

## ВИЗНАЧЕННЯ ДНК-ПОЛІМОРФІЗМУ КРОЛІВ ЗА ISSR-МАРКЕРАМИ

Є. А. Шевченко<sup>1</sup>, К. В. Копилов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Черкаська дослідна станція біоресурсів Інституту розведення  
і генетики тварин НААН

<sup>2</sup>Інститут розведення і генетики тварин НААН

*Започаткована розробка 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-ПЛП 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  $Nei (h)$  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-плеємної роботи у сучасному кролівництві вимагає використання високоєфективних селекційно-генетичних методів, побудови оціночних та селекційних індексів, оцінку тварин за методом AM-BLUP та геномну селекцію [1–3].

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

Вивчення генетичного поліморфізму та пошук генетичних маркерів в кролівництві є однією з актуальних проблем генетики цих сільськогосподарських тварин. Поряд із морфологічною диференціацією, ДНК-генотипування (паспортизація) є досить точним і доречним методом достовірної 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 основному, в різних країнах Центральної та Західної Європи, а також Азії. Визначення породності цих тварин за ДНК-фінгерпринтом, який є додатковим елементом для ведення селекційно-плеємної роботи, на 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 розробки системи ДНК-паспортизації кролів вітчизняних та зарубіжних порід на основі використання мікросателітних локусів. У 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) (кролеферма 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 % розчину цитрату натрію. Геномну ДНК з крові виділяли згідно з стандартною методикою [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 інвертованих простих повторюваних послідовностей олігонуклеотидів або ди-, тринуклеотидних мотивів з якірними нуклеотидами на 3'-кінці (синтезовані Біо Тех Лаб, Україна) (табл. 1).

Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 2 мкл буфера 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 °С («гарячий старт»), 30 секунд денатурація при 94 °С, 30 секунд — відпал праймерів при 58 (60) °С, 2 хвилини — елонгація при 72 °С, 7 хвилин — досинтез при 72 °С; 32 цикли ампліфікації.

Таблиця 1

Характеристика використаних праймерів для ДНК-типування кролів

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

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 нами 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 присутність або, відповідно, відсутність фрагменту певної довжини. Рівень геномної варіабельності різних порід кролів оцінювався за значеннями генетичних відстаней (GD — Genetic Distances). Генетичні відстані обчислювали на основі отриманої матриці даних, використовуючи коефіцієнт розбіжності. Надалі проводився 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  $N_{ei}$ , індекса Шеннона). Статистичний аналіз проводився з використанням програмного пакету Statistica 6.0 [18] та Excel (Microsoft Office 2010).

### Результати й обговорення

Результат ДНК-фінгерпринти різних порід кролів становили собою спектри дискретних смуг з інтенсивною гібридизацією і характеризувався різним числом, розташуванням та інтенсивністю виявлених фрагментів (рис. 1).

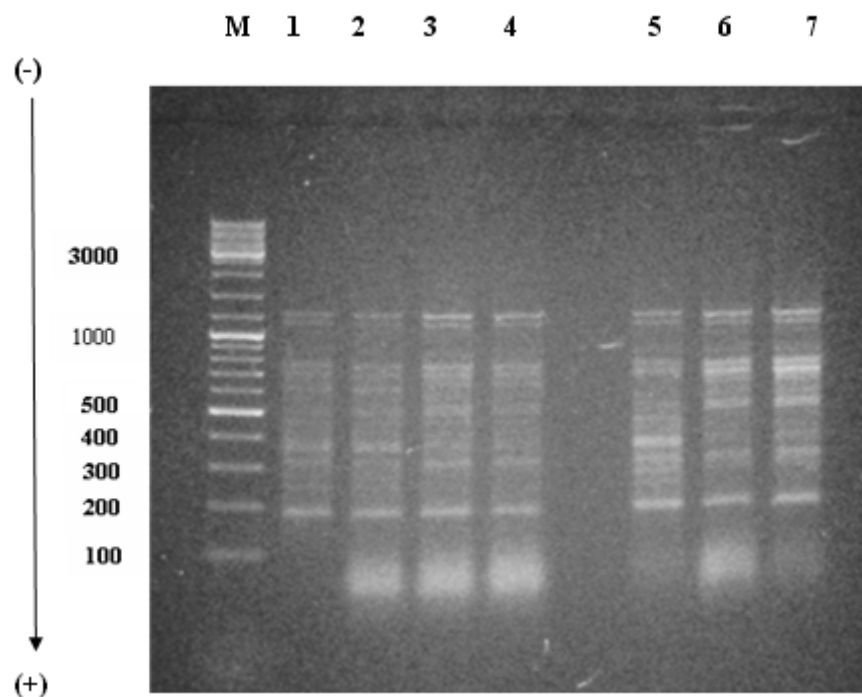


Рис. 1. Результати ПЛІР-аналізу зразків ДНК кролів із використанням  $S3-(ACC)_6G$  ISSR-маркера. Умовні позначення: М — молекулярний маркер O'geneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (Fermentas); 1–4, 6–7 — продукти ампліфікації ДНК кролів новозеландської білої породи; 5 — продукт ампліфікації ДНК міжпородних гібридів кролів

При використанні S1, S2, S3 праймерів в 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.

**Результати ПЛР-аналізу 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

При порівнянні праймерів S1, S2 та S3 за результатами їх використання у ISSR-ПЛР з метою маркірування генофонду порід кролів встановлено, що найбільш полілокусний спектр спостерігався при використанні праймеру S3 в ISSR-ПЛР аналізі породи новозеландська біла (23 поліморфні локуси). Відмічена деяка 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. 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, обумовлював 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).

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								
S3	0,312	0,714	0,292	0,727	0,275	0,714	0,311	0,714
	0,341	0,851	0,257	0,739	0,288	0,571	0,356	0,76

Створена матриця попарних генетичних відстаней та на основі індексів генетичної схожості по маркерам ISSR-ПЛР (праймер S3), зображена на рисунку 2, як дендрограма генетичних взаємовідносин між досліджуваними породами тварин.

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

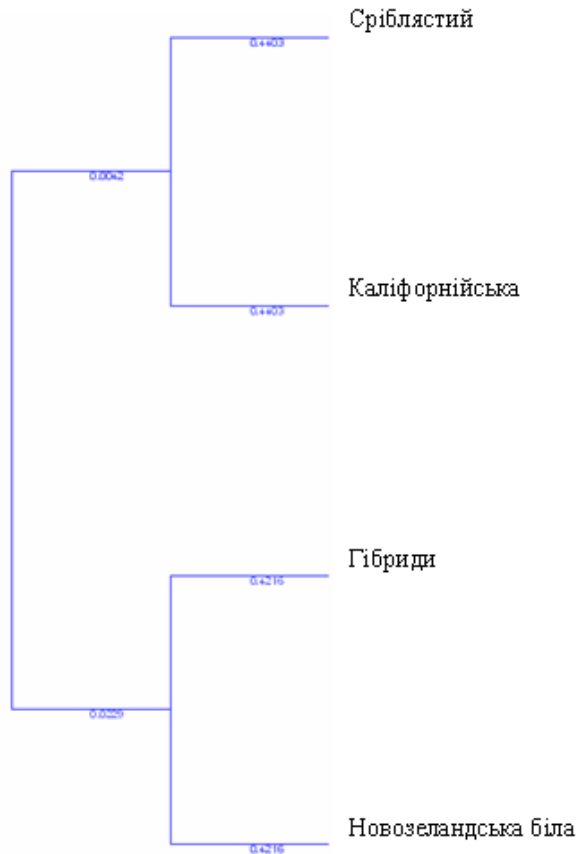


Рис. 2. Кластеризація (UPGMA) представників кролів 3 порід вітчизняної і зарубіжної селекції та їх міжпородних гібридів, з використанням ISSR-ПЛП аналізу (праймер S3) за матрицею подібності Жаккарда

Слід зазначити те, що кролі породи 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 чітку 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 те, що при приблизно схожих загальних діапазонах варіабельності ISSR-спектрів отриманих нами в ході проведення ПЛП 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 з природою й специфікою локалізації послідовностей, які маркуються за допомогою ISSR-методу.

## Висновки

Використання ISSR-маркерів становить неабиякий 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**

The development of genetic certification breeds and internally breed structures of rabbits that requires further research in determining population-genetic characteristics of these animals was launched. The molecular genetic variability of domestic and foreign breeds of rabbits on the basis of ISSR-PCR analysis was determined. It was shown that the polymorphism level of genomic DNA of rabbits is not directional character and is a small. The fate of polymorphic loci in terms of species did not differ significantly 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)<sub>6</sub>C, (GA)<sub>6</sub>C, (ACC)<sub>9</sub>G to dinucleotide and three nucleotide plots genomic DNA for genetic certification of New Zealand White, Silver and Californian rabbits.

*E.A. Шевченко, К.В. Копылов*

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК-ПОЛИМОРФИЗМА КРОЛИКОВ ПО ISSR-МАРКЕРАМ**

### **А н н о т а ц и я**

Начатая разработка системы генетической паспортизации пород и внутривидовых структур кроликов, которая 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) составил 0,290, индекс Шеннона — 0,298, а эффективное число аллелей — 1,438. Показана эффективность использования микросателлитных локусов (AG)<sub>6</sub>C, (GA)<sub>6</sub>C, (ACC)<sub>9</sub>G к динуклеотидным и тринуклеотидным участкам геномной ДНК для проведения генетической паспортизации кроликов новозеландской белой, серебристой и калифорнийской породы.

1. *Бащенко М. І.* Кролівництво : монографія / М. І. Башенко, О. Ф. Гончар, Є. А. Шевченко. — Черкаси : Черкаський ін-т АПВ, 2010. — 304 с.
2. *Khalil M. H.* Methods criteria, techniques, and genetic responses for rabbit selection : review : in Proc 9<sup>th</sup> World Rabbit Congress / M. H. Khalil, A. M. Ali-Saef. — 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 : in Proc 8<sup>th</sup> World Rabbit Congress / N. S. Hassan. — 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. : П. П. «Бланк-Сервіс», 2003. — 87 с.
5. *Khalil M. H.* RAPD markers linked to litter, lactation and growth traits in rabbits : in Proc 9<sup>th</sup> World Rabbit Congress / M. H. Khalil, M. I. Motawei, A. M. Al-Saef et al. — 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 : in Proc 8<sup>th</sup> World Rabbit Congress / Y. F. Zhu, J. B. Zhang, W. Z. Ren. — 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)<sub>9</sub>C и (GA)<sub>9</sub>C 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/phylip.html>
17. <http://www.ualberta.ca/~fyeh>
18. <http://www.statsoft.com>
19. *Askari N.* ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations / N. Askari, M. Mohamadreza, A. Baghizadeh // *Iranian journal of biotechnology*. — 2011. — Vol. 9 (3). — P. 222–229.

**Рецензент:** провідний науковий співробітник лабораторії репродуктивної біотехнології та розведення тварин, кандидат сільськогосподарських наук, с. н. с. Кузів М. І.