

ІНСТИТУТ АГРОЕКОЛОГІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЇ
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

Городна Олександра Володимирівна

УДК: 575.42 + 636.32

**“МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ В ЕКОЛОГО-ГЕНЕТИЧНОМУ МОНІТОРИНГУ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН”**

03.00.16 - екологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Дисертацією є рукопис
Роботу виконано в Інституті агроекології і біотехнології УААН, м.Київ

Науковий керівник: доктор сільськогосподарських наук, професор
Глазко Валерій Іванович, завідувач відділу
молекулярно-генетичних досліджень Інституту
агроекології і біотехнології УААН, м.Київ

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Іутинська Галина Олександрівна
завідувач відділу загальної ґрунтової мікробіології
Інституту мікробіології і вірусології
НАН України ім. Заболотного

доктор сільськогосподарських наук, професор, чл.-кор. УААН,
Славов Володимир Петрович
Державний інститут управління та економіки водних ресурсів,
завідувач кафедри екології та природокористування

Провідна установа: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Захист відбудеться “18” вересня 2003 р. о 10 годині
на засіданні Спеціалізованої Вченої Ради Д-26.371.01
Інституту агроекології і біотехнології УААН
за адресою: 03142, м.Київ, вул.Метрологічна, 12.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту
агроекології і біотехнології УААН

Автореферат розіслано “15” серпня 2003 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої Вченої Ради,
кандидат хімічних наук _____ /Г.В. Заякіна /

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Внутрішньовидовий еколого-генетичний моніторинг передбачає вивчення просторово-часової диференціації виду. Результати таких досліджень дозволяють оцінювати внесок зовнішніх умов у формування генетичних структур. Екологічна обумовленість популяційно-генетичних характеристик на даний час виявлена у великій кількості видів. Так, в дослідженнях Е. Нево на основі аналізу генетичної структури 1111 диких видів рослин і тварин за трьома групами факторів (21 параметр): екологічних, демографічних і таких що пов'язані з особливостями життєвого циклу, найбільшу кореляцію виявлено між генетичною мінливістю і екологічними параметрами (Nevo et al., 1984). Накопичуються дані з екологічної генетики людини (Рычков, Балановская, 1996). Добре відомі генетично обумовлені проблеми районування культурних рослин (Жученко, 2001). Зв'язок між еколого-географічними умовами відтворення свійських тварин і генетичною структурою порід було виявлено ще в класичних роботах Серебровського (Серебровский, 1923; 1928), Колесника (Колесник, 1949), Раушенбаха (Раушенбах, 1985). Окрім того, індустріалізація сільського господарства веде до змінення умов відтворення сільськогосподарських видів і супроводжується звуженням їхніх генофондів, вимагаючи поєднання високої продуктивності і сучасних промислових технологій. Більшість локальних порід, що витісняються у цьому процесі, і сортів рослин впродовж еволюції придбали унікальні комплекси генів, які пов'язані з адаптацією до еколого-географічних умов їхнього відтворення (Глазко и др., 1985; 1988; 1998; Столповский, 1992; Loftus, Schere, 1993), які можуть бути втрачені. Необхідність збереження біорізноманіття сільськогосподарських видів в даний час стає особливо очевидною у зв'язку з накопиченням даних про унікальність їхніх генофондів (Diamond, 2002). Так, найбільш вдалі сільськогосподарські види відносяться до космополітів, ареали основних з них практично співпадають з ареалом людини; внутрішньовидову фенотипову диференціацію (поділ на фенотипічно відокремлені породи і сорти культурних рослин) можна співставити і часто вона суттєво перебільшує фенотипові відмінності між близькоспорідними дикими видами. В той же час, на відміну від диких видів, фенотипова диференціація не супроводжується репродуктивною ізоляцією і генофонди основних сільськогосподарських видів зберігають генетичну єдність.

Питання екологічної генетики видів у зв'язку з глобальними змінами клімату, техногенним забрудненням, зменшенням біорізноманіття, набувають особливої актуальності (Глазко, 1998). Але і дотепер просторово-часова генетична диференціація самих вдалих сільськогосподарських видів (за кількістю порід і широтою ареалів), великої рогатої худоби і овець (Diamond, 2002), залишається недостатньо дослідженою. Вивчення генетичної структури порід і внутрішньопородних груп, що відтворюються в різних еколого-географічних регіонах, дозволяє виявляти особливості генетичного потоку від предкового генофонду до існуючої конкретної породи, вплив на нього екологічних умов її відтворення. Для найбільш об'єктивної оцінки таких процесів важливою умовою стає підбір молекулярно-генетичних маркерів, зміну розподілу алельних варіантів яких безпосередньо в них втягнуто. В зв'язку з цим у даній роботі проведено еколого-генетичний моніторинг генофондів двох видів на основі порівняння генетичних структур порід овець і великої рогатої худоби України і Росії з різною історією формування і різними

еколого-географічними умовами відтворення (історично давні і сучасні, рівнинні і гірські), шляхом аналізу поліморфізму за 30-ма локусами генетико-біохімічних систем і спектрами ампліфікації фрагментів ДНК, що фланковані мікросателітними повторами (ISSR-PCR).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано відповідно до тематичного плану наукових досліджень Інституту агроекології і біотехнології УААН “Вивчити генетичні наслідки екологічних стресів у різних видів тварин”, (№0196U012073); згідно з договорами між Інститутом агроекології і біотехнології УААН і Чорнобильським Науковим Центром Міжнародних Досліджень №143 “Генетичні наслідки екологічного стресу в зоні відчуження Чорнобильської АЕС”; а також у відповідності до проектів, що пройшли конкурс наукових досліджень Міністерства освіти і науки України: проект “Еколого-генетичні методи збільшення резистентності с/г видів до біотичних і абіотичних факторів екологічного стресу” (№2/1115-97) та проект “Дослідження генофондів рідкісних і зникаючих порід великої рогатої худоби, овець і коней України у різних еколого-географічних умовах розведення” (Ф4/312-97); проект Держкомітету науки і технологій України “Дослідження генетичних основ процесів доместикації” (№5/276-94).

Мета і завдання дослідження. Основною метою даної роботи був порівняльний аналіз просторово-часової генетичної диференціації двох сільськогосподарських видів тварин із найбільш широким ареалом (великої рогатої худоби і овець), а також порівняння ефективності використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів (структурні гени, анонімні фрагменти ДНК) для еколого-генетичного моніторингу тварин.

Виконувались такі завдання:

- * порівняння генетичної мінливості порід великої рогатої худоби і овець у зв'язку з історичними еколого-географічними особливостями їхнього формування;
- * пошук структурних генів, поліморфізм яких втягнуто у міжвидову і внутрішньовидову генетичну диференціацію у великої рогатої худоби і овець;
- * аналіз зв'язку між участю генетико-біохімічних систем у між- і внутрішньовидовій диференціації і їх належністю до транспортних білків, ферментів енергетичного метаболізму і метаболізму екзогенних субстратів;
- * оцінка інформативності ISSR-PCR маркерів при дослідженні міжвидової, внутрішньовидової і внутрішньопородної генетичної диференціації;
- * порівняльний аналіз використання двох типів молекулярно-генетичних маркерів для еколого-генетичного моніторингу генофондів тварин.

Об'єкт дослідження. Просторово-часова диференціація генофондів овець і великої рогатої худоби.

Предмет досліджень. Внутрішньо- і міжвидовий поліморфізм структурних генів та фрагментів ДНК, фланкованих мікросателітними повторами.

Методи досліджень. Електрофоретичний поділ білків з використанням крохмального і поліакріламідного гель-електрофорезу; розділення за допомогою електрофорезу в агарозному гелі продуктів ампліфікації фрагментів ДНК, фланкованих мікросателітними локусами (маркери ISSR-PCR); аналіз поліморфізму і успадкування маркерів ISSR-PCR; оцінка поліморфізму

структурних генів за використанням RFLP-PCR аналізу; методи статистичної обробки експериментальних даних.

Наукова новизна одержаних результатів. За використанням методів еколого-генетичного моніторингу – аналіз розповсюдження алельних варіантів у древніх і сучасних, рівнинних і гірських порід великої рогатої худоби і овець, вперше виявлені видо- і породоспецифічні особливості диференціації їхніх генофондів за різними типами молекулярно-генетичних маркерів. Вперше показано, що оцінки поліморфізму структурних генів, на відміну від сумарих спектрів ISSR-PCR, більшою мірою характеризуються видо- і породоспецифічністю і відбивають особливості просторово-часової диференціації порід, процеси популяційно-генетичної адаптації до еколого-географічних умов їхнього розведення. Виявлено, що у часову і еколого-генетичну диференціацію овець і великої рогатої худоби, в основному, втягнуто транспортні білки і ферменти метаболізму екзогенних субстратів. У той же час, спостерігаються виражені локус-специфічні відміни у поліморфізмі різних генетико-біохімічних систем у цих двох видів. Обґрунтовано використання при оцінці генетичної диференціації внутрішньопородних груп тварин аналізу поліморфізму анонімних послідовностей ДНК, оскільки розраховані за ними значення генетичних дистанцій (Nei, 1972) майже у 10 разів більші, аніж значення, що розраховані за оцінкою поліморфізму структурних генів у тих же тварин.

Теоретичне і практичне значення отриманих результатів. Обґрунтовано і рекомендовано використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів і конкретних структурних генів при еколого-генетичному моніторингу порід овець і великої рогаатої худоби на основі оцінок розподілення генотипів за низкою поліморфних генетико-біохімічних систем, а також продуктів ампліфікації анонімних фрагментів ДНК, що одержані за використанням в якості праймерів певних фрагментів мікросателітних локусів. Виявлені відмінності у значеннях оцінок міжпородної диференціації за поліморфізмом маркерів ISSR-PCR і структурних генів можуть бути використані безпосередньо при підборі молекулярно-генетичних маркерів для вирішення популяційно-генетичних завдань екологічного моніторингу і в селекційній роботі із дослідженими породами (виявлення породоспецифічних поєднань молекулярно-генетичних маркерів в якості додаткових породних характеристик; оцінки генеалогічних зв'язків між породами і внутрішньопородними групами; порівняльного аналізу генетичної консолідованості порід і внутрішньопородних груп).

Особистий внесок здобувача. Постановка завдань роботи, розробка послідовності виконання наукових досліджень, проведення експериментальної роботи відповідно розробленим методикам, одержання і аналіз первинних експериментальних даних, їхня статистична обробка, підготовка і написання наукових публікацій виконувались автором особисто або безпосередньо за його участю.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідались на: I-й і II-й конференціях “Молекулярно-генетичні маркери тварин” (Київ, 1994, 1996 pp); “Проблеми Агропромислового комплексу гірського регіону Карпат” (Бакта Н. Ворота, 1994); “Состояние териофауны в России и ближнем зарубежье” (Москва, 1995); “Теоретичні і практичні аспекти породотворювального процесу в молочному і м'ясному скотарстві” (Київ, 1995); “Актуальные

проблеми біології в животноводстві” (Росія, Боровск, 1995); Intern. Symp.: “Evolution of Mammalian electrophoretical characteristics Species” (London, 1995); Congress on Genes, Gene Families and Isozymes (Stockholm, Sweden, 2001); “Молекулярні механізми генетических процесів і біотехнологія” (Москва, 2001); “Перспективи розвитку скотіводства в третьем тисячелетті” (Сумы, 2001); “Генетика та селекція вищих організмів” (Полтава, 2001); на форумі генетиків і селекціонерів “Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть” (Ялта, 2002).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових робіт – 9 статей у фахових наукових журналах, збірниках праць, наукових вісниках, міжнародних бюлетнях і 9 повідомлень за матеріалами і тезами конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, розділів “Огляд літератури”, “Матеріали і методи”, 4-х розділів одержаних власних результатів досліджень та їх обговорення, розділів “Заключення”, “Висновки” і “Список наукових джерел літератури”. Текст дисертації проілюстровано 28-ма таблицями і 18-ма рисунками. Список використаних джерел містить 266 посилань з яких 197 іноземних авторів. Дисертаційну роботу викладено на 199-ти сторінках друкованого тексту.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Основні молекулярно-генетичні дослідження виконувались на зразках крові з архіву експериментального банку довгострокового зберігання Відділу молекулярно-генетичних досліджень Інституту агроєкології і біотехнології УААН. До аналізу було включено 12 порід (19 внутрішньопородних груп) великої рогатої худоби і 16 порід овець (табл.1). Одна з досліджуваних груп голштинської чорно-рябої худоби знаходилась у 30-ти км зоні аварії на ЧАЕС.

Таблиця 1

Досліджені породи великої рогатої худоби і овець

Регіон розведення породи	Досліджені породи великої рогатої худоби і овець (n – кількість тварин)
Україна:	
Південний регіон (Асканія-Нова, Херсонська обл. ¹ , Дніпропетровська обл. ² , Кіровоградська обл. ³)	Сіра українська ¹ (64), Чорно-ряба голштинська ^{1,2} (110), Червона степова ³ (30), Англєрська ¹ (46)
Зона аварії ЧАЕС (Новошепеличі ¹ , Куповате ²)	Чорно-ряба голштинська ¹ (40), Чорно-ряба голштинізована худоба ² (30)
Регіон Карпат (Хмельницька обл. ¹ , Закарпатська обл. ² , Ровенська обл. ³)	Білоголова українська ¹ (35), Бура карпатська ² (21), Чорно-ряба голштинізована худоба ³ (92)
Центральний регіон (ЦПО Переяслав-Хмельницький ¹ , племз-д Бровари ² , Львівська обл. ³ , Київська обл. ⁴ , Полтавська обл. ⁵ , Сумська обл. ⁶ , Чернігівська обл. ⁷ , Житомирська обл. ⁸)	Симентальська ^{1,4,6} (134), Чорно-ряба голштинська ^{1,2,3,4,5} (237), Червоно-ряба голштинська ¹ (37), Українська м'ясна ⁷ (133), Поліська м'ясна ⁸ (33), Українська молочна червоно-ряба ¹ (71), Лебединська ⁶ (30), Герефордська ¹ (15)
Росія:	
Московська обл. (експер.госп-во РСГА)	Чорно-ряба голштинська (36)
Алтайський край (зап-к Черга)	Сіра українська (32)

Разом голів великої рогатої худоби 1226	
Україна:	
Південний регіон (Асканія-Нова Херсонська обл.)	Асканійський меринос (30), Асканійський багатоплідний каракуль (30)
Регіон Карпат (Івано-Франківська обл.)	Цигайська (50), Українська карпатська (33)
Центральний регіон (Полтавська обл.)	Сокільська (36)
Молдова:	
Кишенівська обл.	Ост-фризська (84), Цигайська (50)
Росія:	
Ярославська обл.	Романівська (52)
Путоранський заповідник	Сніговий баран (5)
Експериментальне господарство Інституту цитології і генетики СВРАН	Алтайська (115), Лінкольн (56), Кулундинська (18), Ромні-марш (98), Клан-форест (45)
Об'єднане королівство, Англія:	
Експериментальне господарство Уельського університету, Бангор	Гірська уельська (50), Кембридж (106), Тексель (50)
Разом голів овець 858	

Рівні техногенного забруднення при порівнянні генофондів груп голштинської породи, що відтворюються в різних господарствах України, оцінювали на основі карт Барановського (2001). Для виявлення поліморфізму структурних генів та анонімних фрагментів ДНК проводили такі дослідження.

Поліморфізм структурних генів - транспортних білків і ферментів. Електрофоретичний поділ білків і ферментів проводили у крохмальному гелі з наступним гістохімічним забарвленням (Глазко, 1988), а також за використанням методу вертикального гель-електрофорезу в поліакріламідному гелі (Gahne, 1977) з власними модифікаціями. Аналізували поліморфізм структурних генів за їхніми продуктами (табл.2).

Таблиця 2

Досліджувані генетико-біохімічні системи (білки і ферменти)

№п/п	Назва генетико-біохімічної системи і фермента	Шифр фермента за біохімічним каталогом
Транспортні білки:		
1	Гемоглобін (НВ)	
2	Церулоплазмін (СР)	
3	Трансферин (ТФ)	
4	Посттрансферин-2 (РТФ-2)	
5	Рецептор до вітаміну D (GC)	
Ферменти внутрішньоклітинного енергетичного метаболізму:		
6	Лактатдегідрогеназа (LDH)	К.Ф.1.1.1.27
7	Фосфоглюкомутаза (PGM)	К.Ф.2.7.5.1
8	Глюкозофосфат ізомераза (GPI)	К.Ф.5.3.1.9
9	Аденілаткіназа (АК)	К.Ф.2.7.4.3
10	Гексокіназа (НК)	К.Ф.2.7.1.1
11	Малатдегідрогеназа (MDH)	К.Ф.1.1.1.37
12	Малик ензим (МЕ)	К.Ф.1.1.1.40
13	Ізоцитратдегідрогеназа (IDH)	К.Ф.1.1.1.42

14	6-фосфоглюконатдегідрогеназа (6-PGD)	К.Ф.1.1.1.43
15	Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (G-6-PD)	К.Ф.1.1.1.49
Ферменти метаболізму екзогенних субстратів		
16	Естераза плазми (EST)	К.Ф.3.1.1.1
17	Амілаза-1 (AM1)	К.Ф.3.2.1.1
18	Лужна фосфатаза (AP)	К.Ф.3.1.3.1
19	Супероксиддисмутаза (SOD)	К.Ф.1.15.1.1
20	Лейцинаріламінопептидаза (LAP)	К.Ф.3.4.1.1
21	Креатинкіназа (КК)	К.Ф.2.7.3.2
22	Діафораза (DP)	К.Ф.1.6.2.2
Фермент внутрішньоклітинного метаболізму пуринових основ		
23	Пуриннуклеозидфосфорилаза(NP)	К.Ф.2.4.2.1

Виділення ДНК. Геномну ДНК з лейкоцитів периферійної крові тварин виділяли за методикою (Соколов, Джмелинський, 1989; Глазко, 1997).

Полімеразна ланцюгова реакція (PCR). Використовували в якості базової стандартну методику PCR (Манианис и др., 1984) і ДНК полімерази (*Thermus aquaticus* - “Біон”, Москва). Ампліфікацію ДНК виконували в термоциклері фірми “Eppendorf”. Мікроелектрофорез проводили в агарозному гелі різної концентрації.

Поліморфізм фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами мікросателітних локусів (метод ISSR-PCR). Аналізували поліморфізм і успадкування алейних варіантів фрагментів ДНК, фланкованих мікросателітними повторами (Zietkiewicz E. et al., 1994) за використанням праймерів (AGC)₆C, (AGC)₆G, GT(CAC)₇, (CAC)₇T, (ACC)₆G, (GAG)₆C, (CTC)₆C, (GA)₉C, (AG)₉C, (AC)₉T, (TG)₉C, (TG)₉A, (CT)₉G, (CA)₁₀G. При аналізі враховували амплікони спектру, що були завжди присутні при проведенні 3-х повторних реакцій ампліфікування фрагментів ДНК. Кожний продукт ампліфікації розглядали як окремий локус.

Поліморфізм рестриктних фрагментів структурних генів (RFLP-PCR). Аналізували поліморфізм генів каппа-казеїну (CSN3), бета-лактоглобуліну (BLG) за використанням RFLP-PCR методу. Для ампліфікації фрагменту гену CSN3 використовували праймери: Vokas A 5'-GAAA-TCCCTACCATCAATACC-3' Vokas B 5'-CCATCTACGCTAGTTTAGATG-3'. Для виявлення алейних варіантів А і В гену CSN3 продукт ампліфікації обробляли рестриктазою *Hinf*I (Кириленко и др., 1995)

Для ампліфікації фрагменту гену BLG використовували наступні праймери: 5'-TGTGCTTTTTGGACACCGACTACA AAAA-3'; 5'-GCTCCCGGTATATGACCACCC-TCT-3'. Праймери було підібрано таким чином, щоб ампліфікований фрагмент містив у собі сайти розпізнавання рестриктазою *Hae*III (Medrano, Aquilar-Cordova, 1990). Продукти рестрикції розділяли за використанням методу електрофорезу у 1,5% агарозному гелі з додаванням бромистого етидію.

Візуалізацію фрагментів ДНК проводили при УФ світлі і фотографували на плівку (Мікрат-300). Розміри фрагментів ДНК визначали за допомогою маркера молекулярної ваги 0,1-kb DNA Ladder (Gibco BRL).

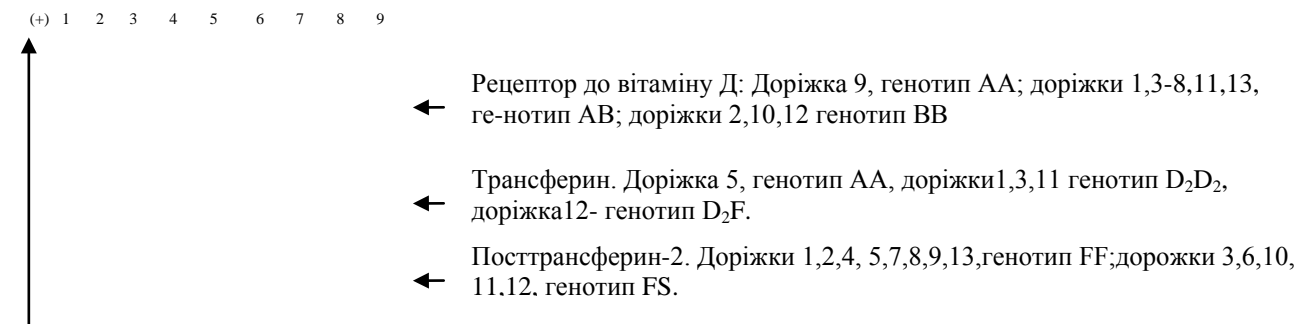
Статистична обробка експериментальних даних. Основні популяційно-генетичні параметри груп тварин та достовірність результатів (метод χ^2 , t_s - критерій Стьюдента)

розраховувались у відповідності до методик (Плохинский, 1969; Животовский, 1983), а також за допомогою стандартних комп'ютерних програм "BIOSYS-I", "Statistica".

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ПОРІД ОВЕЦЬ І ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ГЕНЕТИКО-БІОХІМІЧНИМИ СИСТЕМАМИ

Оцінка зв'язку між поліморфізмом генетико-біохімічних систем у овець і великої рогатої худоби та історією створення порід. Для того, щоб з'ясувати справедливість твердження про можливий зв'язок генетичної мінливості між тваринами однієї породи і їхньою належністю до автохтонних, синтетичних і комерційних порід ми досліджували рівень середньої очікуваної і спостерігаємої гетерозиготності за генетико-біохімічними маркерами у порід, що відтворюються в Україні, Росії та Англії.

Досліджували генетичні структури 11-ти порід великої рогатої худоби за 22-ма генетико-біохімічними системами. З цих систем у досліджених порід 12 виявились мономорфними (КК, АК, НК, G-6-PD, GPI, 6-PGD, MDH, SOD, EST, DP, LDH, PGM) і за 10-ма виявили поліморфізм (НВ, ТФ, СР, АМ1, GC, РТФ2, NP, AP, BLG, CSN3) (рис.1).



(-) **Рис. 1. Спектр білків плазми крові у великої рогатої худоби, порода сіра українська (GC, TF, PTF).**

Виконано також дослідження 14-ти порід овець за 23-ма генетико-біохімічними системами, з яких 13 виявились мономорфними (КК, АК, НК, G-6-PD, GPI, 6-PGD, MDH, SOD, СР, АМ1, PGM, IDH, AP), а за 10-ма системами поліморфними (НВ, ТФ, РТФ2, GC, EST, DP, LDH, NP, ME, LAP).

По породах овець і великої рогатої худоби розраховували алельні частоти і середню гетерозиготність на досліджений локус за виявленими поліморфними локусами.

Якщо узагальнити одержані дані щодо належності порід виду до синтетичних, аутохтонних і комерційних, то за рівнем середньої гетерозиготності виявляються певні міжвидові відмінності (табл.3). Так, синтетичні за походженням породи великої рогатої худоби характеризувались меншим рівнем середньої гетерозиготності, ніж більш давні за походженням автохтонні породи. У овець спостерігається високе значення рівня середньої гетерозиготності у комерційних порід і майже однакове у синтетичних і автохтонних порід. Вірогідність середніх значень гетерозиготності (t_s) між автохтонними і комерційними породами великої рогатої худоби склала $P < 0,001$, між синтетичними і автохтонними $P < 0,01$. У порід овець вірогідність різниці склала $P < 0,001$.

Середня гетерозиготність на локус у різних порід великої рогатої худоби (ВРХ) і овець

Комерційні породи ВРХ	\bar{H}_n / \bar{H}_o	Синтетичні породи ВРХ	\bar{H}_n / \bar{H}_o	Автохтонні породи ВРХ	\bar{H}_n / \bar{H}_o
Чор.-р.голшт-ка	0,124/0,111	Українська м'ясна	0,127/0,104	Сіра українська	0,123/0,127
Симентальська	0,100/0,073	Поліська м'ясна	0,136/0,098	Білоголова укр.	0,162/0,139
Англєрська	0,115/0,103	Червона степова	0,154/0,133	Лебединська	0,161/0,127
Черв.-р.голшт-ка	0,113/0,081	Україн. молочна	0,121/0,094		
$M_n \pm m$ $M_o \pm m$	0,113 \pm 0,003 0,092 \pm 0,009	$M_n \pm m$ $M_o \pm m$	0,134 \pm 0,005 0,107 \pm 0,009	$M_n \pm m$ $M_o \pm m$	0,149 \pm 0,013 0,130 \pm 0,004
Комерційні породи овець		Синтетичні породи овець		Автохтонні породи овець	
Цигайська	0,163/0,153	Алтайська	0,129/0,092	Сокільська	0,115/0,062
Ост-фризська	0,122/0,125	Кембридж	0,123/0,095	Кулундинська	0,114/0,074
Романівська	0,128/0,140	Аскан. меринос	0,115/0,089	Гірська уельськ.	0,119/0,101
Клан-форест	0,120/0,127	Аск.бгпл. каракуль	0,133/0,076		
		Тексель	0,092/0,080		
$M_n \pm m$ $M_o \pm m$	0,133 \pm 0,010 0,136 \pm 0,006	$M_n \pm m$ $M_o \pm m$	0,118 \pm 0,007 0,086 \pm 0,003	$M_n \pm m$ $M_o \pm m$	0,116 \pm 0,002 0,079 \pm 0,012

M - середнє арифметичне за породами; m - похибка середнього арифметичного;

\bar{H}_n - середня гетерозиготність, що спостерігалась; \bar{H}_o - середня очікувана гетерозиготність

Важливо підкреслити, що наведені закономірності спостерігаються при сумарному аналізі поліморфізму різних локусів. У той же час, за результатами нашого дослідження показано, що мінливість за окремими локусами може мати свої локус-специфічні риси, які не співпадають з загальними тенденціями. Так, наприклад, рівень гетерозиготності за локусом гемоглобіну у овець вищий, аніж у великої рогатої худоби, де у більшості порід він мономорфний, а за локусом трансферину – нижчий.

Оскільки в результаті наших досліджень були виявлені суттєві локус-специфічні особливості поліморфізму генетико-біохімічних маркерів між породами виду як великої рогатої худоби так і овець, то в наступних розділах зроблено аналіз внеску у внутрішньопородний генетично детермінований поліморфізм локусів, що кодують білки з різними біохімічними функціями, а також для збільшення об'єктивності аналізу генетичної структури порід використовували метод виявлення поліморфізму фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими ділянками мікросателітних локусів (ISSR-PCR).

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ ПОРІД ОВЕЦЬ ЗА ВИКОРИСТАННЯМ ДВОХ ТИПІВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ

Поліморфізм генетико-біохімічних маркерів. При дослідженні середньої гетерозиготності у різних порід овець порівнювали дані за продуктами 23-х локусів. Для зручності аналізу поліморфізму структурних генів, що беруть участь в контролі конкретних біохімічних реакцій, маркери розділили за їхньою біохімічною функцією на три основні групи: транспортні білки, ферменти внутрішньоклітинного енергетичного метаболізму і ферменти метаболізму екзогенних субстратів. По чотирьом породам овець (асканійський меринос, асканійський багатоплідний каракуль, сокільська, передкарпатський тип української карпатської напівгрубововнової породи) аналізували розподіл частот алельних варіантів за виявленими

поліморфними локусами з врахуванням належності їх продуктів до певної групи, відповідно біохімічної функції.

Кожна порода характеризувалась породоспецифічним співвідношенням генотипів за генетико-біохімічними системами, що належать, в основному, до транспортних білків.

За значеннями генетичних дистанцій досліджували генетичні взаємовідносини між породами (рис.2). У міжпородну диференціацію овець найбільший внесок вкладали такі системи, як посттрансферин ($D_N=0,177$), естераза ($D_N=0,138$), трансферин ($D_N=0,126$) і пуриннуклеозидфосфорилаза ($D_N=0,120$), що дозволяє припускати можливе використання поєднання цих маркерів в якості додаткових породних характеристик.



Рис. 2. Дендрограма генетичних взаємин, розрахована за поліморфними генетико-біохімічними маркерами у чотирьох порід овець.

Досліджували структуру генофонду вищевказаних порід овець і ост-фризської за використанням ISSR-PCR маркерів, де в якості праймерів використовували дві тринуклеотидні послідовності: 5'-(AGC)₆G-3', 5'-(AGC)₆C-3'. При використанні праймера (AGC)₆C в сумарному спектрі продуктів ампліфікації виявлено 24 амплікони (мажорні і мінорні) (рис.3).

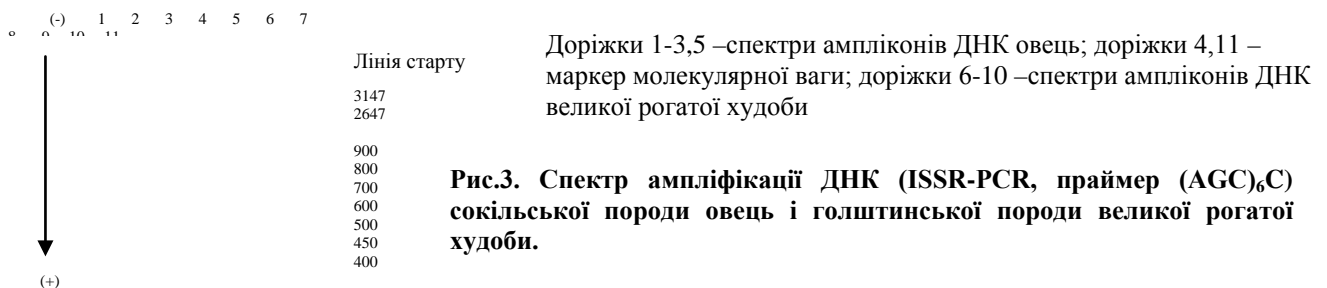


Рис.3. Спектр ампліфікації ДНК (ISSR-PCR, праймер (AGC)₆C) сокільської породи овець і голштинської породи великої рогатої худоби.

Внутрішньопородний поліморфізм за наявністю/відсутністю ампліконів спектру виявлено за 53-ма % локусів, від загальної кількості виявлених. Поліморфні локуси у різних порід овець (праймер (AGC)₆G) склали 44% загального спектру. Міжвидовий поліморфізм виявлено у 46% ампліконів.

Розраховували значення генетичних дистанцій за спектрами ампліконів ISSR-PCR для оцінки генетичних взаємин між породами. Найменшу відстань було виявлено між породами ост-фризської і української карпатської ($D_N=0,320$). Безпосередньо до цього кластера приєднуються вівці породи асканійський меринос ($D_N=0,370$), а найбільш віддалена порода асканійського багатоплідного каракуля ($D_N=0,840$). Середніми виявились значення генетичних відстаней між сокільською, асканійським багатоплідним каракулем і українською карпатською (яка отримана від зхрещування напівтонкововнових овець і місцевих гірських грубововнових овець) ($D_N=0,409$, 0,550).

Порівняння інформативності ді- та тринуклеотидних праймерів при аналізі генофонду порід овець. У роботі використовували праймери до мікросателітних локусів як з тринуклеотидними так і з дінуклеотидними повторами (рис.4).

а)

б)

Рис.4. Спектри ампліконів ISSR-PCR, що одержані на ДНК овець АБК (1-7) і СО(9-14)
а) позитив; б) негатив: доріжка 8, маркер молекулярної ваги; доріжки 1,2,13,14, праймер (ACC)₆G; доріжки 3,4,5,11,12, праймер (GAG)₆C; доріжки 6,7,9,10, праймер (AGC)₆G.

Щоб визначити, які з них найбільш інформативні, проведено порівняння генофондів представників двох видів роду *Ovis* – свійської вівці (асканійський багатоплідний каракуль, сокільська порода, кулундинська порода овець) і дикого виду (сніговий баран). Використовували 5 динуклеотидних і 2 тринуклеотидних праймери з послідовностями (GA)₉C, (AG)₉C, (AC)₉T, (TG)₉G, (TG)₉A, (AGC)₆C, (AGC)₆G.

Спектри ампліфікації ДНК мали 6-20 ампліконів, в залежності від використаного праймеру. Розмір продуктів ампліфікації варіював у межах 2,5-0,5 т.п.н. (тисяч пар нуклеотидів, kb). Виявлено, що не всі динуклеотидні праймери дозволяють отримувати продукти ампліфікації, наприклад, праймери (AC)₉T і (TG)₉A. При використанні інших дінуклеотидних праймерів отримували до 10-ти ампліконів, а тринуклеотидних – до 20-ти. Поліморфізм по наявності/відсутності ампліконів в спектрах, які були одержані за дінуклеотидними праймерами, виявили тільки при порівнянні різних видів роду *Ovis*, тоді як при використанні тринуклеотидних праймерів виявлено поліморфізм ампліконів спектру і у тварин між різними породами виду.

Отже, ISSR-PCR, в якості методу маркування генофонду порід овець, надає можливість одержання багатолокусних поліморфних спектрів придатних до оцінення генетичної диференціації тварин різних пород одного виду, так і між видами. Але, специфіка характеристики генетичної диференціації залежить і від мотиву “корової” частини праймера, і від “якірної” ділянки. Використання дінуклеотидних праймерів дозволяє диференціювати тварин різних видів, а тринуклеотидних праймерів – виявляти внутрішньовидові, міжпородні відмінності.

Порівняльна оцінка двох типів маркерів при описі генофонду порід овець. При порівнянні генетичних взаємовідносин між породами спостерігали залежність оцінки від використаних для опису генофондів генетичних маркерів: найбільші відстані одержані за ISSR-PCR маркерами ($D_N=0,839$), за транспортними білками ($D_N=0,141$), і найменші значення генетичних відстаней виявлено за ферментами внутрішньоклітинного енергетичного метаболізму ($D_N=0,002$). При цьому, за деякими генетико-біохімічними системами виявляються відмінності, що пов'язані з породоспецифічними характеристиками. Так, наприклад, допущення високої частоти HbA у гірських і багатоплідних порід, висловлене раніше (Раушенбах, 1985), отримало підтвердження на породах, що нами досліджені, вперше. Таким чином, одержані результати свідчать про те, що різні типи молекулярно-генетичних маркерів доповнюють один одного: генетико-біохімічні маркери виявились більш інформативними при оцінюванні породної своєрідності генетичних структур, а ISSR-PCR маркери – при порівнянні значень генетичних відстаней між породами.

МОНІТОРИНГ СПЕЦИФІКИ ГЕНОФОНДУ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ВИКОРИСТАННЯМ ДВОХ ТИПІВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ

Поліморфізм генетико-біохімічних маркерів. За допомогою тих самих маркерів, що використовували на породах овець, ми досліджували структуру генофонду порід і внутрішньопородних груп великої рогатої худоби.

Проаналізовано за 22-ма генетико-біохімічними маркерами генетичні структури шести груп великої рогатої худоби, що належать до типових для території України порід: сіра українська (СУ), білоголова українська (БУ), лебединська (Л), червона степова (ЧС) та 10 груп інтродукованої комерційної породи голштинської худоби, які розводяться в різних господарствах України (Херсонська, Дніпропетровська, Ровенська, Київська, Полтавська області, експериментальне господарство зони відчуження Чорнобильської АЕС “Куповате” і “Новошепеличі”), а також одна група із експериментального господарства Московської сільськогосподарської академії ім. К.А.Тимирязєва.

Генетико-біохімічні системи також розподіляли на групи у зв'язку з їхньою біохімічною функцією. Окрім того, у великої рогатої худоби проведено аналіз 2-ох структурних генів, які пов'язані з характеристикою молочної продуктивності (CSN3 і BLG).

За результатами дослідження 5-ти порід великої рогатої худоби виявили породні і внутрішньопородні особливості розподілу алельних і генотипових частот. Аналіз генетичної структури 12-ти груп голштинської худоби дозволив нам сформулювати уявлення про молекулярно-генетичний “еталон” цієї породи, якому відповідають групи худоби які відтворюються у Херсонській, Дніпропетровській і Московській областях і для яких типова відсутність поліморфізму за локусом NB, низькі частоти NpH, Csn3B, Am1B і відносно підвищені частоти алелів TfA, Tfd1 і BlgA, GcB. Збіг цих досліджень з літературними даними про типову генетичну структуру голштинської худоби за деякими з цих локусів, свідчить на користь такого припущення, а також про те, що відхилення від такого “еталону”, що виявили у решті 9-ти досліджених груп голштинів, можуть бути обумовлені підвищеним рівнем техногенного забруднення територій, на яких вони відтворюються.

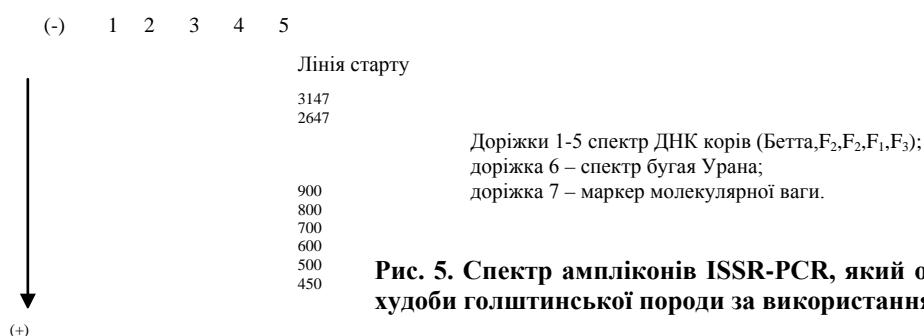
Основний внесок у міжпородну диференціацію у великої рогатої худоби вносять транспортні білки, але суттєвий внесок у міжпородні відмінності вносить і поліморфізм за локусом метаболізму екзогенних субстратів – амілаза-1. Найбільш залученими у міжпородну диференціацію виявились локуси GC, AM1, TF.

Таким чином, за використанням частот алельних варіантів і генотипів можна охарактеризувати специфіку генетичної структури кожної породи, оцінити генетичні взаємини і залучення окремих локусів у міжпородну диференціацію.

Використання ISSR-PCR методу при сімейному аналізі генофонду великої рогатої худоби. Проаналізувавши дані, що були одержані при дослідженні порід овець за анонімними послідовностями ДНК (метод ISSR-PCR), ми більш докладно дослідили цей тип молекулярно-генетичних маркерів на породах великої рогатої худоби.

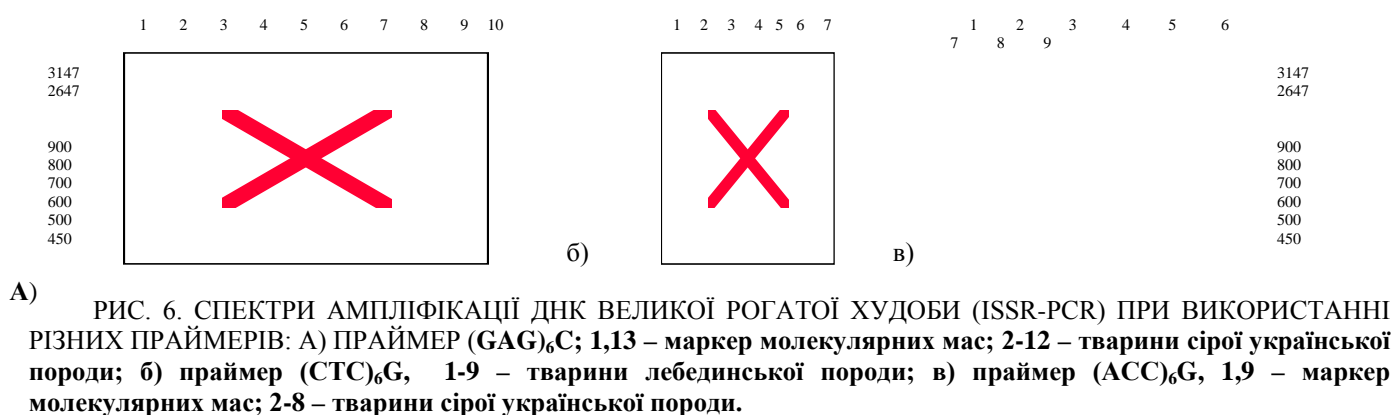
Проведено аналіз впродовж трьох поколінь тварин з метою встановлення відтворювання одержуваного спектру і успадкування ампліконів різної довжини. Наприклад, проаналізовано

спектри ампліконів (мажорні і мінорні) сімейства, що народжене у дослідному господарстві “Новошепеличі” від корови Бетта і бугая Урана: F₁ (1 гол.) і потомків F₂ (2 гол.), F₃ (1 гол.) від зворотних зрещувань.



При використанні праймерів (ACC)₆G, (GAG)₆C, (CTC)₆C одержували як мажорні (чіткі), так і мінорні амплікони. Сумарно у бугая Урана було одержано до 13-ти ампліконів, у корови Бетта – до 12-ти ампліконів, у F₁ - 7-14 ампліконів, у F₂ -12-15, у F₃ - 5-12 ампліконів спектру (рис.5). Виявлено, що вони відтворюються при повторному експерименті і успадковуються у поколіннях тварин за доміантним типом успадкування за наявності амплікона. Таким чином, ISSR-PCR метод дозволяє одержувати багатолокусні, високополіморфні спектри, придатні для використання при популяційно-генетичних порівняннях.

ISSR-PCR метод аналізу структури генофонду порід великої рогатої худоби. Досліджували генетичну структуру 6-ти груп різних порід великої рогатої худоби за допомогою методу ISSR-PCR при використанні тринуклеотидних праймерів (AGC)₆G, (AGC)₆C, (CTC)₆C. Кожний праймер мав свою специфіку спектру ампліконів (рис.6), в зв'язку з цим відрізнялися і значення одержуваних генетичних відстаней.



Для виявлення генетичних взаємин між породами застосовували кластерний аналіз. Кожний праймер, який використовували (ISSR-PCR), по-різному характеризував породи тварин, у чому проявляється генотипова специфіка породи, характеристика розподілу ділянок гомології до нього у досліджуваних геномах.

Порівняння даних результатів аналізу генофонду за двома типами маркерів у порід великої рогатої худоби. Генетичні відстані між породами великої рогатої худоби (Nei, 1972), що розраховували на основі індексу ідентичності за двома тринуклеотидним праймерам склали D_N=0,296, а генетичні відстані, що розраховані сумарно за поліморфними генетико-біохімічними системами склали D_N=0,089.

Розподіл порід по кластерам дендрограми при дослідженні генетико-біохімічних маркерів порід і внутрішньопородних груп, зокрема, сірої української, що відтворюється в Сибіру і в Херсонській області України, голштинської худоби, яка розводиться в умовах, що відрізняються рівнем техногенного забруднення (Барановський, 2001), більше відображає специфіку відтворення тварин в різних еколого-географічних умовах, аніж ISSR-PCR маркери, одержані за використання окремих праймерів. За дослідженням спектрів продуктів ампліфікації деяких послідовностей ДНК кластеризація порід, скоріше за все, пов'язана з історичними процесами їхнього формування. Тобто, це дозволяє припускати використання поліморфізму структурних генів для виявлення відмінностей між породами виду, що ймовірно, може висвітлювати процеси адаптації генофондів тварин до різних еколого-географічних умов відтворення, а метод ISSR-PCR – для маркерування поліморфізму ДНК відносно більш нейтрального по відношенню до факторів навколишнього середовища.

ПОРІВНЯННЯ ІНФОРМАТИВНОСТІ ГЕНЕТИКО-БІОХІМІЧНИХ СИСТЕМ ТА ISSR-PCR МАРКЕРІВ В ЕКОЛОГО-ГЕНЕТИЧНОМУ МОНІТОРИНГУ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ І ОВЕЦЬ

За результатами проведених досліджень виявлено, що у міжвидову диференціацію між великою рогатою худобою і вівцями залучені ферменти внутрішньоклітинного енергетичного метаболізму. У внутрішньовидову, міжпородну диференціацію втягнуто, в основному, по обох видах, транспортні білки і ферменти метаболізму екзогенних субстратів (табл.4).

Таблиця 4

Значення генетичних дистанцій (Nei, 1972) за генетико-біохімічними маркерами між породами великої рогатої худоби і овець

Досліджувані види тварин	Середнє значення генетичних дистанцій за групами генетико-біохімічних систем		
	Транспортних білків	Ферментів енергетичного метаболізму	Ферментів метаболізму екзогенних субстратів
ВРХ	0,059	0,000	0,031
Вівці	0,059	0,009	0,023
ВРХ – Вівці	0,644	0,853	0,770

Аналіз генетичних внутрішньовидових взаємин між породами овець і великої рогатої худоби за структурними генами, розбитими по групах за біохімічними функціями, виявив, що значення генетичних відстаней на порядок більші за транспортними білками, ферментами метаболізму екзогенних субстратів, ніж за ферментами внутрішньоклітинного енергетичного метаболізму (табл.4). Крім того, в межах останньої групи маркерів ця величина різко підвищується при міжвидових порівняннях (табл.4).

Також виявлено, що при використанні результатів ISSR-PCR аналізу, як у порід овець, так і у великої рогатої худоби значення міжпородних генетичних дистанцій виявились на порядок вищими розрахованих за генетико-біохімічними маркерами (табл.5). Очевидно, така різниця обумовлена різною швидкістю еволюції генетико-біохімічних систем і фрагментів ДНК, фланкованих мікросателітними локусами.

Значення генетичних дистанцій за двома типами маркерів у порід великої рогатої худоби і овець

Види тварин (кількість порід)	Значення генетичних дистанцій	
	Маркери ISSR-PCR, (AGC) ₆ G	Генетико-біохімічні маркери
Вівці(5 порід)	0,836 ± 0.063*	0,092 ± 0.002***
ВРХ (4 породи)	0,531 ± 0.091*	0,052 ± 0.005***

*-P<0,05; ***-P<0,001

Таким чином, використання генетико-біохімічних маркерів виявляється більш ефективним при дослідженнях просторово-часової внутрішньовидової генетичної диференціації, а деякі з ISSR-PCR маркерів, очевидно, більш придатні в оцінках генетичної диференціації між близькоспорідними групами тварин.

Середні міжпородні генетичні відстані у овець виявились статистично достовірно більшими і за ISSR-PCR маркерами (за використанням праймеру (AGC)₆G, P<0,05, табл.5), і за генетико-біохімічними маркерами (P<0,001, табл.5). Зрозуміло, що оцінки міжпородної диференціації за значенням генетичної дистанції найбільш наочні при використанні ISSR-PCR маркерів, у той же час як можлива функціональна значимість різниці генетичних структур більш очевидна при використанні маркерів з відомою біохімічною функцією як для порід овець, так і великої рогатої худоби. Необхідно підкреслити, що значення генетичних відстаней при використанні ISSR-PCR маркерів суттєво залежали від обраного праймера (табл.6).

Таблиця 6

Середнє значення міжпородних генетичних дистанцій у великої рогатої худоби при використанні трьох праймерів за ISSR-PCR маркерами

Праймер	Велика рогата худоба		
	(AGC) ₆ G	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C
Кількість порід	4	6	6
M ± m	0,531 ± 0,091	0,161 ± 0,012	0,430 ± 0,076

M - середнє значення генетичних дистанцій

m - похибка середнього значення

Тобто, оцінка генетичних взаємин між породами і видами за ISSR-PCR маркерами залежить від нуклеотидної послідовності праймера. Це свідчить про їхню індивідуальну специфіку і необхідність попереднього підбору праймерів для популяційно-генетичних досліджень.

Таким чином, аналіз розподілу алельних варіантів за генетико-біохімічними системами показав, що автохтонні породи великої рогатої худоби мають більший збіг одна з одною і предковою породою сірої української худоби, ніж з комерційними породами, наприклад, голштинською. Аналіз генетичної структури 12-ти груп голштинської худоби, які відтворюються в різних еколого-географічних умовах, дозволив виявити низку характеристик за молекулярно-генетичними маркерами, що, мабуть, є найбільш типовими для цієї породи і змінюються впродовж поколінь в залежності від умов відтворення. У низки порід овець, що відтворюються в гірських умовах або для яких характерна багатоплідність, виявлено перевагу за швидко мігруючими в електрофоретичних гелях алельних варіантів А за локусами HB і GC. Виявляються міжвидові відмінності за міжпородною генетичною диференціацією: досліджені

породи овець характеризувались набагато більшою різницею одна від одної за обома типами молекулярно-генетичних маркерів, ніж породи великої рогатої худоби за значеннями генетичних відстаней. Результати порівняльного аналізу різних типів молекулярно-генетичних маркерів свідчать про те, що для еколого-генетичного моніторингу ефективним є використання аналізу розподілення алельних варіантів за окремими генетико-біохімічними системами, комплексну оцінку поліморфізму яких проведено вперше. Результати аналізу внутрішньовидової диференціації з використанням ISSR-PCR маркерів суттєво залежали від нуклеотидної послідовності використаного праймера, і, очевидно, можуть бути ефективно використані тільки як додатковий метод при виявленні різниці між генетичними структурами близькоспоріднених груп тварин.

ВИСНОВКИ.

1. За використанням двох типів молекулярно-генетичних маркерів (структурні гени; фрагменти ДНК, фланковані мікросателітними локусами – ISSR-PCR) виявлено суттєву різницю внутрішньовидової генетичної диференціації: середні значення генетичних відстаней між прадавніми і сучасними, гірськими і рівнинними породами великої рогатої худоби виявились меншими, ніж між породами овець (генетичні відстані за генетико-біохімічними системами у великої рогатої худоби $D_N=0,052$, у овець – $D_N=0,092$; за ISSR-PCR маркерами, відповідно $D_N=0,531$ і $D_N=0,836$).

2. Виявлено видові особливості різниці за значеннями середньої гетерозиготності у груп комерційних і автохтонних порід: у овець найменші значення спостерігали у автохтонних порід ($\bar{H}=0,114-0,119$), у великої рогатої худоби – у комерційних ($\bar{H}=0,100-0,113$).

3. Виявлено видо- і локуспецифічні особливості міжпородної генетичної диференціації. Так, у овець найбільші значення міжпородних генетичних відстаней спостерігали за посттрансфером ($D_N=0,177$), естеразою плазми крові ($D_N=0,138$), трансферином ($D_N=0,126$) і пуриннуклеозидфосфорилазою ($D_N=0,120$), а у великої рогатої худоби – амілазою-1 ($D_N=0,341$), посттрансферином ($D_N=0,093$), трансферином ($D_N=0,082$), рецептором до вітаміну Д ($D_N=0,071$).

4. Виявлені три, з 12-ти груп голштинської худоби, що відрізняються від інших за поліморфізмом по локусах NB, NP, AM1, TF, CSN3, BLG, GC, що дозволяє припускати поєднання розподілу алелей за цими локусами як частину молекулярно-генетичного “еталону” цієї породи, а відхилення від нього у інших досліджених групах, як результат впливу на генетичну структуру еколого-географічних умов відтворення тварин.

5. У міжвидову і внутрішньовидову міжпородну генетичну диференціацію генетико-біохімічні системи втягуються в залежності від їх біохімічної функції. У внутрішньовидову, міжпородну диференціацію основний внесок вкладають транспортні білки і ферменти метаболізму екзогенних субстратів, а у міжвидову – суттєво більший внесок ферментів внутрішньоклітинного енергетичного метаболізму.

6. Продукти ампліфікації фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими мікросателітними локусами, успадковуються в сім'ях великої рогатої худоби як домінуючі алелі. Кожний праймер (фрагмент окремого ді- або тринуклеотидного мікросателітного локусу) має свою специфіку спектра продуктів ампліфікації.

7. Для контролю еколого-генетичних перетворень генофондів і потоку генів, як у порід овець, так і у великої рогатої худоби, більш інформативне дослідження поліморфізму структурних генів з відомою біохімічною функцією. Фрагменти ДНК, фланковані мікросателітними локусами (ISSR-PCR), незважаючи на високий рівень поліморфізму, менш зручні для вирішення задач еколого-генетичного моніторингу.

8. Виявлена різниця у значеннях генетичних дистанцій при використанні поліморфізму структурних генів і ISSR-PCR маркерів свідчить про різну швидкість їх еволюції і дозволяє застосовувати останні як ефективний додатковий метод при оцінках генетичної диференціації близькоспоріднених груп тварин.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. А.В.Городная, С.И. Тарасюк, В.В. Ошовский, В.М. Туринский, В.И. Глазко Информативность различных типов маркеров (белки, ДНК-маркеры) при сравнении генофондов на примере двух пород овец// Доп. Нац. АН України.-Київ.-2001.-№4.-С.171-178.

2. С.І. Тарасюк, О.В. Городна, В.І. Глазко Вплив різних факторів відбору на генетичну структуру у різних порід овець// Зб. наук. праць Агроєкологія і біотехнологія.-Київ.-1999.-№3.-С.138-142.

3.Городная А.В. Глазко В.И. Метод ISSR-PCR в оценке генофондов пород крупного рогатого скота// Цитология и генетика.-Киев.-2003.-№1.-С.61-67.

4.Т.Н. Дымань, А.В. Городная, С.И. Тарасюк, Т.П. Сипко, А.В. Кушнир В.И. Глазко Участие маркеров структурных генов и анонимных последовательностей ДНК в генетической дифференциации у видов *Ovis aries* L. и *Ovis nivicola borealis*// Цитология и генетика.-Киев.-2000.-Т.34,№6.-С.49-58.

5.С.І. Тарасюк, О.В. Городна, В.А. Малієнко, В.І. Глазко Унікальні гени аборигенних порід великої рогатої худоби України// Вісник аграрної науки.-Київ.-2001.-№4.-С.48.

6.С.І. Тарасюк, В.І. Глазко, І.А.Макар, О.В.Городна Гл. 2.14. Використання генетико-біохімічних маркерів в породотворчому процесі// В зб. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.–Київ.-2001.-Т.1.–С.428-432.

7.Глазко В.И., Дымань Т.Н., Кутузов Д.А., Городна А.В. Участие маркеров ISSR-PCR в межвидовой дифференциации некоторых представителей видов *Ungulata*// Докл. РАН.-2002.-№5.-С.36-40.

8.Glazko V.I., Gorodna A.V., Sipko T.P. Evolution of electrophoretical characteristics of proteins in some mammalian species// Isozym Bul.-1995.-V.28.-P.36.

9.С.И. Тарасюк, А.В. Городная, В.И. Глазко Генетический мониторинг некоторых пород КРС содержащихся в различных эколого-географических зонах Украины// В зб. Перспективи розвитку скотарства у третьому тисячолітті. -Суми.-2001.-С.162-163.

10.Gorodna A.V., Glazko V.I. The comparative analysis of ISSR-PCR polymorphism at grey Ukrainian and Holstein-Friesian breeds of cattle// Isozym Bul.-2001.-P.75-76.

11.Городна О.В., Глазко В.І. Поліморфізм генетико-біохімічних систем у різних видів с/тварин//В зб. Проблеми Агропромислового комплексу гірського регіону Карпат: - Н.Ворота, Бакта.–1994.-С.73-74.

- 12.Городная А.В., Глазко В.И. Полиморфизм генетико-биохимических систем у разных видов с/х животных// В сб. Молекулярно-генетические маркеры животных.-Киев.-1994.-С.13-15.
- 13.Glazko V.I., Gorodna A.V., Tarasjuk S.I., Sipko T.P. The rates of evolution of electrophoretical characteristics some mammalian species// Evolution of Mammalian electrophoretical characteristics Species: Intern. Symp.-London.-1995.-P.156.
- 14.Глазко В.И., Городная А.В., Сипко Т.П. Электрофоретические характеристики генетико-биохимических систем у разных видов животных// В сб. Состояние териофауны в России и ближнем зарубежье.-Москва (Россия).-1995-С.48.
15. Глазко В.І., Городна О.В., Сіпко Т.П. Підбір зручних генетичних систем для маркування генофондів порід різних видів с/г тварин// В зб. Теоретичні і практичні аспекти породотворювального процесу в молочному і м'ясному скотарстві.-Київ.-1995.-С.243-244.
- 16.С.И. Тарасюк, А.В. Городная, В.А. Малиенко, В.И. Глазко Генетическая структура серой украинской породы по структурным генам и анонимным последовательностям ДНК// В сб. Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология.-Москва.-2001.-С.165-167.
- 17.A.V.Gorodna, S.I.Tarasjuk, A.P.Kruglenko, V.I.Glazko Genetic structure of Grey Ukrainian, White-Head Ukrainian and Holstein cattle breeds// 11th International Congress on Genes. Gene Families and Isozymes.-Stockholm (Sweden)-2001.-June30-July4.-P.205.
- 18.Городная А.В., Чумель Р.И., Глазко В.И. Сравнительная оценка генетической структуры групп черно-пестрого и бурого скота северо-восточного типа по полиморфным генетико-биохимическим системам.//В сб. Генетика та селекція вищих організмів.-Полтава.-2001.-С.22-25.

АНОТАЦІЇ

Городная А.В. **Молекулярные маркеры в эколого-генетическом мониторинге сельскохозяйственных животных.** - Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.16. - экология. - Институт агроэкологии и биотехнологии УААН, Киев, 2003.

Исследование пространственно-временной дифференциации видов, их геногеографии, изучение механизмов популяционно-генетической адаптации к меняющимся условиям окружающей среды, оценка биоразнообразия невозможна без разработки методов анализа их генетических структур, выделения эталона, необходимого при проведении экологического мониторинга, выявления воздействия на структуру биоты, на генетическое разнообразие популяций.

В соответствии с задачами экологической генетики в работе впервые выполнено сопоставление эффективности использования двух типов молекулярно-генетических маркеров для эколого-генетического мониторинга внутривидового биоразнообразия (породного, внутривидового) генофондов двух сельскохозяйственных видов животных (овцы, крупный рогатый скот). Они интересны своей спецификой как виды-космополиты, воспроизводство которых связано с разными природными зонами, равнинными или горными районами. Сохраняя свое генетическое единство, как вид, они проявляют широкую фенотипическую внутривидовую дифференциацию. Показаны пороодо- и локус-специфические особенности распределения

аллельных частот ряда структурных генов. Впервые обнаружены видовые различия в механизмах популяционно-генетической адаптации (у аутохтонных пород крупного рогатого скота – путем общего увеличения средней гетерозиготности; у овец – специализацией генофондов аутохтонных пород, что проявляется в относительно повышенных значениях генетических расстояний между ними). Выявлен ряд структурных генов, полиморфизм которых вносит основной вклад в межпородную дифференциацию у обоих видов. Рассмотрен вклад в породную и межвидовую дифференциацию овец и крупного рогатого скота структурных генов в соответствии с биохимическими функциями их белковых продуктов. Так, транспортные белки и ферменты внутриклеточного метаболизма экзогенных субстратов вовлечены в породную дифференциацию у обоих видов, а ферменты внутриклеточного энергетического метаболизма – в межвидовую дифференциацию.

Аутохтонные породы крупного рогатого скота по частотам встречаемости редких вариантов по локусу TF оказались больше похожи друг на друга и предковый генофонд серой украинской породы, чем на генофонды коммерческих пород, вне зависимости от условий разведения (горные, равнинные). У равнинных пород овец обнаруживается существенно меньшая частота встречаемости HbA по сравнению с горными, вне зависимости от их принадлежности к коммерческим и аутохтонным породам. Среди 12-ти групп голштинского скота выявлены три, отличающиеся от других сходным полиморфизмом по локусам HB, NP, AM1, TF, CSN3, BLG, GC, что позволяет предполагать сочетание распределения аллелей по этим локусам частью молекулярно-генетического “эталона” этой породы и отклонения от него в других исследованных группах голштинов как результат влияния на генетическую структуру эколого-географических условий воспроизводства животных.

Использование высокополиморфных полилокусных спектров продуктов амплификации фрагментов ДНК, фланкированных микросателитными повторами (ISSR-PCR метод), позволило получить на порядок большие значения генетических расстояний между породами у обоих видов. Впервые показано, что специфика характеристики генофондов пород и межпородных генетических взаимоотношений существенно зависела от нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК, взятого в качестве праймера, что, очевидно, усложняет интерпретацию полученных данных.

Полученные данные свидетельствуют о том, что оценки полиморфизма структурных генов могут быть удобны для выявления отличий между давно разошедшимися группами животных (разные виды, древние и новые породы), а полилокусных спектров ISSR-PCR маркеров – при анализе относительно недавних событий внутривидовой популяционно-генетической адаптации к разным эколого-географическим условиям воспроизводства животных. Кроме того, анализ полиморфизма структурных генов с известной биохимической функцией их продуктов позволяет оценивать возможные генетико-биохимические основы такой адаптации.

Ключевые слова: геногеография, экологическая генетика, популяционно-генетическая адаптация, структурные гены, ISSR-PCR маркеры, генетические расстояния.

Городна О.В. **Молекулярні маркери в еколого-генетичному моніторингу сільськогосподарських тварин.** - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.16. - екологія. - Інститут агроекології і біотехнології УААН, Київ, 2003.

Дослідження геногеографії видів, вивчення механізмів популяційно-генетичної адаптації до змін умов навколишнього середовища, оцінка біорізноманітності, неможливе без розробки методів аналізу їх генетичних структур, що відповідають завданням екологічної генетики.

У роботі вперше зроблено порівняння ефективності використання двох типів молекулярно-генетичних маркерів для оцінок внутрішньовидового різноманіття (породного, внутрішньопородного) генофондів двох сільськогосподарських видів тварин (вівці, велика рогата худоба). Показані породо і локус-специфічні особливості розподілу алельних частот за низкою структурних генів, вперше розкрито видові розбіжності у механізмах популяційно-генетичної адаптації в залежності від історичних умов створення порід. Виявлено низку структурних генів, поліморфізм яких робить основний внесок у міжпородну диференціацію у обох видів.

Отримані дані свідчать про те, що оцінки поліморфізму структурних генів можуть бути зручними для виявлення відмінностей між групами тварин, що еволюційно давно розійшлися (різні види, прадавні і нові породи), а полілокусних спектрів ISSR-PCR маркерів – при аналізі відносно нещодавніх випадків внутрішньовидової популяційно-генетичної адаптації до різних еколого-географічних умов відтворення тварин. Крім того, аналіз поліморфізму структурних генів з відомою біохімічною функцією їх продуктів дозволяє оцінювати можливі генетико-біохімічні основи такої адаптації.

Ключові слова: геногеографія, екологічна генетика, популяційно-генетична адаптація, структурні гени, ISSR-PCR маркери, генетичні відстані.

Gorodna A.V. **Molecular markers in the ecological-genetic monitoring of agricultural animals.** - Manuscript.

Thesis on competition of a scientific degree of the candidate of biological sciences on a speciality 03.00.16.-ecology. - Institute agroecology and biotechnology UAAS, Kyiv, 2003.

Investigations of genogeography of species, study of mechanisms of population-genetic adaptation to varying conditions of environment, the evaluation of biodiversity were impossible without development of methods for the analysis of species genetic structures, which were appropriate to resolving of an ecological genetics problems.

The comparison of efficiency use of two types of molecular-genetic markers for assessments of intraspecific diversity (between breeds, interbreed groups), differences between genetic structures of two species (sheep, cattle) for the first time were presented. It was shown the breed- and locus-specific peculiarities of allele distribution in a number of structural genes, species-specific distinctions in mechanism of population-genetic adaptation were revealed. Structural genes, polymorphism of which brought in interbreed genetic differentiation the main contribution were identified.

The obtained data testified that the evaluations of polymorphism structural genes could be convenient for detection of differences between animal groups, diverged for a long time ago (different breeds, ancient and new breeds), and polymorphism of multilocus spectra of ISSR-PCR markers - for the analysis of rather recent events of intraspecific population-genetic adaptation to different ecology-geographical conditions of animals reproduction. Besides the analysis of polymorphism of structural genes with a known biochemical function of their product allows to evaluate possible genetic-biochemical base of such adaptation.

Key words: gene geography, ecological genetics, population-genetic adaptation, structural genes, ISSR-PCR markers, genetic distances.