягають у тому, що за допомогою ПЛР-аналізу можна виявити мутацію на генному рівні у тварин у будь-якому віці (у тому числі у новонароджених), при цьому матеріалом для аналізу можуть слугувати невеликі кількості будь-яких тканин та можливими є масові обстеження тварин [Копилов, 2010]. Використовуючи молекулярно-генетичні методи, можна визначити відмінності між тваринами за багатьма ділянками генома (сайтами). Ці сайти можна розглядати як локуси генів-маркерів. Самі по собі вони, ймовірно, не являються QTL, але можуть бути зчепленими з QTL. Тим самим стає можливим картувати QTL, генотипувати тварин і відбирати їх безпосередньо за генотипами [Davis, 1998, Селионова, 2012; Хлесткина, 2013].

ДНК-маркери – це поліморфні ділянки ДНК з невідомими функціями, але з відомою позицією на хромосомі. Перевага таких маркерів у тому, що зміни в послідовності ДНК є першопричиною всіх подальших змін організму. Крім того, вони забезпечують можливість аналізу будь-яких послідовностей генома, отримання інформації щодо еволюційних взаємозв'язків (побудови філогенетичних дерев) і встановлення географічних областей схрещувань між популяціями, що мають різне генетичне походження. Крім того, ДНК-маркери грають

важливу роль при встановленні батьківства, для характеристики генетичного (внутрішньо- та міжпородного) різноманіття і пошуку функціональних варіантів важливих генів – маркер-допоміжній селекції. Молекулярна характеристика може відігравати важливу роль у розкритті історії, оцінці різноманіття і популяційної структури породи. Вона також може допомогти уникнути надмірного інбридингу при генетичному управлінні невеликими популяціями, проводити ідентифікацію в певних популяціях унікальних алелей або комбінацій алелей за адаптивними ознаками, що може посилити обґрунтування збереження та спрямованого використання порід та видів тварин [Календарь, Глазко, 2002; Состояние всемирных генетических ..., 2011; Мельник, 2011].

Запропоновано об'єднати ДНК-маркери, створені на основі ПЛР, в два основні класи: маркери, створені на основі невеликих змін в нуклеотидній послідовності ДНК унікальних локусів, та маркери на основі зміни кількості повторів у тандемних послідовностях ДНК, що повторюються [Календарь, Глазко, 2002].

До маркерів I типу відносяться послідовності ДНК, що кодують первинну структуру біополімерів (пептидів та нуклеїнових кислот). Вони характеризуються відносно низьким генетичним поліморфізмом та відносно високим еволюційним консерватизмом. Незважаючи на існування видових відмінностей в нуклеотидних послідовностях однойменних генів, кодований ними продукт у різних видів виконує одну і ту ж функцію. Це дозволяє використати маркери I типу в різних еволюційних дослідженнях генома. Таким чином, маркери I типу – це, в загальному випадку, гени, що контролюють прояв тієї або іншої ознаки, поліморфізм якої виявляється або за фенотипічним проявом алелей, або шляхом молекулярно-генетичних або інших спеціальних досліджень [Southern, 1974].

Маркери II типу – це мікросателіти (ди- три- тетрануклеотидні повтори в послідовності ДНК). При цьому, їх генетична функція невідома. Вони характеризуються дуже високим рівнем генетичної мінливості (можуть містити до 15-20 алельних варіантів). З іншого боку, вони мають дуже високу видоспецифічність (існування однакових маркерів можливе тільки у близькоспоріднених видів). Ці маркери відомі також під декількома назвами: мікросателіти, STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site), STR (Short Tandem Repeat), SSR (Simple Sequence Repeat) [Сулимова, 2004; Зиновьева, Никишов, 2008]. Для їх аналізу підбираються певні праймери до унікальних послідовностей ДНК, що фланкують ділянку з нуклеотидними повторами/ Це вимагає попереднього знання їх нуклеотидної послідовності [Vignal et al., 2002].

Мікросателіти складаються з ділянок ДНК завдовжки 2-6 п.н. тандемно повторених багато разів (наприклад, САСАСАСАСАСАСА – (СА)₈). Мікросателіти мають відносно невеликі розміри і можуть бути ампліфіковані при використанні ПЛР на ДНК, що екстрагується з різних джерел, наприклад, кров, корені волосся, шкіра [Состояние всемирных генетических ..., 2011; Мухина, 2011].

Згідно із загальноприйнятою точкою зору, поліморфізм мікросателітів зумовлений помилками (ефект “просковзування”) в процесі реплікації або репарації ДНК. Середній темп мутації динуклеотидних повторів оцінюють приблизно в $6,9 \times 10^{-4}$, хоча ці оцінки можуть істотно різнитися [Davis, 1998; Сулимова, 2004].

Високий рівень поліморфізму мікросателітів, широка наявність і відносно рівномірний їх розподіл в еухроматиновій частині геному зробили їх надзвичайно популярними. Гіперваріабельні мікросателіти є універсальною системою генетичних маркерів для аналізу спадкових змін на рівні ядерної ДНК та широко використовуються в дослідженнях генетичного поліморфізму популяцій людини, рослин та тварин [Сулимова, 2004].

Незважаючи на високу популярність мікросателітів, вони мають і деякі недоліки. Нерівномірність швидкості мутації різних мікросателітів створює певні складнощі для популяційно-генетичного аналізу. Є і технічні проблеми, такі як артефакти при проведенні ПЛР (за рахунок ефекту “просковзування”), складнощі в розробці технологій для автоматичного скринінгу алелей мікросателітів. Крім того, незважаючи на високу щільність локусів мікросателітів у геномі, їх буває недостатньо для тонкого картування окремих областей геномів, створення маркерів для локусів кількісних ознак (QTL) і рішення багатьох інших завдань [Davis, 1998, Сулимова, 2004, Мухина, 2011].

Останнім часом мікросателіти все більше і більше використовують для аналізу питань популяційної та еволюційної генетики. Вони стають найбільш поширеним типом маркерів, що застосовують для цих цілей. Мікросателіти також використовують для визначення міри спорідненості індивідуумів або груп, для оцінки рівнів інбридингу зникаючих або рідкісних видів, для встановлення генетичної структури субпопуляцій та популяцій. Вони можуть бути корисними для оцінки демографічної історії, для оцінки ефективного розміру популяції (N_e) та для оцінки величини і напряму потоку генів між популяціями [Зиновьева, Никишов, 2008].

Результати, отримані на підставі мікросателітів, також широко використовують для оцінки генетичних взаємовідносин між популяціями та індивідуумами шляхом оцінки генетичних відстаней. Найширше

використовуваною мірою генетичної відстані є стандартна генетична відстань М. Нея. Генетичні взаємовідносини між породами також можуть бути виявлені через реконструкцію їх філогенії, причому найчастіше використовується метод найближчих сусідів (neighbour-joining) [Состояние всемирных генетических ..., 2011; Банникова, 2004].

Ефективна чисельність популяції (N_e) є показником, на підставі якого оцінюють ефективну кількість особин в популяції, які беруть участь у відтворенні та вносять свої гени в наступне покоління. Оцінка N_e тісно пов'язана з рівнем інбридингу та генетичним дрейфом у популяції і, отже, є важливим показником популяції [Состояние всемирных генетических ..., 2011].

Нааразі мікросателіти є найбільш популярними маркерами в дослідженнях генетичних характеристик свійських тварин. Їх висока швидкість мутації, кодомінантний характер успадкування дозволяють оцінювати внутрішньо- та міжпородну генетичну різноманітність і генетичну інтрогресію між породами, навіть якщо вони близько споріднені [Состояние всемирных генетических ..., 2011].

Незважаючи на тісне зчеплення мікросателітів з певними локусами, вони а-ргіогі вважаються нейтральними в селекційному аспекті. В той же час, слід зазначити, що в літературних джерелах є ряд публікацій, в яких показано факти зчеплення, як припускають, нейтральних мікросателітів із генами-кандидатами локусів кількісних ознак [Зиновьева, Никишов, 2008].

Слід також зазначити, що важливу роль у широкому спектрі прикладного використання мікросателітів, разом з їх поліморфними властивостями, має можливість одночасного дослідження декількох локусів за допомогою мультиплексної ПЛР та автоматизації процесу генотипування, що дозволяє досягти дуже високої продуктивності методу [Зиновьева, Никишов, 2008].

При аналізі даних мікросателітів певні складнощі пов'язані з вибором моделі їх мутації – IAM (необмежена поява алелей, що випадково відрізняються по довжині – кількості повторів) або SMM (послідовна зміна кількості повторів). Для аналізу даних інтрогресії мікросателітів з різних популяцій використовуються методи багатовимірного аналізу або методи кластеризації, що базуються на теоремі Байєса (Состояние всемирных генетических ..., 2011).

Таким чином, аналіз генетичного різноманіття на підставі використання ДНК-маркерів потенційно дозволяє зробити висновки про те, де може бути знайдена функціональна генетична мінливість виду, для якого існує лише обмежена кількість даних щодо їх фенотипової мінливості.

ОСНОВНІ НАПРЯМИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТІВ ДНК У СКОТАРСТВІ

Згідно з базою даних INRA (French National Institute for Agricultural Research; institut.inra.fr), вже на початку 2010-х років на всіх 30 парах хромосом ВРХ було виявлено 2402 локуса мікросателітів ДНК, з яких 2244 було картовано (Киселева и др., 2010). Водночас, мікросателітний аналіз набуває широкого використання й при вивченні генетичного поліморфізму ВРХ молочного та м'ясного напрямку в Україні та сусідніх країнах (Шкавро та ін., 2010; Гладырь и др., 2011; 2011а; 2011б; Копилова та ін., 2013; Глинская, 2013; 2013а; Глинская и др., 2013).

Серед різноманітних напрямів використання мікросателітів у скотарстві можна виділити основні:

- контроль походження (встановлення батьківства) та паспортизація тварин;
- оцінка рівня генетичної різноманітності (алельний спектр, гетерозиготність, наявність/відсутність генетичної рівноваги) на породному та внутрішньопородному рівні;
- оцінка рівня міжпородної генетичної диференціації та встановлення філогенетичних зв'язків;
- ступінь інтрогресії геномів при створенні нових порід (особливо, при використанні міжвидової гібридизації для тварин роду *Bos L.*, 1758);
- пошук зв'язків з показниками продуктивності та оцінка можливого використання цих зв'язків у маркер-допоміжній селекції (MAS);
- оцінювання негативних наслідків популяційно-генетичних процесів, особливо для малочисельних та автохтонних порід.

Контроль походження (встановлення батьківства) і паспортизація тварин. Висока інформативність мікросателітів робить їх зручним інструментом для вирішення практичних завдань, таких як встановлення батьківства і материнства. При вирішенні таких завдань вірогідність висновків залежить від інформативності досліджуваних поліморфних локусів, що можна оцінити на основі даних популяційного аналізу (Зиновьева, Гладырь, 2011; Епишко и др., 2014).

У ВНДІ тваринництва було розроблено тест-систему на основі мікросателітів (локуси TGLA126, TGLA122, TGLA227, INRA023, ILST005, ILST006, ETH185, ETH10, ETH225, BM1818, BM1824, BM2113, SPS115), сформованих у дві мультиплексні панелі для проведення ДНК-експертизи великої рогатої худоби. Її результативність була дуже високою – імовірність ідентичності генотипів особин залежно від породи за 13

мікросателітами була практично виключеною і становила від $6,8 \times 10^{-14}$ до $2,1 \times 10^{-11}$ для неспоріднених тварин та від $8,2 \times 10^{-6}$ до $1,1 \times 10^{-5}$ для напівсибсів. Крім того, було встановлено високі рівні вірогідності результатів підтвердження ($P > 0,99$) і виключення помилки ($P > 0,9999$) батьківства (Гладырь и др., 2011).

Аналогічно, в Республіці Білорусь було розроблено імпортозамінну систему застосування STR-локусів для оцінки вірогідності походження нащадків великої рогатої худоби чорно-рябої породи з використанням вітчизняних реактивів. При цьому, ефективність контролю походження за 5-ма STR-локусами становила 0,99019. А використання 11 локусів дозволило досягти рівня вірогідності підтвердження походження високоцінних племінних тварин з точністю 99,999% (Глинская и др., 2014; Танана и др., 2014).

Оцінка рівня генетичної різноманітності на породному та внутрішньопородному рівні. Оцінка всього спектру різноманіття, створення генетичних паспортів порід потребує вивчення якомога більшої кількості географічно віддалених популяцій. Істотний внесок у характеристику алельного різноманіття порід вносять регіональні популяції, формування алелофонду яких, у більшості випадків, відбувалося в умовах відносної географічної ізоляції на основі місцевої худоби з власним унікальним алелофондом. Крім того, на генетичну мінливість регіональних популяцій певний вплив мають специфічні для кожного з регіонів абіотичні фактори.

Аналіз генетичного поліморфізму за мікросателітними локусами було вже проведено для низки порід молочного та м'ясного напрямку: чорно-рябої (Епишко, 2012; Глинская, 2013; 2013а; Лозовая, Аржанкова, 2010), якутської, холмогорської (Гладырь и др., 2011а), симентальської, герефордської (Гладырь и др., 2011б; Долматова и др., 2012), голштинської (Хабибрахманова и др., 2014), казахської білоголової, галовейської (Гладырь и др., 2013), швіцької, сичовської, суксунської, істобенської, ярославської (Киселева и др. 2010; Кольцов и др., 2012), шароле (Шкавро та ін., 2010) та ін.

В Україні з 2007 року проводиться цілеспрямована робота з вивчення стану генетичного різноманіття тварин сірої української породи (Шкавро та ін., 2010; Киселева и др., 2010; Гузеев и др., 2011). Крім того, розпочато роботу з вивчення дуже рідкісних порід, наприклад, липованської червоної острівної худоби, що розповсюджена лише на островах у Дунайсько-Чорноморських плавнях (Гузеев та ін., 2013).

Високий рівень гетерозиготності, який часто спостерігається, є наслідком високого поліморфізму досліджуваних мікросателітних маркерів

і свідчить про доцільність їх використання для оцінки генетичного різноманіття. Таким чином, для одночасної підтримки в популяціях продуктивності та життєздатності при постійному вдосконаленні племінних якостей худоби необхідно вивчати їх генетичний статус за декількома локусами. Це дозволить, з одного боку, консолідувати спадкову стійкість тварин шляхом збільшення кількості нащадків, а з іншого – контролювати і підтримувати гетерозиготність на рівні, що забезпечує достатню мінливість та пластичність популяцій (Епишко, 2012).

У цілому, у досліджених популяціях виявлено високий “резерв” генетичного різноманіття за мікросателітними локусами.

Необхідність застосування методів аналізу генетичної мінливості, заснованих на вивченні ДНК, диктується тим, що білкові системи, які раніше для цього широко використовувалися, не можуть повною мірою адекватно відображати генетичну подібність у групах тварин. Справа в тому, що відмінності між синонімічними кодонами не змінюють закодованих амінокислот, а це означає, що процес накопичення мутацій не реєструється аналізом синтезованих організмом білків. Аналіз ДНК використовується не тільки на окремих особинах, а й на цілих популяціях тварин (Калашникова и др., 1999).

Оцінка рівня міжпородної генетичної диференціації та встановлення філогенетичних зв'язків. Складні філогенетичні зв'язки між породами ВРХ можуть бути також проаналізовані з використанням локусів мікросателітної ДНК. Так, у роботі Ю. Гузеєва (2012) було проведено філогенетичний аналіз між 22 породами худоби, що розводяться в Україні та Росії за панеллю із 13 мікросателітних локусів (TGLA126, TGLA122, INRA023, ILST005, ETH185, ILST006, BM1818, BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, SPS115, TGLA227). Ним було встановлено, що генезис окремих популяцій і порід худоби може бути простежений на підставі побудованої дендрограми філогенетичного споріднення великої рогатої худоби різних порід. Сіра українська худоба має унікальну генетичну цінність і в майбутньому може бути використана при створенні нових спеціалізованих і комбінованих порід (Гузеев, 2012).

Ще більш детальний аналіз міжпородних взаємовідносин було проведено К.В. Копиловою зі співавторами (2013). В їх дослідженнях було використано дані щодо 25 порід ВРХ (молочні та молочно-м'ясні – голштинська, українська чорно-ряба молочна, українська червоно-ряба молочна, українська червона молочна, червона степова, англєрська, симентальська, монбельярдська, лебединська, пінцгау, швіцька, джерсейська, бура карпатська, білоголова українська; м'ясні – українська м'ясна, волинська м'ясна, південна м'ясна, знам'янський тип поліської

м'ясної, сіра українська, лімузин, шароле, світла аквітанська, кіан, мен-анжу, гаскон) за локусами QTL (k-Cn, β LG, GH, TG, CAPN1 530), ISSR-маркерами з використанням у якості праймерів фрагментів динуклеотидних та тринуклеотидних мікросателітних локусів (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (GA)₉C та мікросателітними маркерами, що входять до переліку рекомендованих ISAG (BM1824, BM2113, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, ETH10, ETH225 та ETH3). Ними було встановлено рівень алельного різноманіття та виявлено породо-специфічні алелі локусів мікросателітів.

У цілому, застосування молекулярно-генетичних маркерів є невід'ємним елементом системи збереження генофонду тварин, шляхом визначення найбільш цінних генотипів та створює реальні передумови для їх спрямованого використання в програмах із охорони біорізноманіття у популяціях великої рогатої худоби України (Копилова та ін., 2013).

Ступінь інтрогресії геномів при створенні нових порід (особливо, при використанні міжвидової гібридизації для тварин роду Bos L., 1758. Використання мікросателітного аналізу дозволило оцінити ступінь генетичної подібності між породами *Bos taurus* (L., 1758) та іншими представниками цього роду, наприклад, свійським яком (Ернст и др., 2009) та оцінити ступінь інтрогресії генів свійського яка при створенні гібридів *B. taurus* × *Poephagus grunniens* (L., 1766) (Аль-Кейси и др., 2011).

Відмічають також суттєві зміни в геномі при міжпородному схрещуванні, навіть вже серед особин F₁. Так, аналіз рівня генетичної мінливості тварин чорно-рябої породи та їх помісей із абердин-ангуською породою дозволив встановити вірогідні відмінності за частотою алелей для більшості локусів мікросателітів між чистопородними та помісними тваринами (Аржанкова и др., 2015).

При аналізі алелофонду тварин симентальської, герефордської порід та їх помісей F₁ було встановлено, що масив симентал-герефордських помісей F₁, сформований у рамках створення нового типу м'ясної худоби, характеризується високим генетичним розмаїттям, відрізняється високою консолідованістю і, хоча генетично і близький до порід, що були використані при його створенні, має унікальний алелофонд, який відображає інтрогресію алелофонду вихідних порід (Гладырь и др., 2011б).

Пошук зв'язків з показниками продуктивності та оцінка можливого використання цих зв'язків у маркер-допоміжній селекції (MAS). Сукупність отриманих даних вказує на доцільність використання ДНК-маркерів для пошуку асоціацій з локусами господарсько-корисних ознак (Зиновьева и др., 2013).

Так, проведений кореляційний аналіз показав наявність вірогідних кореляцій, асоційованих з молочною продуктивністю тварин Баймакського типу симентальської породи за вісьмома локусами мікросателітної ДНК. При цьому, кореляції можуть мати як додатній, так і від'ємний характер (Долматова и др., 2012).

Аналогічно, для корів чорно-рябої породи встановлено вірогідні кореляції між певними алелями локусів мікросателітів та показниками їх молочної продуктивності. При цьому продемонстровано породо- і популяційно-залежний характер виявлених кореляцій (Траспов и др., 2012).

Крім того, у бугай-відтворних корів білоруської чорно-рябої породи виявлено деяку своєрідність за частотою окремих алелів STR-локусів. Тому рекомендується при відборі тварин надавати перевагу особинам з наявністю в геномі алельних варіантів, що частіше зустрічаються в групі худоби з високим рівнем молочної продуктивності (Лозовая, Аржанкова, 2010; Елишко и др., 2014).

Поліморфізм мікросателітних маркерів використовується в селекційній роботі і з м'ясними породами ВРХ. Випускаються комерційні набори (ДНК-тести) для виявлення тварин з кращими показниками ніжності і мрамуровості м'яса (<http://www.bovigen.com>, <http://www.idenity.com>, <http://www.nbces.org>) (Киселева и др. 2010).

Оцінювання негативних наслідків популяційно-генетичних процесів для малочисельних та автохтонних порід. Широко використовуються мікросателіти і в якості інструмента для вивчення питань еволюційної генетики, особливо для малочисельних та автохтонних порід. Наслідком популяційно-генетичних процесів (насамперед, ефектів “засновника” чи “пляшкового горлечка”) може бути зниження або алельного спектру, або фактичної гетерозиготності. Особливу небезпеку можна очікувати навіть не для окремих порід, а для внутрішньопородних типів.

Так, встановлено істотно більш низьку кількість ефективних алелей на мікросателітний локус у якутської худоби (Гладырь и др., 2011а) та у тварин внутрішньопородного типу «Вазуський» сичовської породи (Кольцов и др., 2012), зниження рівня гетерозиготності для тварин породи шароле (Шкавро та ін., 2010). У всіх випадках отримані результати пояснювалися наслідками використання обмеженої кількості бугайвплідників з метою закріплення бажаних ознак продуктивності та специфічними умовами утримання худоби (розведення “в собі” через відсутність “прилиття крові”).

З іншого боку, наслідками популяційно-генетичних процесів можуть бути випадки прояву нерівноваги за зчепленням для мікросателітних

маркерів, як, наприклад, це було встановлено при аналізі шести порід великої рогатої худоби (суксунської, істобенської, ярославської, сірої української, холмогорської та печорського типу холмогорської худоби). Під час цього дослідження було виявлено вірогідну нерівновагу за зчепленням для мікросателітів INRA037 і CSRM60 у популяції сірої української худоби (Киселева и др. 2014).

ЛАБОРАТОРНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом для дослідження слугують біологічні проби тканини (вушні вищипи). Виділення ДНК можна проводити на колонках Nexttec (Nexttec Biotechnologie GmbH, Germany) згідно з рекомендаціями виробника та перхлоратним методом за методиками Всеросійського науково-дослідного інституту тваринництва імені академіка Л.К. Ернста (Зиновьева и др., 2000).

Аналіз ДНК і постановку ПЛР доцільно проводити згідно методичних розробок Центру біотехнології і молекулярної діагностики Всеросійського науково-дослідного інституту тваринництва імені академіка Л.К. Ернста (Зиновьева и др., 2000). У дослідженнях слід використовувати 12 мікросателітних локусів, що рекомендовані ISAG: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA122, INRA23, TGLA126, BM1818, ETH3, ETH225 та BM1824 (табл. 1).

Таблиця 1

Загальна характеристика мікросателітних локусів, що використовують для аналізу

Локус / хромосома	Тандемний повтор	Праймери	Джерело
BM1818 (BTA23)	(TG) _n	F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG R: AGTGCTTCAAGGTCCATGC	Bishop et al., 1994
BM1824 (BTA1)	(GT) _n	F: GAGCAAGGTGTTTTCCAATC R: CATCTCCAACCTGCTTCCTTG	Barendse et al., 1994
BM2113 (BTA2)	(CA) _n	F: GCTGCCTTCTACCAAATACCC R: CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	Sunden et al., 1993
ETH3 (BTA19)	(GT) _n AC(GT) ₆	F: GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG R: ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	Solinas-Toldo et al., 1993
ETH10 (BTA5)	(AC) _n	F: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA R: CCTCCAGCCACTTCTCTTCTC	Solinas-Toldo et al., 1993
ETH225 (BTA9)	(TG) ₄ CG(TG)(CA) _n	F: GATCACCTTGCCACTATTTCTT R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	Steffen et al. (1993)
INRA23 (BTA3)	(AC) _n	F: GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC R: TAACTACAGGGTGTAGATGAACTC	Vaiman et al., 1994
SPS115 (BTA15)	(CA) _n TA(CA) ₆	F: AAAGTGACACAACAGCTTCACCAG R: AACCGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG	Baylor College of Medicine, 2006
TGLA53 (BTA16)	(TG) ₆ CG(TG) ₄ (TA) _n	F: GCTTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA R: ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	Georges, Massey, 1992
TGLA122 (BTA21)	(AC) _n (AT) _n	F: AATCACATGGCAAATAAGTACATAC R: CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC	Georges, Massey, 1992
TGLA126 (BTA20)	(TG) _n	F: CTAATTTAGAAATGAGAGAGGCTTCT R: TTGGTCTCTATTCTCTGAATATCC	Georges, Massey, 1992
TGLA227 (BTA18)	(TG) _n	F: GGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT R: ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	Georges, Massey, 1992

Для аналізу всіх 12 мікросателітів доцільно виконувати одну мультиплексну ПЛР, що дозволяє діагностувати поліморфізм по всіх локусах одночасно.

Аналіз ампліфікованих фрагментів можливо здійснювати за допомогою приладу для капілярного електрофорезу ABI 3130×1 (Applied Biosystems, США). Для ідентифікації алелей мікросателітних локусів використовується програма GeneMapper ID v. 3.2.

Обробку даних капілярного електрофорезу проводять шляхом визначення довжин фрагментів у результаті порівняння їх рухливості зі стандартом молекулярної маси ДНК.

МЕТОДИ МАТЕМАТИКО-СТАТИСТИЧНОГО АНАЛІЗУ

Аналіз проводять за два етапи. На першому етапі, на основі ретроспективних даних племінного обліку проводиться оцінювання показників племінної цінності (EBV) з використанням процедури BLUP. В якості фіксованого фактора в модель включають рік народження тварини, а випадкового фактора – генотипова група, до якої вона належала.

Оцінку племінної цінності проводять для наступних показників росту молодняку: жива маса при народженні (M0), при відлученні (M210d), у 8 (M8), 12 (M12), 15 (M15) та 18 (M18) місяців.

Модель (BLUP Sire Model), що використовується для розрахунку оцінок племінної цінності, має наступний вигляд:

$$y = X \cdot \beta + Z \cdot \alpha + \varepsilon, \quad (1)$$

де: y – вектор спостережуваних значень залежної змінної;

β – вектор фіксованих ефектів (рік народження);

α – вектор рандомізованих ефектів (генотип бугая-плідника);

ε – вектор випадкових залишкових (неврахованих) ефектів;

X і Z – відомі матриці, що відносяться до оцінюваних ефектів.

Модель (1) рівняння змішаної моделі має наступний вигляд:

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + \lambda \cdot I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \bar{\beta} \\ \bar{\alpha} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \end{bmatrix}, \quad (2)$$

де:

$$\lambda = \frac{4 - h^2}{h^2}, \quad (3)$$

де: h^2 – коефіцієнт успадкованості ознаки.

Рішення рівняння (2) може бути отримано за допомогою функцій матричної алгебри, вбудованих до табличного редактора MS Excel.

На другому етапі проводять аналіз даних, отриманих від тварин із встановленим генотипом.

В якості показників динаміки живої маси молодняку використовують наступні: жива маса при народженні (M0), в 210 діб (при відлученні; M210d), у віці 8 міс. (M8), 12 міс. (M12), 15 міс. (M15) та 18 міс. (M18). Окрім цього, застосовують три показники інтенсивності росту: середньодобовий приріст від народження до віку 18 міс. (ADG), середньодобовий приріст від народження до відлучення (ADG1) та середньодобовий приріст від відлучення до віку 18 міс. (ADG2).

Оснoву експерименту становить перевірка нуль-гіпотези щодо відсутності відмінностей за показниками росту живої маси між тваринами, які мали різний генотип за локусами мікросателітів. Її проводять за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу.

Більш детальний аналіз проводять при розподілі тварин на дві групи за наявністю/відсутністю у їх генотипі певного алеля. У цьому випадку для порівняння таких груп використовують критерій Ст'юдента.

Всі статистичні розрахунки проводять з використанням пакету статистичних програм STATISTICA (Халафян, 2007).

Для всіх тварин, яких включено до аналізу, розраховують частоти генотипів та алелів (як за структурними генами, так і за кожним локусом мікросателітів). Крім того, для кожного локусу розраховують (Животовский, 1991; Вейр, 1995):

- фактичну (H_o) та очікувану (H_e) гетерозиготність;
- кількість алелей на локус (N_a);
- ефективну кількість алелей (A_e);
- індекс фіксації (F_{is}).

Також визначають частоту унікальних алелей (private alleles) (тобто, таких, що були виявлені тільки серед тварин певної породи).

Для оцінки рівня генетичної мінливості тварин різних порід у цілому для всіх мікросателітних локусів розраховують наступні показники:

- середню кількість алелей на локус (N_a);
- середню кількість алелей із частотою не менше 0,05 на локус (N_a (95%));
- середню ефективну кількість алелей (A_e) на локус;
- середню фактичну (H_o) та очікувану (H_e) гетерозиготність на локус;
- середню частоту локусів із унікальними алелями (P_{ra}).

Теоретичну кількість алелей для різних мікросателітних локусів розраховують за моделлю SMM (Kimura, Ohta, 1975) та IAM (Ewens, 1997) з використанням програми MICROSATELLITE ANALYSER (Dieringer, Schlotterer, 2003).

Оцінку стану генетичної рівноваги за кожним локусом розраховують за методом MCMC (Guo, Thompson, 1992).

Розрахунки проводять за допомогою комп'ютерних програм GenAIEx (Peakall, Smouse, 2012) та GENEPOP (Raymond, Rousset, 1995).

Оскільки як для різних локусів мікросателітів, так і для різних порід аналізують різну кількість особин, оцінку кількості алелей (та унікальних алелей) проводять за rarefaction-методом (для вибірки, що складається зі 100 випадково обраних особин) із застосуванням програми HP-Rare (Kalinowski, 2005).

Ступінь відмінностей між тваринами різних порід за частотами алелей 12 мікросателітних локусів розраховують з використанням критерію Хі-квадрат К. Пірсона із визначенням рівня значущості за методом Монте-Карло. Всі розрахунки проводять з використанням програми PAST (Hammer et al., 2001).

Індекси фіксації (або F-статистики С. Райта), що дозволяють визначити ступінь генетичної міжпородної диференціації, розраховують на підставі методу, запропонованого у роботі (Weir, Cockerham, 1984) як для кожного локусу мікросателітів окремо, так і для всіх локусів у цілому з використанням програми FSTAT (Goudet, 1995).

Аналіз молекулярної мінливості (AMOVA) на основі емпіричного розподілу генотипів 12 локусів мікросателітів із визначенням рівня значущості оцінки Φ_{st} на підставі permutation-методу (з використанням 999 перестановок) проводять за допомогою програми GenAlEx (Peakall, Smouse, 2012).

Для аналізу “тонкої” генетичної структури тварин використовують метод, що реалізовано в програмі STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Цей метод базується на байєсівському алгоритмі розрахунку на основі розподілу частот мультилокусних генотипів за мікросателітами для кожної тварини оцінки “пропорції суміші” (admixture proportions, Q), що фактично є вірогідністю віднесення її до однієї з K “батьківських” груп. Під час аналізу ми використовували значення K , що коливалися в межах від 1 до 7.

Для аналізу наслідків популяційно-генетичних процесів у популяціях використовують чотири різних методики.

По-перше, для кожного локусу мікросателітів розраховують M -ratio (тобто, відношення загальної кількості зареєстрованих алелей до ліміту довжин алелей (Garza, Williamson, 2001)).

По-друге, проводять порівняння між оцінками фактичної гетерозиготності (H_o) та рівноважної (H_{eq}), що мала б місце, якщо популяція знаходиться у стані рівноваги між мутаційним процесом та дрейфом генів. Оцінку останньої проводять за методами SMM, IAM, TPM, що реалізовані у програмі BOTTLENECK (Piry et al., 1999). Гіпотезу відсутності прояву ефекту “пляшкового горлечка” перевіряють з використанням непараметричного критерію знаків (Шебаніна та ін., 2008).

По-третє, наявність нерівноваги за зчепленням (LD) між всіма парами використаних мікросателітних локусів аналізують за допомогою програми PopGene (Yeh et al., 1999).

Нарешті, оцінки ефективної чисельності алелей (N_e) розраховують за мультилокусними генотипами 12 мікросателітних локусів з використанням програми NeEstimator (Peel et al., 2004).

Для оцінки ступеня генетичної подібності використовують два підходи: Assignment-тест за результатами аналізу мікросателітних мультилокусних генотипів (Paetkau et al., 1995) з використанням програми GenAIEx (Peakall, Smouse, 2012) та розраховують матрицю попарних генетичних відстаней (Nei, 1972). У подальшому за останнім алгоритмом будують дендрограму подібності (метод UPGMA), а також графік розподілу центроїдів груп у просторі перших двох головних координат.

ПРИКЛАД ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТІВ ДНК У МАРКЕР-ДОПОМІЖНІЙ СЕЛЕКЦІЇ

Дослідження було проведено на поголів'ї корів таврійського внутрішньопородного типу південної м'ясної породи (ПМП) (загалом – 192 голови) ДП “ДГ “Асканійське” Асканійської державної сільськогосподарської дослідної станції Інституту зрошуваного землеробства НААН Каховського району Херсонської області. Матеріалом для дослідження були біологічні проби тканини (вушні вищипи).

Виділення ДНК проводили на колонках Nexttec (Nexttec Biotechnologie GmbH, Germany) згідно з рекомендаціями фірм-виробників. Усі лабораторні дослідження було проведено в умовах лабораторії молекулярних основ селекції тварин Центру біотехнології та молекулярної діагностики Федерального наукового центру тваринництва – ВІТ ім. Л. К. Ернста.

Постановку ПЛР проводили згідно методичних розробок Центру біотехнології та молекулярної діагностики Федерального наукового центру тваринництва – ВІТ ім. Л. К. Ернста [Зиновьева и др., 2000]. У дослідженнях використовували п'ять мікросателітних локусів, що рекомендовані ISAG: *TGLA227*, *BM2113*, *INRA23*, *BM1818* та *BM1824*.

Аналіз ампліфікованих фрагментів здійснювали за допомогою приладу для капілярного електрофорезу ABI 3130×1 (Applied Biosystems, США). Для ідентифікації алелей мікросателітних локусів використовували програму GeneMapper ID v. 3.2. Обробку даних капілярного електрофорезу проводили шляхом визначення довжин фрагментів у результаті порівняння їх рухливості зі стандартом молекулярної маси ДНК.

В якості показників динаміки живої маси телиць ПМП було використано три показники інтенсивності росту, г:

- середньодобовий приріст від народження до віку 18 міс. (ADG);
- середньодобовий приріст від народження до відлучення (ADG1);
- середньодобовий приріст на відгодівлі (до віку 18 міс.) (ADG2).

Основу експерименту становила перевірка нуль-гіпотези (з використанням критерію Ст'юдента) щодо відсутності відмінностей за показниками росту живої маси між тваринами, що мали певний алель за дослідженими локусами мікросателітів – для цього тварин було розподілено на дві групи за наявністю/відсутністю в їх генотипі відповідного алеля.

Отримані нами дані свідчать, що тварини, в генотипі яких були присутні певні алелі локусів МС-ДНК, вірогідно відрізнялися за приростами живої маси у різні вікові періоди (табл. 2).

Таблиця 2

Результати перевірки гіпотези щодо впливу наявності/відсутності певних алелей за локусами МС-ДНК на прирости телиць ПМП, г

Локус	Алель (п.н.)	Показники приростів	Алель відсутній		Алель присутній		<i>t</i>	<i>p</i>
			<i>n</i>	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	<i>n</i>	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$		
<i>TGLA227</i>	83	ADG1	138	743 ± 13	10	873 ± 46	2,59	0,011
<i>BM2113</i>	141	ADG	97	570 ± 9	7	498 ± 18	2,10	0,038
<i>INRA23</i>	214	ADG	57	580 ± 14	47	546 ± 9	1,99	0,049
<i>INRA23</i>	214	ADG2	57	481 ± 16	47	438 ± 12	2,05	0,043
<i>BM1818</i>	258	ADG1	132	738 ± 13	16	865 ± 38	3,10	0,002
<i>BM1818</i>	260	ADG2	96	468 ± 11	8	378 ± 20	2,31	0,023
<i>BM1824</i>	178	ADG	93	555 ± 8	11	648 ± 41	3,47	<0,001
<i>BM1824</i>	178	ADG1	135	744 ± 13	13	834 ± 40	2,04	0,043
<i>BM1824</i>	180	ADG1	83	727 ± 16	65	784 ± 20	2,24	0,027
<i>BM1824</i>	180	ADG2	64	479 ± 15	40	433 ± 14	2,12	0,037

Характерно, що один з них (*BM1824*¹⁸⁰) пов'язаний із підвищенням середньодобових приростів від народження до відлучення (ADG1), але при цьому він також був пов'язаний зі зниженням середньодобових приростів на відгодівлі (ADG2). Тому даний алель не може розглядатися як однозначно маркерний.

У цілому, було відмічено три алеля (*BM1824*¹⁷⁸, *TGLA227*⁸³, *BM1818*²⁵⁸), наявність яких у генотипі телиць ПМП забезпечувала більш інтенсивний ріст живої маси та ще три (*BM2113*¹⁴¹, *INRA23*²¹⁴, *BM1818*²⁶⁰), що були пов'язані із повільним зростанням живої маси у різні вікові періоди (табл. 3).

Таблиця 3

Асоціації між приростами телиць ПМП і наявністю в їх генотипі певних алелів за локусами МС-ДНК

Показники приростів	Алелі	
	позитивно пов'язанні	негативно пов'язанні
ADG	<i>BM1824</i> ¹⁷⁸	<i>BM2113</i> ¹⁴¹ ; <i>INRA23</i> ²¹⁴
ADG1	<i>TGLA227</i> ⁸³ ; <i>BM1818</i> ²⁵⁸ ; <i>BM1824</i> ¹⁷⁸	-
ADG2	-	<i>INRA23</i> ²¹⁴ ; <i>BM1818</i> ²⁶⁰

Економічна ефективність використання даного способу раннього відбору телиць ПМП за рахунок ДНК-генотипування становить 2044,0 грн у розрахунку на одну голову, або 6,76 грн на 1 кг маси туші.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Банникова А. А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // Журнал общей биологии. 2004. Т. 65. № 4. С. 278-305.

Брем Г., Кройслих Х., Штранцингер Г. Экспериментальная генетика в животноводстве. М. : Изд-во Россельхозакадемии, 1995. 326 с.

Вейр Б. Анализ генетических данных. М. : Мир, 1995. 399 с.

Гиль М. І. Генетичний аналіз полігенно обумовлених та поліморфних ознак худоби молочних порід: автореф. дис... д-ра с.-г. наук: 06.02.01 / М.І. Гиль ; УААН. Ін-т розведення і генетики тварин. с. Чубинське Київ. обл., 2008. 41 с.

ДНК технологии оценки сельскохозяйственных животных / [Л. А. Калашникова, И. М. Дубинин, В. И. Глазко и др.]. Лесные поляны, Московская обл. : ВНИИплем, 1999. 148 с.

ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих / [В. И. Глазко, Е. В. Шульга, Т. Н. Дымань и др.]. Белая Церковь, 2001. 488 с.

Животовский Л. А. Популяционная биометрия. М. : Наука, 1991. 271 с.

Зиновьева Н. А. Гладырь Е. А. Генетическая экспертиза сельскохозяйственных животных: применение тест-систем на основе микросателлитов // Достижения науки и техники АПК. 2011. № 9. С. 19-20.

Календарь Р. Н., Глазко В. И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2002. Т. 34. С. 279-296.

Копилов К. В. Стан та перспективи використання генотипного маркування в селекції тварин // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. К., 2010. Т. 8. № 1. С. 91-98.

Кузнецов В. М. Методы племенной оценки животных с введением в теорию BLUP. Киров : Зональный НИИСХ Северо-Востока, 2003. 358 с.

Кузнецов В. М. Ассоциация групп крови с количественными признаками. MAS и геномная селекция [Электронный ресурс]. Режим доступа : http://vm-kuznetsov.ru/files/etude/13_blood_gs.pdf

Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве / [Н. А. Зиновьева, А. П. Попов, Л. К. Эрнст и др.]. Дубровицы : ВИЖ, 1998. 47 с.

Мухина Ж. М. Дубина Е. В. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях // Научный журнал КубГАУ. 2011. №66 (02). 11 с.

Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификации племенного материала в животноводстве / [Н. А. Зиновьева, П. М. Кленовицкий, Е. А. Гладырь и др.]. М. : РУДН, 2008. 329 с.

Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства. М. : ВИЖ РАСХН, 2010. 512 с.

Сулимова Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи современной биологии. 2004. Т. 124. № 3. С.260-271.

Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. С. 1044-1054.

Эрнст Л. К., Зиновьева Н. А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. М. : РАСХН, 2008. 501 с.

Навчально-наукове видання

**РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОГРАМ СЕЛЕКЦІЙНОЇ
РОБОТИ В СКОТАРСТВІ З ВИКОРИСТАННЯМ
МАРКЕР-ДОПОМІЖНОЇ СЕЛЕКЦІЇ**
(виробничо-практичні рекомендації)

Укладачі:

Крамаренко Олександр Сергійович
Луговий Сергій Іванович
Крамаренко Сергій Сергійович

Відповідальний за випуск: С. І. Луговий
Редактор: С. І. Луговий
Комп'ютерний набір: О. С. Крамаренко

Підписано до друку 27.11.2019 р.
Папір офсетний. Друк офс.
Ум. друк. арк. 1,5. Наклад 20 прим. Формат 60 × 84/16.
Зам. №523.

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.