

ВИЗНАЧЕННЯ ДНК-ПОЛІМОРФІЗМУ КРОЛІВ ЗА ISSR-МАРКЕРАМИ

Є. А. Шевченко¹, К. В. Копилов²

¹Черкаська дослідна станція біоресурсів
Інституту розведення і генетики тварин НААН

²Інститут розведення і генетики тварин НААН

Започатковано розроблення системи генетичної паспортизації порід і внутрішньопородних структур кролів, яка передбачає проведення досліджень у напрямку визначення їх популяційно-генетичних особливостей. Визначені оптимальні умови ДНК-типуювання кролів із застосуванням технології високолокусного типуювання за ISSR-маркерами. Встановлена молекулярно-генетична варіабельність вітчизняних та зарубіжних порід кролів на основі ISSR-ПЛР аналізу. Показано, що рівень поліморфізму геномної ДНК кролів не має спрямованого характеру і є невеликим. Частка поліморфних локусів в розрізі порід кролів суттєво не відрізнялася. Діапазон генетичних відстаней варіював у межах 0,229–0,416, ступінь генетичної різноманітності N_{ei} (h) становив 0,290, індекс Шеннона — 0,298, а ефективне число алелей — 1,438. Показана ефективність використання мікросателітних локусів (AG)₆C, (GA)₆C, (ACC)₉G до динуклеотидних та тринуклеотидних ділянок геномної ДНК для проведення генетичної паспортизації кролів новозеландської білої, сріблястої та каліфорнійської порід.

Ключові слова: КРОЛІ, ПОРОДА, ДНК-ПАСПОРТИЗАЦІЯ, ПОЛІМОРФІЗМ, МІКРОСАТЕЛІТНІ ЛОКУСИ, ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, ISSR-МАРКЕРИ, ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ.

Удосконалення селекційно-племінної роботи у сучасному кролівництві вимагає використання високоефективних селекційно-генетичних методів, побудови оціночних та селекційних індексів, оцінювання тварин за методом AM-BLUP та геномної селекції [1–3].

Основними задачами селекційно-племінної роботи у вітчизняному кролівництві є: удосконалення племінних і продуктивних якостей кролів різних порід, виведення нових заводських і внутріпородних типів кролів, тобто створення високопродуктивних стад цих тварин та їхнього молодяку високої якості та крупного розміру, з добрим опушенням і типовим для породи забарвленням волоссяного покриву. В наш час у селекційно-племінній роботі вітчизняного кролівництва використовуються такі ефективні методи, як оцінювання тварин за якістю нащадків, розведення за лініями та родинами. Проте визначення породності і племінної цінності кролів основного стада проводиться лише за фенотипом при бонітуванні [4].

Вивчення генетичного поліморфізму та пошук генетичних маркерів у кролівництві є однією з актуальних проблем генетики цих сільськогосподарських тварин. Поряд із морфологічною диференціацією, ДНК-генотипування (паспортизація) є досить точним і доречним методом вірогідної та надійної оцінки породності, що може бути використане для розпізнання унікальних генотипів кролів і проведення подальшої спрямованої селекції.

Для вивчення генетичного різноманіття та паспортизації кролів поряд з генетичними маркерами використовують ділянки ДНК, фланковані інвертованими повторами декануклеотидів (метод RAPD — random amplified polymorphic DNA) [5] або міні- та мікросателіти [6–10]. З їх допомогою проведено генотипування великого числа порід кролів, що розводяться в різних країнах Центральної та Західної Європи, а також Азії. Визначення породності цих тварин за ДНК-фінгерпринтом, який є додатковим елементом для ведення селекційно-племінної роботи, в Україні ще не вивчено.

Слід зазначити, що використання послідовностей мікросателітних локусів в якості праймерів для виявлення поліморфізму різних ділянок геномної ДНК кролів дозволить отримувати багатолокусні і високополіморфні спектри фрагментів геному [11], які добре відтворюються при поворних дослідженнях.

Таким чином, існує очевидна необхідність розроблення системи ДНК-паспортизації кролів вітчизняних та зарубіжних порід на основі використання мікросателітних локусів. В свою чергу розроблені унікальні ДНК-спектри для кожної породи (паспорта) можна використовувати, як еталони для проведення ідентифікації та підтвердження високопородності кролів.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували зразки крові кролів новозеландської білої (НБ), каліфорнійської (К) та сріблястої (С) порід, а також їх гібридів (Г) (кroleферма СГПП «Марчук Н. В.», с. Ташлик Смілянського району, Черкаської області) в кількості 1 мл (по 30 голів кожної породи), які відбирали з вушної вени в поліетиленові пробірки «Еппендорф», що містили 200 мкл 3,8 %-го розчину

цитрату натрію. Геномну ДНК з крові виділяли згідно стандартної методики [12], використовуючи набір «ДНК-сорб Б» («Амплісенс» Росія) за рекомендаціями виробника.

Генетичну паспортизацію кролів проводили шляхом ампліфікації відповідних ділянок геномної ДНК в полімеразно- ланцюговій реакції (ПЛР) з використанням 4-х інвертованих простих повторюваних послідовностей олігонуклеотидів або ди-, тринуклеотидних мотивів з якірними нуклеотидами на 3'-кінці (синтезовані Біо Тех Лаб, Україна) (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика праймерів для ДНК-типуювання кролів

№ п/п	Назва олігонуклеотиду	Послідовність (5'-3')	Температура відпаду	Мотив
1	S1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGC	58°	(AG) ₉ C
2	S2	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	58°	(GA) ₉ C
3	S3	ACCACCACCACCACCACCG	60°	(ACC) ₆ G
4	S4	GAGGAGGAGGAGGAGGAGC	60°	(GAG) ₆ C

Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 2 мкл буферу для ДНК полімерази, 1 мкл суміші трифосфатів («Амплісенс» Росія), 80 пмоль відповідного праймера (0,8 мкл/реакцію), 0,83 од. акт. (0,2 мкл) ДНК-полімерази («Fermentas», Литва). Геномна ДНК додавалась у кількості 1,5 мкл (25 нг). Загальний об'єм ПЛР-суміші становив 10 мкл.

Ампліфікацію сумарної ДНК з ISSR-праймерами проводили на програмованому чотирьохканальному термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», Росія), дотримуючись наступних умов: 7 хвилин денатурація при 94°C («гарячий старт»), 30 секунд денатурація при 94 °C, 30 секунд — відпал праймерів при 58 (60) °C, 2 хвилини — елонгація при 72 °C, 7 хвилин — досинтез при 72 °C; 32 цикли ампліфікації.

Продукти ампліфікації (амплікони) електрофоретично розділяли в 2 % агарозному гелі і забарвлювали бромистим етидієм з наступною візуалізацією в УФ-променях. Після проведення електрофорезу гель фотографували із використанням цифрового фотоапарату Fujifilm Fine Pix S2500. Аналізу підлягали «мажорні» смуги (які містили найбільшу кількість ампліфікованого продукту та були повторюваними), що виявлялися в результаті проведення трьох реакцій ампліфікації. Кожен утворений амплікон розглядався, як окремий локус. Розмір ампліфікованих фрагментів визначали із використанням програмного забезпечення TotalLab 2.01 [13] та GelQuest 3.04 [14]. Отримані дані математично обробляли за допомогою комп'ютерних програм GELSTAT [15] і PHYLIP [16].

На основі результатів електрофоретичного розділення отриманих фрагментів складали бінарні матриці, де «1» або «0» позначали, відповідно, присутність чи відсутність фрагменту певної довжини. Рівень геномної варіабельності різних порід кролів оцінювали за значеннями генетичних відстаней (GD-Genetic Distances). Генетичні відстані обчислювали на основі отриманої матриці даних, використовуючи коефіцієнт розбіжності. Надалі проводили кластерний аналіз для незважених середніх (UPGMA), бутстреп-тест із пакету прикладних програм Gelquest, а також Popgene version 1.32 [17] (значення середньої гетерозиготності, частки поліморфних локусів, ефективного числа алелей, ступінь генетичного різноманіття Nei, індекса Шеннона). Статистичний аналіз проводили з використанням програмного пакету Statistica 6.0 [18] та Excel (Microsoft Office 2010).

Результати й обговорення

Результат ДНК-фінгерпрінти різних порід кролів проявилися у вигляді дискретних смуг з інтенсивною гібридизацією і характеризувався різним числом, розташуванням та інтенсивністю виявлених фрагментів (рис. 1).

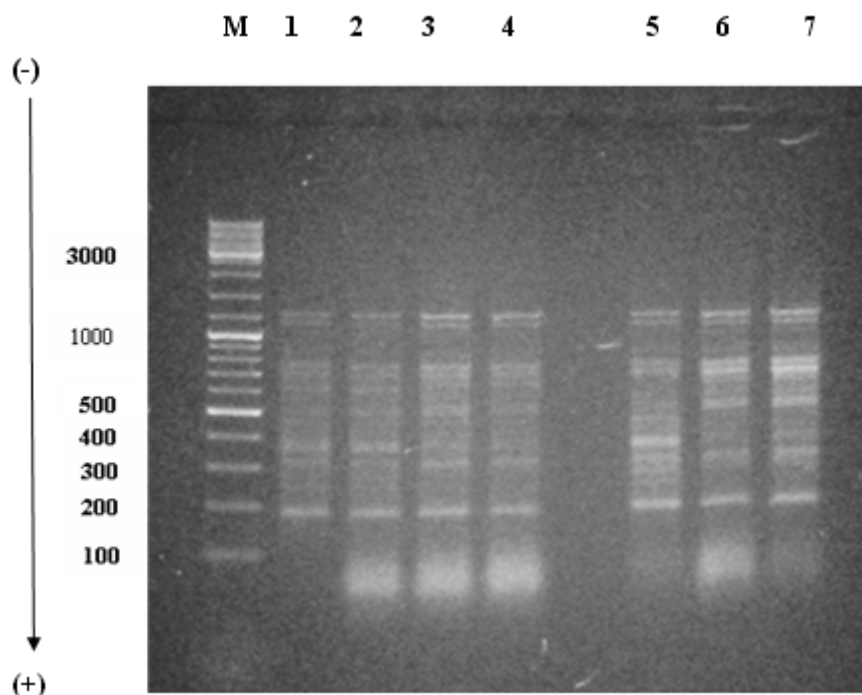


Рис. 1. ПЛР-аналіз зразків ДНК кролів із використанням S3-(ACC)₆G ISSR-маркера. Умовні позначення: М — молекулярний маркер O'geneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (Fermentas); 1–4, 6–7 — продукти ампліфікації ДНК кролів новозеландської білої породи; 5 — продукт ампліфікації ДНК міжпородних гібридів кролів

При використанні S1, S2, S3 праймерів у ході ампліфікації геномної ДНК кролів новозеландської білої, каліфорнійської, сріблястої породи та їх гібридів в середньому було отримано 11 поліморфних фрагментів, які склали 68 % до загального числа ампліконів. Усі праймери крім S4-олігонуклеотиду були ефективними для виявлення міжпородного поліморфізму (табл. 2).

Утворені амплікони спектру умовно можна розподілити на три групи: 600–1200 п.н., 700–1000 п.н. і 180–1200 п.н. При порівнянні праймерів S1, S2 та S3 по результатам їх використання у ISSR-ПЛР з метою маркування генофонду порід кролів встановлено, що найбільш полілокусний спектр спостерігався при використанні праймеру S3 в ISSR-ПЛР аналізі породи новозеландська біла (23 поліморфні локуси). Відмічена відмінність за кількістю локусів в спектрах при порівнянні трьох порід кролів при використанні праймеру S1 та S2, однак обидва ці олігонуклеотиди неінформативні відносно внутрішньопородного типу кролів. Найнижча кількість сегрегуючих (поліморфних) фрагментів спостерігалась у випадку ISSR-ПЛР з праймером S2.

Таблиця 2

ПЛР-аналіз геномної ДНК кролів вітчизняних та зарубіжних порід із використанням ISSR-маркерів

Порода кролів	Праймер	Кількість ампліфікованих фрагментів	Кількість поліморфних фрагментів	Межі ампліфікованих фрагментів, п.н.
Новозеландська біла	S1	18	10	600–1200
	S2	14	10	700–1000
	S3	27	23	180–1200
Каліфорнійська	S1	10	5	600–1200
	S2	11	8	700–1000
	S3	23	17	180–1200
Сріблястий	S1	15	8	600–1200
	S2	7	5	700–1000
	S3	21	12	180–1200
Гібриди	S1	13	7	600–1200
	S2	7	5	700–1000
	S3	25	19	180–1200

Після проведення ISSR-ПЛР аналізу геномної ДНК кролів досліджуваних порід разом з поліморфними локусами були виявлені константні амплікони (мономорфні локуси). За праймером S1 у

всіх досліджуваних груп тварин були виявлені бенди розміром 750, 850 і 1100 п.н., за праймером S2 — 500, 600, 700 п.н. і з праймером S3 — 180, 280, 510, 800, 890, 1150 і 1200 п.н. відповідно.

Загалом, кожен праймер, що використовувався в методі ISSR-PCR, зумовлював формування праймероспецифічного спектра ампліконів, що є наслідком генотипової специфіки породи і нуклеотидна послідовність праймера.

Встановлено, що значення середньої гетерозиготності (He) та частки поліморфних локусів (P) для ISSR-праймерів S1 та S2, на відміну від олігонуклеотиду S3, за диференціювання досліджених порід кролів суттєво не відрізнялися (табл.3).

Створена матриця попарних генетичних відстаней та на основі індексів генетичної схожості за маркерами ISSR-ПІР (праймер S3), зображена на рис. 2, як дендрограма генетичних взаємовідносин між досліджуваними породами тварин.

Таблиця 3

Генетична мінливість вітчизняних та зарубіжних порід кролів за ISSR-маркерами

Праймер	Новозеландська біла		Каліфорнійська		Сріблястий		Гібриди	
	He	P	He	P	He	P	He	P
S1	0,173	0,556	0,225	0,5	0,342	0,533	0,198	0,538
S2	0,312	0,714	0,292	0,727	0,275	0,714	0,311	0,714
S3	0,341	0,851	0,257	0,739	0,288	0,571	0,356	0,76

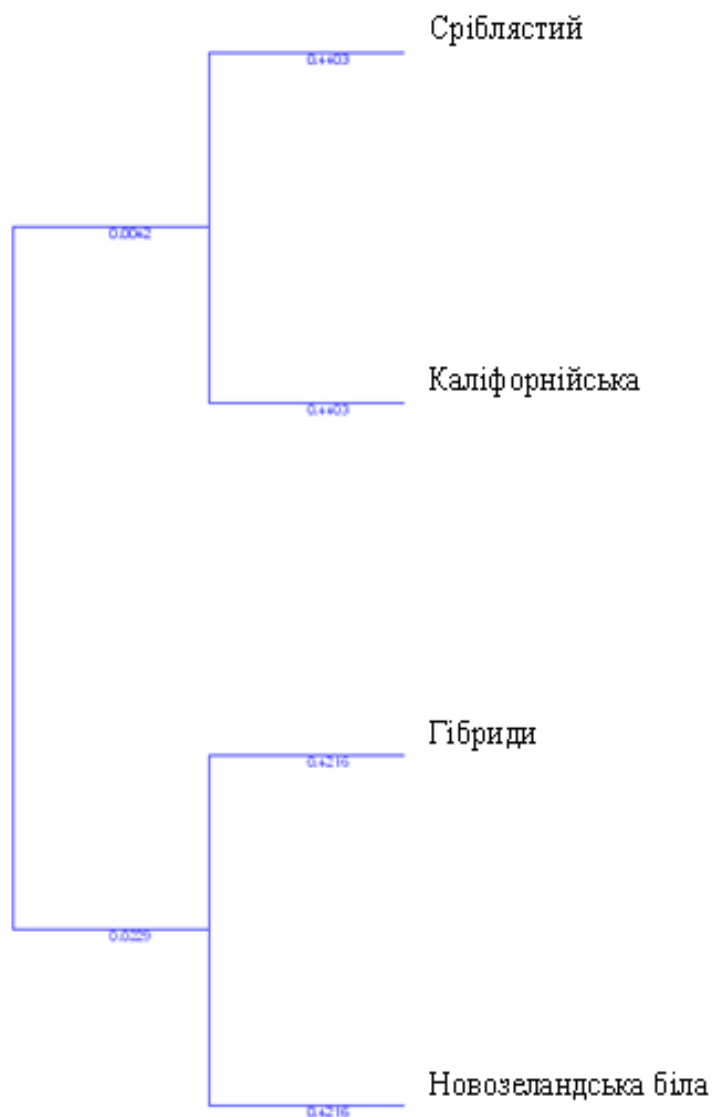


Рис. 2. Кластеризація (UPGMA) представників кролів 3 порід вітчизняної і зарубіжної селекції та їх міжпородних гібридів з використанням ISSR-ПІР аналізу (праймер S3) за матрицею подібності Жаккарда.

Діапазон генетичних відстаней між породами кролів варіював в межах від 0,0229 до 0,4216. При цьому, новозеландська біла порода кролів характеризувалася найбільшим ступенем генетичного різноманіття $Nei(h)$ — 0,290. Цьому значенню відповідав індекс Шенона — 0,298, а ефективне число алелей дорівнювало 1,438.

Слід зазначити, що кролі порід сріблястий і каліфорнійська утворюють споріднену гілку, у той час як новозеландська біла порода значно віддалена за значеннями генетичної відстані (0,0229).

У цілому, кластерний аналіз досліджуваних порід кролів виявив їх породне різноманіття. При цьому кластери усіх трьох порід підтримувались максимальними значеннями бутстрепа на дендрограмі, які формували дві чітко розмежовані гілки. В усіх трьох породах генетична різноманітність популяції не була високою, що може бути пов'язаним з невеликим числом ISSR-маркерів, які ми використовували в цьому дослідженні.

Важливо відмітити, що при приблизно подібних загальних діапазонах варіабельності ISSR-спектрів отриманих у ході проведення ПЛР з праймером S3 і RAPD-маркерів [5, 6, 9], рівень внутрішньопородного різноманіття, загалом для більшості порід дещо збільшився, в той час як рівень генетичного різноманіття між породами в середньому став нижчим. Аналогічні дані були показані і при ISSR-аналізі геному різних порід великої рогатої худоби та овець [19]. Ми вважаємо, що такі відмінності можуть бути пов'язані із природою й специфікою локалізації послідовностей, які маркуються за допомогою ISSR-методу.

Висновки

Використання ISSR-маркерів становить інтерес для молекулярно-генетичних досліджень кролів, які характеризуються доброю відтворюваністю.

При використанні в якості праймерів двох динуклеотидних повторів встановлена специфіка генетичної структури порід кролів вітчизняної та зарубіжної селекції. Використання методу аналізу поліморфізму послідовностей ДНК, фланкованих інвертаваними мікросателітними повторами, дозволяє отримувати полілокусні спектри, поліморфізм яких відображає специфіку генофонду тварин конкретної породи, а також дозволяє виявити зміни в структурі генофонду порід під дією різних умов відбору. Полілокусність спектра, кластеризація по генетичним відстаням свідчать про зручність використання цього типу генетично-молекулярних маркерів при виявленні як міжпородних так і внутрішньопородних генетичних відмінностей між різними групами кролів.

Показано, що міжмікросателітні послідовності кролів характеризуються достатнім рівнем поліморфізму для проведення ідентифікації порід: рівень поліморфізму склав 11,7 % для кролів породи сріблястий, 20,1 % для каліфорнійської породи і 32,7 % для новозеландської білої.

Перспективи подальших досліджень. Провести пошук ефективних ПДРФ-маркерів кролів, тісно пов'язаних із продуктивністю (QTL).

E. A. Shevchenko, K. V. Kopylov

DETERMINATION OF DNA POLYMORPHISM IN RABBITS USING ISSR-MARKERS

S u m m a r y

Launched development of genetic certification breeds and internally breed structures of rabbits that requires further research in determining population-genetic characteristics of these animals. Determined the molecular genetic variability of domestic and foreign breeds of rabbits on the basis of ISSR-PCR analysis. Shown that the polymorphism level of genomic DNA of rabbits is not directional character and is small. The part of polymorphic loci in terms of species did not differ significantly in rabbits. The range of genetic distances varied within 0,229 – 0,416, degree of genetic diversity of $Nei(h)$ was 0.290, index of Shannon – 0,298 and effective number of alleles – 1,438. Expediency of using microsatellite loci $(AG)_6C$, $(GA)_6C$, $(ACC)_9G$ to dinucleotide and three nucleotide plots genomic DNA for genetic certification of New Zealand White, Silver and Californian rabbits.

Е. А. Шевченко, К. В. Копылов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК-ПОЛИМОРФИЗМА КРОЛИКОВ ПО ISSR-МАРКЕРАМ

А н н о т а ц и я

Начата разработка системы генетической паспортизации пород и внутрипородных структур кроликов, требует проведения дальнейших исследований в направлении определения популяционно-генетических особенностей. Определены оптимальные условия ДНК-типирования кроликов по ISSR-маркерам. Установлена молекулярно-генетическая вариабельность отечественных и зарубежных пород кроликов на основе ISSR-ПЦР анализа. Показано, что уровень полиморфизма геномной ДНК кроликов не носит направленного характера и является небольшим. Доля полиморфных локусов в разрезе пород кроликов существенно не отличалась. Диапазон генетических расстояний варьировал в пределах 0,229–

0,416, степень генетического разнообразия Nei (h) составила 0,290, индекс Шеннона — 0,298, а эффективное число аллелей — 1,438. Показана эффективность использования микросателлитных локусов (AG)₆C, (GA)₆C, (ACC)₉G к динуклеотидным и тринуклеотидным участкам геномной ДНК для проведения генетической паспортизации кроликов новозеландской белой, серебристой и калифорнийской пород.

1. *Бащенко М. І.* Кролівництво : монографія / М. І. Башенко, О. Ф. Гончар, Є. А. Шевченко // НААН України, Черкас. ін.-т агропром. вир-ва. — Черкаси : Черкаський ін.-т АПВ, 2010. — 304 с
2. *Khalil M. H.* Methods criteria, techniques, and genetic responsees for rabbit selection: review / M. H. Khalil, A. M. Ali-Saef // In Proc 9th World Rabbit Congress. — Italy, Verona, 2008 — P. 1–22.
3. *Hassan N. S.* New Zealand White rabbits BLUP values for post—weaning individual body weight under egyptian conditions / N. S. Hassan // In Proc 8th World Rabbit Congress. —Puebla, Mexico, 2004. — P. 69–75.
4. *Мельник Ю. Ф.* Інструкція з бонітування норок, лисиць, песців, тхорів, енотовидних собак, нутрій кліткового розведення; Інструкція з бонітування кролів; Інструкція з ведення племінного обліку в звірівництві та кролівництві. / Ю. Ф. Мельник, Д. М. Микитюк, А. М. Литовченко, та ін. — К. : ПП «Бланк-Сервіс», 2003. — 87 с.
5. *Khalil M. H.* RAPD markers linked to litter, lactation and growth traits in rabbits / M.H. Khalil, M.I. Motawei, A.M. Al-Saef, K.A. Al-Sobayil, M.F. El-Zarei // In Proc 9th World Rabbit Congress. — Italy, Verona, 2008. — P. 143–148.
6. *Mougel F.* Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* / F. Mougel, J. Mounolou, M. Monnerot // Animal Genetics. — 1997. — Vol. 28. — P. 58–59.
7. *Van Haeringen W.* Polymorphic microsatellite DNA markers in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) / W. Van Haeringen, M. Den Bieman, L. Van Zutphen, V. Van Lith // Journal of experimental animal science. — 1997. — Vol 38. — P. 49–57.
8. *Andersson A.* Applicability of rabbit microsatellite primers for studies of hybridisation between an introduced and a native hare species / A. Andersson, C. Thulin, H. Tegelstrom // Hereditas. — 1999. — Vol. 130. — P. 309–315.
9. *Zhu Y. F. Wang* Genetic variation within and among five rabbit populations using microsatellite markers / Zhu Y. F., J. B. Zhang, Ren W.Z., Y. Z. // In Proc 8th World Rabbit Congress. — Puebla, Mexico, 2004. — P. 181–185.
10. *Zhaobin F.* Studies on the genetic variability of five rabbit lines by microsatellite DNA / F. Zhaobin, J. Lili, Y. Fahe // Chinese Agricultural Science Bulletin. — 2011. — Vol. 27(7). — P. 326–330.
11. *Глазко В. І.* Геномное распределение ISSR-маркеров (AG)₉C и (GA)₉C у видов *bovinae* и *caprinae* / В. І. Глазко // Сельскохозяйственная биология. — 2009. — № 4. — С. 31–36
12. *Sambrook J.* Molecular Cloning / J. Sambrook., D. Russel. — N. Y. : Cold spring Harbor Lab. Press, 2001. — 2222 p.
13. <http://www.totallab.com>
14. <http://www.sequentix.de>
15. *Rogstad S.* GELSTATS: a computer program for population genetics analysis using VNTR multilocus probe data / S. Rogstad, S. Pelican // BioTechniques. — 1996. — V.21. — P. 1128–1131.
16. <http://evolution.gs.washington.edu/phyliip.html>
17. <http://www.ualberta.ca/~fyeh>
18. <http://www.statsoft.com>
19. *Askari1 N.* ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations / N. Askari1, M. Mohammadreza, A. Baghizadeh // Iranian journal of biotechnology. — 2011. — Vol. 9(3). — P. 222–229.

Рецензент: провідний науковий співробітник НВЦ з вивчення пріонних інфекцій, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Остапів Д. Д.