

АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СУБПОПУЛЯЦІЙ УКРАЇНСЬКИХ М'ЯСО-ЯЄЧНИХ КУРЕЙ З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ

Р. О. Кулібаба, кандидат сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник

Ю. В. Ляшенко, кандидат сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник
Інститут тваринництва НААН

Проведено аналіз генетичної диференціації субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей (Г-1, Г-2, Г-3, Г-4 та С) з використанням мікросателітних маркерів. Встановлено, що за значенням генетичних дистанцій найбільше віддаленими є субпопуляції Г-1 та Г-4 (28,8% відмінностей), в той час як найбільш подібними – субпопуляції Г-2 та Г-3 (13,3% відмінностей). За аналізом F-статистик Райта з'ясовано, що більша частина виявленої генетичної мінливості припадає на внутрішньопопуляційну складову (9,2% загальної генетичної мінливості є розподіленою між субпопуляціями та 90,8% – всередині субпопуляцій).

Ключові слова: популяція, кури, мікросателіти, поліморфізм, алель, генетична структура.

Постановка проблеми. Вивчення генетичної структури дослідних популяцій різних видів тварин і птиці є одним з найбільш актуальних завдань сучасної сільськогосподарської біології. Дослідження генетичної диференціації видів і популяцій проводиться на рівні спадкового матеріалу з використанням різних типів молекулярно-генетичних маркерів, що дозволяє більш точно, у порівнянні з оцінкою за фенотипом, оцінити рівень генетичної мінливості [1]. Мікросателіти відносяться до одного з найбільш перспективних і популярних типів ДНК-маркерів, що широко застосовуються у молекулярній біології для вирішення великої кількості завдань [2]. Мікросателіти активно використовують і для вирішення різних завдань у птахівництві [3, 4]. Основна сфера застосування мікросателітних маркерів – генетико-популяційна характеристика дослідних груп, філогенетичний аналіз, генетична диференціація популяцій, контроль проведення селекційної роботи, ідентифікація та паспортизація різних порід і ліній тощо [4]. Також, крім

© Кулібаба Р.О., Ляшенко Ю.В., 2018

генетико-популяційних досліджень, проводять пошук різних алелів мікросателітних локусів, що пов'язані з проявом кількісних ознак [5, 6]. Особливий інтерес, у даному контексті, викликають роботи, спрямовані на пошук асоціативного зв'язку різних алелів мікросателітних локусів з резистентністю птиці до вірусних захворювань, зокрема до хвороби Марека [7, 8].

Однак, незважаючи на явні переваги, роботи з використанням сучасних досягнень молекулярної генетики у вітчизняному птахівництві представлені тільки у вигляді одиничних, окремих досліджень, що проведені, за рідкісним винятком, на комерційних породах курей [9-11].

Мета досліджень – визначення генетичної диференціації п'яти субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей з використанням мікросателітних маркерів.

Матеріал та методика досліджень. Дослідження проведено у лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Державної дослідної станції птахівництва НААН, а також у лабораторії молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН.

Для проведення досліджень використовували різні субпопуляції м'ясо-яєчних курей української селекції (Г-1, Г-2, Г-3, Г-4 та С).

М'ясо-яєчні кури представлені 5 субпопуляціями, що відрізняються за забарвленням оперення та продуктивними ознаками. До субпопуляцій м'ясо-яєчних курей відносять: Г-1 – зозулясті; Г-2 – білі; Г-3 – золотисті; Г-4 – рябі; С – сріблясті [12, 13]. Від кожної популяції відібрано по 30 особин (n=30).

Усі дослідні субпопуляції курей характеризуються вираженою комбінованою продуктивністю та доброю пристосованістю до розведення в фермерських та присадибних господарствах [14]. Жива маса курей на 48 тиждень життя в межах субпопуляцій складає 2,46-3,11 кг; маса яйця на 40-48 тиждень життя – від 60,2 до 62,8 г; несучість на середню несучку за 40 тижнів життя – від 74,2 до 89,6 яєць; збереженість – від 79,7 до 92,6% [15].

В якості джерела біологічного матеріалу використовували перо птиці. Виділення ДНК з дослідних зразків проводили з використанням комерційного набору реагентів «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», Росія).

Для проведення ампліфікації використовували наступні олігонуклеотиди:

LEI0094 – 5'-gatctcaccagtagtgagctgc-3' і 5'-tctcacactgtaacacagtg-3';
MCW0034 – 5'-tgtcctccaattacattcatggg-3' і 5'-tgcacgcacttacatacttagaga-3';
ADL0278 – 5'-ccagcagctctaccttctat-3' і 5'-tgtcatccaagaacagtg-3';
ADL0268 – 5'-ctccaccctctcagaacta-3' і 5'-caactcccatctacctact-3';
MCW0081 – 5'-gttgctgagagcctgggag-3' і 5'-cctgtatgtggaattactctc-3';
LEI0166 – 5'-tatcccctggctgggagttt-3' і 5'-ctcctgcccttagctacgca-3';
MCW0104 – 5'-tagcacaactcaagctgtgag-3' і 5'-agacttgacacagctgtgacc-3';
MCW0123 – 5'-ccactagaagaagaacatcctc-3' і 5'-ggctgatgtaagaaggatga-3'.

Локуси MCW0081, MCW0034, MCW0104, ADL0268, LEI0166, ADL0278, LEI0094, MCW0123 відносяться до рекомендованих ISAG-FAO для проведення типування ліній і порід курей [16].

Ампліфікацію проводили з використанням відповідної програми: 1 цикл – денатурація 94°C 3 хв; 35 циклів – денатурація 94°C 45 с, відпал 45 с (60°C для всіх локусів), елонгація 72°C 45 с; 1 цикл – фінальна елонгація 72 °C 10 хв. Об'єм реакційної суміші склав 20 µL, концентрація праймерів – 0,2 мкМ у кожному випадку.

Продукти ампліфікації розділяли в поліакриламідних гелях різних концентрацій (4-8 %), як нативних, так і денатуруючих. Візуалізацію проводили з використанням бромистого етидію в ультрафіолетовому спектрі. Розмір фрагментів визначали з використанням маркерів молекулярних мас М-12, М-20, М-50, М-100 (Изоген, Росія).

На основі отриманих даних розраховували фактичний (O) та теоретичний розподіл генотипів (E), частоти генотипів і алелів, фактичну (Ho) й очікувану (He) гетерозиготність відповідно до загальних методик [17, 18]. З використанням програми PIC calculator (<https://www.liverpool.ac.uk/~kempsj/pic.html>) розраховували значення інформативної цінності поліморфних маркерів (PIC, Polymorphism Information Content)

[19]. F-статистики Райта (індекси фіксації) визначали за допомогою програми GenAlEx 6.5b4 (<http://biology.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html>). Філогенетичний аналіз субпопуляцій проводили з використанням пакету програм PHYLIP 3.69 (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip/getme.html>) та MEGA 7.0.26 (http://www.megasoftware.net/download_form).

Результати досліджень. За результатами аналізу генетичного різноманіття дослідних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей української селекції виявлено поліморфізм за кожним з вивчених мікросателітних локусів. Дослідні групи курей розрізнялися між собою за сукупністю показників генетичної мінливості.

На рисунку 1 приведено дані щодо співвідношення кількості алелів за кожним з визначених поліморфних локусів у різних субпопуляціях м'ясо-яєчних курей.

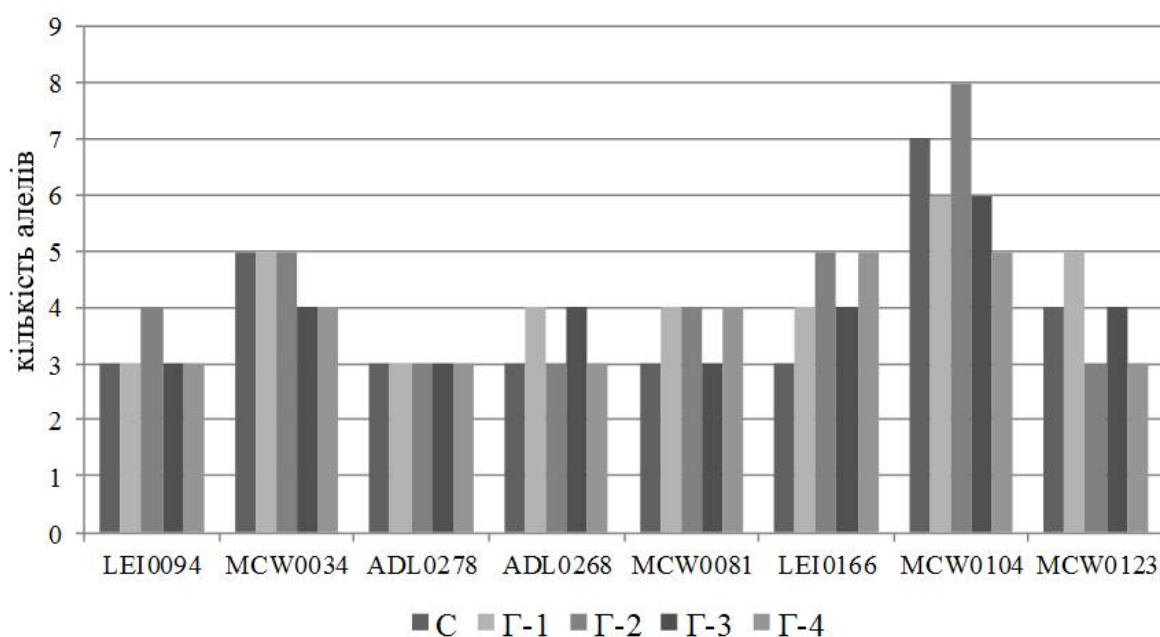


Рис. 1. Співвідношення кількості алелів за визначеними мікросателітними локусами в різних субпопуляціях м'ясо-яєчних курей

Загальний алелофонд дослідних субпопуляцій за 8 обраними мікросателітними локусами представлений 38 різними аелями. За виключенням ADL278, за всіма іншими мікросателітними маркерами кількість алелів різниться в кожній із дослідних груп. Найменша кількість алелів серед усіх локусів склала три, найбільша – вісім. За всіма локусами найменшу

кількість алелів визначено у субпопуляції Г-4 (30), найбільшу – у субпопуляції Г-2 (35).

Найменше генетичне різноманіття за кількістю алелів на локус серед усіх дослідних популяцій показано для маркера ADL0278 (3 алелі на локус), найбільше – для MCW0104 (6,4 алелі на локус).

За результатами досліджень виявлено тільки два приватних алеля в субпопуляціях Г-2, за локусом LEI0094, та в Г-1, за локусом MCW0123.

За кожним з маркерів визначено показник інформаційного поліморфізму (PIC), який характеризує дискримінаційну здатність маркеру й, фактично, залежить від кількості алелів у локусі, а також від розподілу їх частот та, тим самим є еквівалентним генному різноманіттю.

Так як значення PIC залежить від частоти зустрічальності алелю, то слід очікувати, що в різних дослідних популяціях величина інформативної цінності використаних маркерів буде різною. За результатами досліджень з'ясовано, що до найбільш інформативних ($PIC \geq 0,5$) локусів відносяться MCW0034, ADL0268, MCW0104, MCW0123 (за винятком субпопуляції Г-4) та LEI0166 (за винятком субпопуляції С). До найменш інформативних локусів відноситься LEI094.

За співвідношенням очікуваної та фактичної гетерозиготності з усіх субпопуляцій найбільш вирівняними є Г-1 та Г-3 (рис. 2). В Г-1 показник F_{is} приймає негативне значення у локусах LEI0094 (-0,16), ADL0278 (-0,16) та MCW0081 (-0,12), що вказує на наявність ексцесу гетерозигот ($p_{\chi^2} < 0,05$). За рештою локусів значення F_{is} – позитивні та досягають максимуму в локусах MCW0034 (0,36) й MCW0104 (0,42).

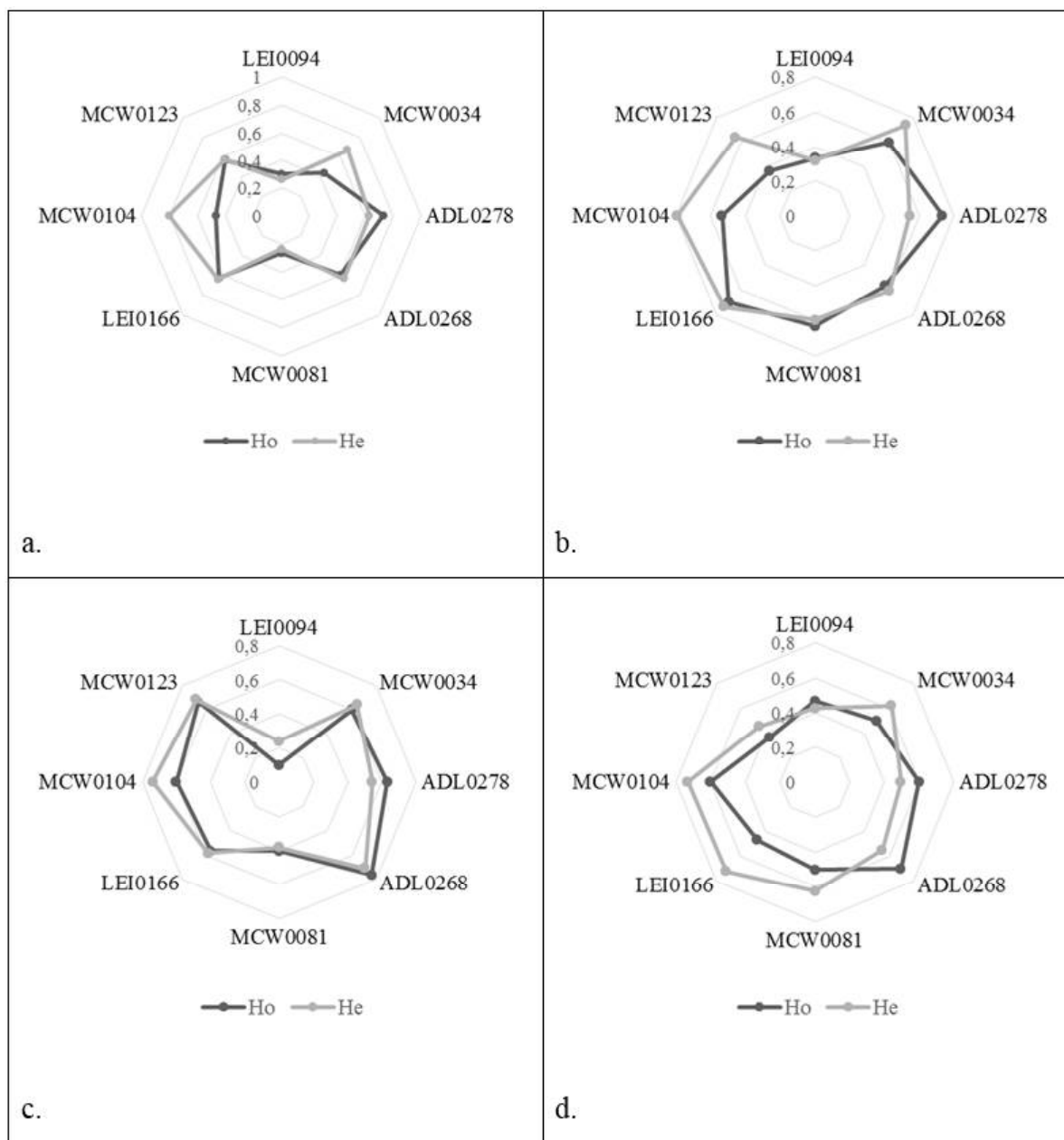


Рис. 2. Показники очікуваної (H_e) та фактичної (H_o) гетерозиготності в дослідних субпопуляціях курей. а. – субпопуляція Г-1; б. – субпопуляція Г-2; с. – субпопуляція Г-3; d. – субпопуляція Г-4.

У свою чергу в субпопуляції Г-2 картина дещо зміщена в бік більшої кількості гомозиготних особин у популяції (інбридинг). Негативне значення F_{is} відзначено тільки для локусу ADL0278 (-0,35; $p_{\chi^2} > 0,05$). При цьому дефіцит гетерозиготних особин ($p_{\chi^2} < 0,01$) спостерігався для локусів MCW0034 (0,19), MCW0104 (0,33) та MCW0123 (0,43).

У субпопуляції Г-3 відмічена найбільш подібна картина співвідношення показників гетерозиготності (рис. 2с). Серед істотних відхилень від рівноважного стану за Харді-Вайнбергом слід відмітити розподіл частот алелів для локусів ADL0278 ($F_{is} = -0,16$), MCW0104 ($F_{is} = 0,19$) та LEI0094 ($F_{is} = 0,58$).

У субпопуляції Г-4 відмічено тенденцію до збільшення гетерозиготних особин ($F_{is} < 0$, $p_{\chi^2} > 0,05$) для локусів LEI0094 (-0,10), ADL0278 (-0,21) та ADL0268 (-0,27) та зміщення рівноваги в бік гомозигот за локусами MCW0034 (0,20), MCW0081 (0,20; $p_{\chi^2} > 0,05$), LEI0166 (0,35), MCW0104 (0,18) та MCW0123 (0,19; $p_{\chi^2} > 0,05$).

Серед усіх дослідних груп субпопуляція С, за співвідношенням показників гетерозиготності, є найбільш контрастною (рис. 3).

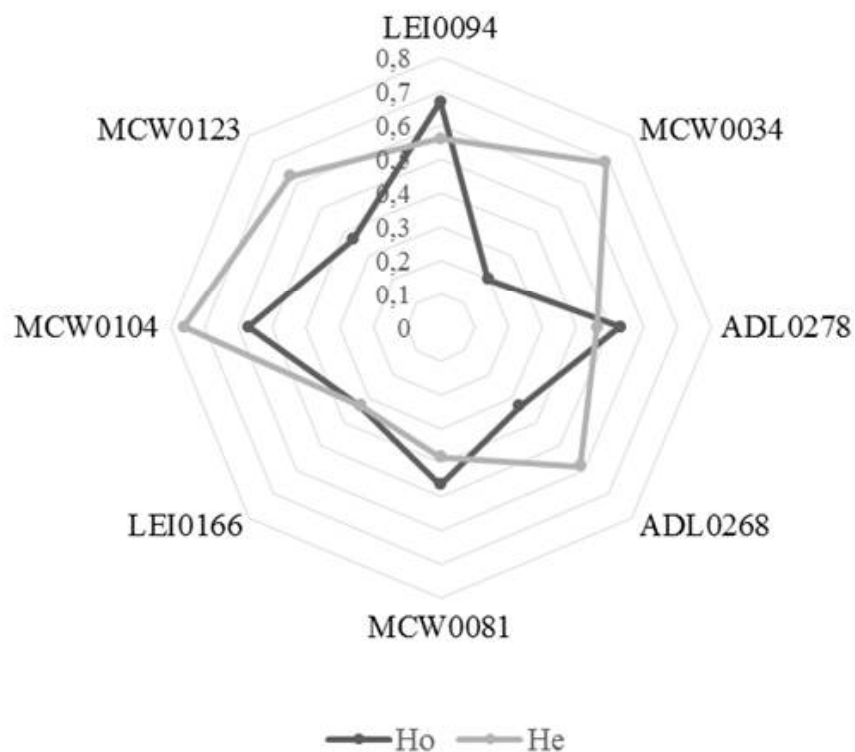


Рис. 3. Показники очікуваної (He) й фактичної (Ho) гетерозиготності у субпопуляції С.

У даної групи курей негативні значення F_{is} виявлено для локусів LEI0094 (-0,19), ADL0278 (-0,15) та MCW0081 (-0,21), проте вони знаходились в межах статистичної похибки

($p_{\chi^2} > 0,05$). Позитивні – для MCW0034 (0,710), ADL0268 (0,43), MCW0104 (0,25) та MCW0123 (0,42).

Таким чином, за результатами аналізу середніх значень показників H_e , H_o і F_{is} , можна відзначити, що в кожній з дослідних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей простежується тенденція до редукції гетерозиготних особин ($F_{is} > 0$). При цьому у субпопуляції С вона найбільш виражена (15,6 %), для решти – знаходиться в межах 5,4-7,6 % ($p_{\chi^2} > 0,05$). Подібна картина вказує на поступове збільшення ступеню інбредності дослідних популяцій, що, у свою чергу, свідчить про використання в селекційному процесі близькоспоріднених схрещувань.

Середнє значення показнику F_{st} , який характеризує міжсубпопуляційні відмінності за всіма визначеними локусами в усіх дослідних вказує на те, що 9,2% загальної генетичної мінливості є розподіленою між субпопуляціями й 90,8% – всередині субпопуляцій. (табл. 1).

Таблиця 1

Показники F-статистики за 8 мікросателітними локусами у дослідних субпопуляціях курей

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}
LEI0094	-0,036	0,035	0,069
MCW0034	0,307	0,370	0,091
ADL0278	-0,206	-0,162	0,037
ADL0268	0,040	0,150	0,115
MCW0081	-0,018	0,071	0,087
LEI0166	0,106	0,228	0,137
MCW0104	0,275	0,350	0,103
MCW0123	0,219	0,297	0,100
В середньому($\bar{x} \pm s_x$)	0,086 \pm 0,062	0,167 \pm 0,064	0,092 \pm 0,011

За винятком ADL0278 значення індексу фіксації узагальненої популяції м'ясо-яєчних курей (F_{it}) вказують на достатньо виражений дефіцит гетерозиготних особин за кожним з локусів (табл. 1). F_{it} – це коефіцієнт інбридингу особини відносно всієї популяції без урахування її внутрішньої структури. Приймаючи до уваги, що досліджувані сублінії лише умовно

можна прийняти як підрозділені частини однієї породи курей, більш інформаційним є показник F_{is} , що відображає співвідношення N_e і N_o в межах кожної сублінії.

Як впливає з представлених у таблиці даних, вклад кожного локусу в показник міжпопуляційної мінливості дещо відрізняється. Значення, що характеризують середній рівень дивергенції, знаходяться у межах 0,06 – 0,15 [20]; чому відповідають всі локуси за виключенням ADL0278 ($F_{st}=0,037$). Таким чином, якщо порівняти досліджені локуси з незалежними повторностями субпопуляцій курей, то опираючись на величину коефіцієнта F_{st} та його похибку ($0,092 \pm 0,011$) можна стверджувати про середній рівень дивергенції в підрозділеній популяції. Приймаючи до уваги, що дослідні лінії курей не є частинами одного цілого (як за визначенням має бути в підрозділеній популяції), проте мають спільне походження від однієї предкової породи курей (створені на основі гібридизації), проведено оцінку рівня спорідненості субпопуляцій на основі визначення генетичних дистанцій.

Дані за значенням генетичних дистанцій за N_e приведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Генетичні дистанції і генетична подібність субпопуляцій м'ясо-яєчних курей

Субпопуляції	Г-1	Г-2	Г-3	Г-4	С
Г-1	***	0,158	0,207	0,288	0,253
Г-2	0,854	***	0,133	0,154	0,153
Г-3	0,813	0,876	***	0,204	0,232
Г-4	0,750	0,857	0,816	***	0,176
С	0,776	0,858	0,793	0,839	***

Примітка: генетичні дистанції відображені над діагоналлю; генетична подібність – під діагоналлю.

За результатами досліджень встановлено, що найбільш генетично віддаленими є субпопуляції Г-1 та Г-4 (28,8% відмінностей), в той час як найбільш подібними – субпопуляції Г-2 та Г-3 (13,3% відмінностей).

Результати досліджень підтверджуються загальною структурою філогенетичного дерева, що побудоване на підставі значень генетичних дистанцій за Nei з використанням методу незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA) (рис. 4).

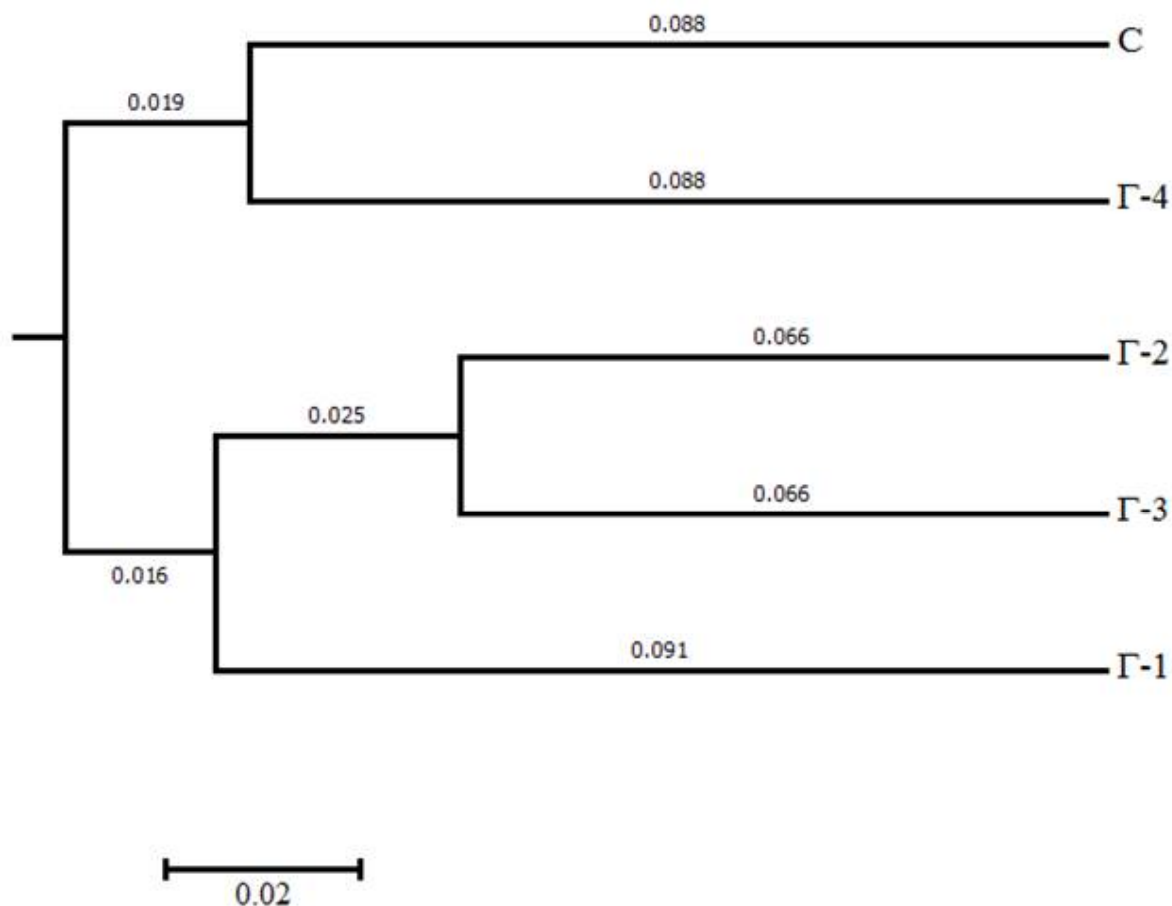


Рис 4. Дендрограма міжпопуляційних взаємін, побудована на основі аналізу генетичних дистанцій за Nei методом незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA)

У цілому, при аналізі дендрограми можна відзначити, що топологія дерева відповідає описаним вище закономірностям та відображає виявлені відмінності/подібності дослідних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей. Субпопуляції Г-2 та Г-3, а також субпопуляції Г-4 та С, формують два окремих кластери. При цьому кластер Г-2 + Г-3 формується з більшого кластеру з Г-1.

Висновки. У результаті проведених досліджень з вивчення особливостей генетичної диференціації різних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей української селекції з використанням восьми мікросателітних локусів, виявлено виражені міжсубпо-

пуляційні відмінності, що відповідають середньому ступеню дивергенції у дослідних групах птиці. Це відображає спільність їх походження та інтенсивність селекційної роботи, що проводиться. Рівень редукції гетерозиготних особин в межах субпопуляцій ($F_{is}=0,086$) свідчить про використання близькороднених схрещувань, однак, незважаючи на це, у популяціях в наявності достатні резерви генетичної мінливості.

Список використаних джерел:

1. Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding / E.K. Khlestkina // Russ. J. Genetics. – 2014. – Vol. 4 (3). – P. 236–244.
2. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful / M.L.C. Vieira, L. Santini, A.L. Diniz [et al.] // Genetic and molecular biology. – 2016. – Vol. 39 (3). – P. 312–328.
3. Absence of population substructuring in Zimbabwe chicken ecotypes inferred using microsatellite analysis / F. Muchadeyi, H. Eding, C. Wollny [et al.] // Animal Genetics. – 2007. – Vol. 38, №4. – P. 332–339.
4. Gholizadeh M. Use of microsatellite markers in poultry research / M. Gholizadeh, G.R. Mianji // International Journal of Poultry Science. – 2007. – Vol. 6 (2). – P. 145–153.
5. Relationship between microsatellite marker alleles on chromosomes 1-5 originating from the Rhode Island Red and Green-legged Partridge breeds and egg production and quality traits in F2 mapping population / B. Wardecka, R. Olszewski, K. Jaszczak [et al.] // J. Appl. Genet. – 2002. – Vol. 43 (3). – P. 319–329.
6. Evolution of the polymorphism at molecular markers in QTL and non-QTL regions in selected chicken lines / V. Loywyck, B. Bed'hom, M.H. Pinard-van der Laan [et al.] // Genet. Sel. Evol. – 2008. – Vol. 40. – P. 639–661.
7. Microsatellite Markers Associated with Resistance to Marek's Disease in Commercial Layer Chickens / J.P. McElroy, J.C. Dekkers, J.E. Fulton [et al.] // Poultry Science. – 2005. – Vol. 84. – P. 1678–1688.
8. Bumstead N. Genomic mapping of resistance to Marek's disease / N. Bumstead // Avian Pathology. – 1998. – Vol. 27. – P. S78–S81.
9. Romanov M.N. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers / M.N. Romanov, S. Weigend // Poultry science. – 2001. – Vol. 80. – P. 1057–1063.
10. Генотипування курей кросу "Ломан білий" / А.В. Шельов, В.Г. Спиридонов, С.Д. Мельничук [та ін.] // Біологія тварин: науково-теоретичний журнал. – 2009. – Том. 11, № 1. – С. 276–280.
11. Використання мікросателітних маркерів ДНК для контролю походження та однорідності популяцій сільськогосподарської птиці / А.В. Шельов, Н.П. Пономаренко, В.П. Бородай [и др.] // Сучасне птахівництво. – 2013. – № 2 (123). – С. 16–19.
12. Моніторинг імуногенетичної структури курей різних порід / О.П. Подстрешний, В.П. Хвостик, І.О. Подстрешна [та ін.] // Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб. – 2011. – Вип. 67. – С. 65–73.
13. Генетична структура м'ясо-яєчних курей за поліморфними білковими локусами / О.П. Подстрешний, С.В. Руда, В.В. Богатир [та ін.] // Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб. – 2004. – Вип. 54. – С. 73–79.
14. Катеринич О.А. Борковские мясо-яичные куры – птица для фермерских и приусадебных хозяйств / О.А. Катеринич, Ю.В. Бондаренко, В.В. Богатырь // Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб. – 2003. – Вип. 53. – С. 70–75.

15. Господарсько корисні ознаки курей вітчизняного генофонду / В.П.Хвостик, О.П. Захарченко, Ю.С. Лютий [та ін.] // Птахівництво. Міжвідомчий науковий тематичний збірник. – 2013. – № 70. – С. 30–34.
16. FAO, 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. Food and Agriculture Organization of the United Nations Publ., Rome, Italy.
17. Меркурьева Е. К. Генетические основы селекции в скотоводстве // М.: Колос, 1977. – 240 с.
18. Nei M. Estimation of fixation indices and gene diversities / M. Nei, R.K. Chesser // Ann. Hum. Genet. – 1983. – Vol. 47. – P. 253–259.
19. Shete S. On Estimating the Heterozygosity and Polymorphism Information Content Value / S. Shete, H. Tiwari, R.C. Elston // Theoretical Population Biology. – 2000. – Vol. 57. – P. 265–271.
20. Кузнецов В.М. F-статистики райта: оценка и интерпретация / В.М. Кузнецов // Научно-теоретический журнал «Проблемы биологии продуктивных животных». – 2014. – №4. – С. 80–104.

Р. А. Кулибаба, Ю. В. Ляшенко. Анализ генетической дифференциации субпопуляций украинских мясо-яичных кур с использованием микросателлитных маркеров.

Проведен анализ генетической дифференциации субпопуляций украинских мясо-яичных кур (Г-1, Г-2, Г-3, Г-4 и С) с использованием микросателлитных маркеров. Выявлено, что по значениям генетических дистанций к наиболее удаленным относятся субпопуляции Г-1 и Г-4 (28,8 % различий), в то время как к наиболее близким – субпопуляции Г-2 и Г-3 (13,3 % различий). По анализу F-статистик Райта показано, что большая часть выявленной генетической изменчивости приходится на внутривидовую составляющую (9,2 % общей генетической изменчивости распределено между субпопуляциями и 90,8 % – внутри субпопуляций).

Ключевые слова: популяция, куры, микросателлиты, полиморфизм, аллель, генетическая структура.

R. Kulibaba, Y. Liashenko. Analysis of the genetic differentiation of subpopulations of Ukrainian meat-egg purposed chickens using microsatellite markers.

The genetic differentiation of the subpopulations of Ukrainian dual-purpose chickens (G-1, G-2, G-3, G-4 and C) was analyzed using microsatellite markers. It was revealed that the subpopulations of G-1 and G-4 were most remote by the values of genetics distances (28.8% of differences), while the G-2 and G-3 subpopulations were closest (13.3% differences). According to the analysis of Write's F-statistics, most of the revealed genetic variability was corresponded by the intra-population component (9.2% of the total genetic variability was distributed between subpopulations and 90.8% within subpopulations).

Keywords: population, chickens, microsatellites, polymorphism, allele, genetic structure.