УДК 636.082:636.52/58

ГЕНОТИПУВАННЯ КУРЕЙ КРОСУ «ЛОМАНН БІЛИЙ»

А. В. Шельов, В. Г. Спиридонов, С. Д. Мельничук,
В. П. Бородай, Н. П. Пономаренко

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Проведено дослідження генетичної структури двох популяцій курей промислових стад кросу «Ломанн білий» (популяції завезеної з Німеччини і популяції ППР «Зугреський» (Україна)) за використання мікросателітних маркерів встановлено різниці в їх генетичній структурі за частотами та кількістю алелей, які визначені маркерами ADL0268, MCW216, LEI0094, ADL0278, MCW248. Отримані результати є основою для подальшої оцінки інформаційності запропонованої панелі мікросателітних маркерів для генотипування курей яєчних кросів, які використовуються в Україні для виробництва продукції птахівництва та проведення їх комплексної оцінки.

Ключові слова: КУРИ, ГЕНОТИПУВАННЯ, МІКРОСАТЕЛІТНІ ЛОКУСИ, АЛЕЛІ

Молекулярно-генетичні методи досліджень набувають все більшого поширення у прикладних галузях сільськогосподарської науки. Так, ДНК-маркери широко використовуються для вирішення низки теоретичних і практичних завдань: вивчення генетичної мінливості, генетичної паспортизації тварин [1–4], а також у птахівництві [5, 6]. Дослідження генетичної структури порід, стад, ліній застосовуються з метою з'ясування генетичних процесів і оцінки генетичної ситуації, яка має місце в популяціях [7].

Нині в птахівничих господарствах нашої країни для формування промислових стад курей використовують племінний матеріал (інкубаційні яйця, добовий або ремонтний молодняк) з різних господарств-репродукторів України або завозять з-за кордону. Це, безумовно, має вплив на якісні показники племінної продукції та вимагає проведення контролю її якості. У цьому зв'язку використання маркерних ознак (у першу чергу ДНК-поліморфізму) має важливе значення, оскільки дозволяє провести ідентифікацію генотипів, оцінку генетичної різноманітності, виявити інтрогресії чужорідного матеріалу, визначити рівень гібридності тощо. Згідно з сучасними уявленнями [8], оцінка генетичної різноманітності за допомогою ДНК-маркерів дозволяє вивчити взаємовідносини між популяціями курей, та є основою для ідентифікації особин, для диференціації існуючих і створюваних популяцій. Тому актуальним є дослідження ДНК-поліморфізму у птиці з метою аналізу процесів, які мають місце при її відтворенні та вибору методів використання популяції і шляхів подальшої роботи з нею [9].

Виходячи з сказаного вище, метою цієї роботи було дослідити генетичну структуру двох популяцій курей промислового стада кросу «Ломанн білий», які отримані з різних племінних репродукторів; оцінити характер генетичних процесів, які присутні в цих популяціях за допомогою мікросателітних маркерів, встановити частоти виявлених алелей, рівень їхньої гетерозиготності, індекс поліморфізму (polymorphic information contents — PIC) та вірогідність виключення випадкового збігу алелей (probability of exclusion — PE).

Матеріали і методи

У відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК НУБіП проведено дослідження генотипування курей кросу «Ломанн білий». Для дослідження були відібрані зразки покривного пір'я з ділянки спини у 40 голів

курей промислового стада: 1 група — 20 курей, які завезені з Німеччини; 2 група — 20 курей з ППР «Зугреський» (Україна).

Геномну ДНК було ізольовано з пульпи покривного пір'я із використанням наборів «QIAamp® DNA Mini Kit» (Qiagen, Німеччина), згідно з інструкцією виробника. П'ять мікросателітних локусів було відбрано згідно з рекомендаціями Міжнародного комітету товариства генетики тварин (ISAG). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) застосовували для ампліфікації мікросателітних маркерів птиці в стандартних умовах. Продукти ПЛР денатурували формамідом (Sigma) та розділяли методом капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі «ABI Prizm 3130» Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США). Визначення розмірів алелей проводили шляхом використання програмного забезпечення «Gene Mapper 3.7» (Applied Biosystem, США) із використанням стандарту «Genescan-ROX 500» (Applied Biosystem, США). Частоти та кількість алелей оцінювали шляхом безпосереднього підрахунку та аналізу одержаних генотипів. Гетерозиготність (Hexp та Hobs), індекс поліморфізму (PIC) та вірогідність виключення випадкового збігу алелей (PE) було визначено за використання програмного забезпечення Cervus 3.0.3 [10] та PowerStats V12 (Promega).

Результати й обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що за локусом ADL268 досліджуванні популяції курей істотно не відрізняються одна від одної: в обох популяціях виявлено алель ні варіанти 108, 110 та 112 п.н., які зустрічаються з майже однаковою частотою (табл. 1), що свідчить про їх генетичну спорідненість.

Таблиця 1

Кількість (n) та частота ідентифікованих алелей у курей кросу «Ломанн білий»

Назва маркеру	1 група				2 група				
	n	Частоти алелів			n	Частоти алелів			
ADL268	3	108 (0,450)	110 (0,425)	112 (0,125)	3	108 (0,525)	110 (0,325)	112 (0,150)	-
MCW216	1	137 (1,000)	-	-	2	135 (0,025)	137 (0,975)	-	-
LEI094	2	259 (0,825)	261 (0,175)	-	4	259 (0,825)	261 (0,100)	263 (0,025)	279 (0,050)
ADL278	2	114 (0,750)	116 (0,250)	-	2	114 (0,750)	116 (0,250)	-	-
MCW248	1	213 (1,000)	-	-	3	211 (0,200)	213 (0,775)	221 (0,025)	-

Алельний варіант локусу MCW216 розміром 135 п.н. виявлено лише у курей 2-ї групи і зустрічається він з частотою 0,025. Алельний варіант цього локусу розміром 137 п.н. зустрічається в обох популяціях з приблизно однаковою частотою (1 група — 1,000, 2 група — 0,975).

За локусом LEI094 алелі розміром 263 та 279 п.н. з частотою 0,025 та 0,050 відповідно виявлено лише в курей другої популяції; частота алелю 259 п.н. є однаковою (0,825) для обох популяцій курей, а алель 261 п.н. у 1,75 раза частіше зустрічається в курей 1 групи.

За локусом ADL278 у досліджуваний популяціях курей виявлено лише алелі 114 та 116 п.н. з однаковою частотою (0,750 і 0,250 відповідно). Особливістю курей другої популяції є те, що вона на 100 % представлена гомозиготами, на відміну від курей першої популяції, в якій виявлено дві гетерозиготні особини, про свідчить різниця у значеннях Hobs (табл. 2).

Таблиця 2

Гетерозиготність (Hexp та Hobs), індекс поліморфізму (PIC) та вірогідність виключення випадкового збігу алелей (PE) мікросателітних маркерів курей кросу «Ломанн білий»

Назва маркеру	1 група					2 група				
	n	Hobs	Hexp	PIC	PE	n	Hobs	Hexp	PIC	PE
ADL268	3	0,850	0,617	0,516	0,695	3	0,900	0,612	0,521	0,795
MCW216	1	0	0	0	0	2	0,050	0,050	0,048	0,002
LEI094	2	0,350	0,296	0,247	0,086	4	0,250	0,314	0,288	0,045
ADL278	2	0,100	0,385	0,305	0,008	2	0	0,385	0,305	0
MCW248	1	0	0	0	0	3	0,500	0,368	0,310	0,002
середнє	2,0	0,2600	0,2596	0,2136	0,1578	2,8	0,2500	0,3458	0,2944	0,1688
				CPE	0,7235				CPE	0,8046

Якщо в 1 групі всі кури були гомозиготними за алелем 137 п.н. локусу MCW216 та алелем 213 п.н. локусу MCW248, то 2 група курей була більш поліморфною. Так, у 2 групі виявлено одну курку , що є носієм алельного варіанту у 135 п.н. за локусом MCW216, а також 4 курки гомозиготні за алельним варіантом 211 п.н. та одну гетерозиготу, яка є носієм альльного варіанту 221 за локусом MCW248.

Розрахунок індексів гетерозиготності показав (табл. 2), що перша популяція курей за локусами ADL268 та LEI094 має тенденцію до гетерозиготизації (гетерозиготність є вища за очікувану), за алелем ADL278 — до гомозиготації, а за алелями MCW216 та MCW248 є гомозиготами. При цьому друга популяція курей проявляє тенденцію до гетерозиготизації лише за локусами ADL268 та MCW248, за локусом MCW216 вона знаходиться у стані рівноваги, за локусом LEI094 — має тенденцію до гомозиготації, за алелем ADL278 є гомозиготною. В цілому ж, як свідчать дані наведені в таблиці 2, за середньо популяційними значеннями показників гетерозиготності (Hexp та Hobs), перша виборка знаходиться у стані рівноваги, а друга має тенденцію до гомозиготації популяції.

Встановлені значення індексів поліморфізму (PIC) для досліджених популяцій курей свідчать про те, що як за всією панеллю праймерів у цілому, так і за кожним локусом, зокрема, друга популяція є більш гетерогенною.

Проведенні дослідження дають змогу зробити деякі висновки щодо інформативності як окремих маркерів, так і обраної панелі в цілому. Так, вірогідність виключення випадкового збігу алелей (PE) для ADL268 складала 0,695 для першої популяції та 0,795 для другої, що свідчить про високу інформативність маркера. За рештою праймерів для обох популяцій курей характерним є низьке значення вірогідності виключення випадкового збігу алелей. Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелей (CPE) становила 0,7235 (72,35 %) для популяції, що складається з курей 1 групи, та 0,8046 (80,46 %) для популяції, що складається з курей 2 групи. Це свідчить про недостатньо високий рівень інформативності обраної панелі мікросателітних маркерів для дослідження курей кросу «Ломанн білий».

Загалом, проведені дослідження дозволяють зробити висновок про те, що перша популяція курей за генетичною структурою є більш консолідованою, а друга — більш гетерогенною.

Висновки

Отже, у результаті проведених досліджень генетичної структури двох популяцій курей промислових стад кросу «Ломанн білий» (популяції завезеної з Німеччини і популяції ППР «Зугреський» (Україна)) за використання мікросателітних маркерів встановлено різниці

в їх генетичній структурі за частотами та кількістю алелей, які визначені маркерами ADL0268, MCW216, LEI0094, ADL0278, MCW248.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати є основою для подальшої оцінки інформаційності запропонованої панелі мікросателітних маркерів для генотипування курей яєчних кросів, які використовуються в Україні для виробництва продукції птахівництва та проведення їх комплексної оцінки.

A. V. Shelov, V. G. Spiridonov, S. D. Melnychyk, V. P. Boroday, N. P. Ponomarenko

GENOTYPE OF CHICKEN CROSS "LOMAN WHITE"

The results of researches of genetic structure of two populations of industrial chicken flocks of cross "Loman white" (the population imported from Germany and the population PPR "Zugreskiy" (Ukraine)) by using microsatellite markers established the differences in their genetic structure of the frequency and number of alleles identified markers ADL0268, MCW216, LEI0094, ADL0278, MCW248. Received results are the basis for further information valuation of the proposed panel of microsatellite markers for genotype of chicken egg cross used in Ukraine for the production of poultry and their complex valuation.

А. В. Шельов, В. Г. Спиридонов, С. Д. Мельничук, В. П. Бородай, Н. П. Пономаренко

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КУР КРОСУ «ЛОМАНН БЕЛЫЙ»

Проведены исследования генетической структуры двух популяций кур промышленных стад кроссу «Ломанн белый» (популяции завезенной из Германии и популяции ППР «Зугреський» (Украина)) за использование микросателитный маркеров установлено разницы в их генетической структуре за частотами и количеством аллелей, которые определены маркерами ADL0268, MCW216, LEI0094, ADL0278, MCW248. Полученные результаты являются основой для дальнейшей оценки информацийности предложенной панели микросателитный маркеров для генотипирование кур яичных кроссов, используемых в Украине для производства продукции птицеводства и проведения их комплексной оценки

1. *Гиль М. І.* Системний генетичний аналіз полігенно зумовлених ознак худоби молочних порід / Гиль М. І. — Миколаїв : МДАУ, 2008. — 478 с.

2. *Дзицюк В. В.* Хромосомний поліморфізм окремих видів і порід сільськогосподарських тварин : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. с.-г. наук : спец. 03.00.15 — «Генетика» / Дзицюк В. В. — Чубинське, 2009. — 30 с.

3. *Дубін О. В.* генетична диференціація геномів за маркерами ISSR-PCR та RAPD-PCR : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук : спец. 03.00.15 — «Генетика» / Дубін О. В. — Чубинське, 2009. — 20 с.

4. *Зиновьева Н. А*. Генетическая характеристика свиней пород крупная белая и йоркшир различного происхождения с использованием ДНК-маркеров / Зиновьева Н. А., Ларионова П. В., Тихомирова Т. И. и др. // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. — 2008. — № 2. — С. 33–36.

5. *Селина Н*. XXII Всемирный конгресс по птицеводству / Селина Н. // Птицеводство. — 2004. — № 10. — С. 38–43.

6. *Tadano R.* Assessing genetic diversity and population structure for commercial chicken lines based on forty microsatellite analyses / Tadano R., Nishibori M., Nagasaka N., Tsudzuki M // Poultry Science. — 2007. — Vol. 86, № 11. — P. 2309–2314.

7. *Зубець М. В.* Генетико-селекційний моніторинг у мясному скотарстві / Зубець М. В., Буркат В. П., Мельник Ю. Ф. та ін. ; за ред. М. В. Зубця. — К. : Аграрна наука, 2000. — 187 с.

8. *Подстрешний А. П.* Перспективы использования молекулярно-генетических маркеров в птицеводстве / Подстрешний А. П. // Обзор статей по материалам XXII Всемирный конгресс по птицеводству. — Харків : ТОВ «НТМТ», 2005. — С. 27–34.

9. *Подстрешний А. П.* Использование маркерных признаков для контроля за ходом селекционного процесса / Подстрешний А. П., Сочкан И. А., Вандюк П. В. // Птицеводство : Респ. Межвед. Тем наук сб. — К. : Урожай. — 1989. — Вып 42. — С 14–18.

10. *Marshall T. C.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural population / Marshall T. C., Slate I., Kruuk L., Pemberton I. M. // Mol. Ecol. — 1998. — № 7. — P. 639–655.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення ВРХ**,** доктор біологічних наук, професор В. Г. Янович.