

УДК636.2.082.2

ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТАМ ДНК

Н.А. Глинская, Т.И. Епишко, О.А. Епишко, Л.А. Танана

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 12.06.2012 г.)

Аннотация. На базе УО «Полесский государственный университет» в научно-исследовательской лаборатории промышленной биотехнологии проведен генетико-популяционный анализ крупного рогатого скота по 11 микросателлитным локусам нуклеотидных последовательностей ДНК: BM1824, BM 2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53, рассчитана величина информативной ценности использованных маркеров (PIC).

Summary. On the basis of Polesky state university in research laboratory biotechnologies has been carried out the comparative analysis 11 microsatellite markers of DNA: BM1824, BM 2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53, an estimation of level homozygote. Plural homozygote, frequencies of occurrence alleles variants sequences DNA among animals black-motley cattle.

Введение. Повышение эффективности контроля происхождения крупного рогатого скота – одна из важнейших задач животноводства. На сегодняшний день единственным наиболее точным способом контроля достоверности происхождения и идентификации племенного

поголовья является генетическое тестирование по микросателлитным локусам с последующим определением полиморфизма исследуемых популяций [5].

Проведение мероприятий по генетической экспертизе племенной продукции необходимо также для выявления животных с наличием генетических аномалий и в целях сохранения ценных пород сельскохозяйственных животных [3].

Полиморфизм микросателлитных локусов используется в программах картирования генома, при изучении генетической структуры породы, в анализе генетических расстояний между линиями, породами и популяциями, при оценке генетической variability и внутривидового родства, а также для прогноза возможного гетерозиготного эффекта при скрещивании [1].

На современном уровне развития науки важен вопрос сохранения генетической изменчивости сельскохозяйственных животных, которая имеет тенденцию к снижению в результате интенсивного и одностороннего скрещивания. В связи с чем целью наших исследований служило проведение генетико-популяционного анализа черно-пестрого скота по 11 микросателлитным локусам для изучения генетического разнообразия популяций.

Материал и методика исследований. На базе УО "Полесский государственный университет" в научно-исследовательской лаборатории промышленной биотехнологии проведено генетическое тестирование по 11 микросателлитным локусам нуклеотидных последовательностей ДНК: BM1824, BM 2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53 (таблица 1).

Таблица 1 - Характеристика микросателлитных локусов, рекомендованных ISAG для проведения достоверности происхождения крупного рогатого скота

Локус	Длины фрагментов, (bp)	Метка праймера, Dус	Цвет
TGLA227	64-115	FAM	Синий
BM2113	116-146	FAM	Синий
TGLA53	147-197	FAM	Синий
ETH10	198-234	FAM	Синий
SPS115	235-265	FAM	Синий
TGLA126	104-131	JOE	Зеленый
TGLA122	134-193	JOE	Зеленый
INRA23	193-235	JOE	Зеленый
ETH3	90-135	NED	Желтый
ETH225	136-165	NED	Желтый
BM1824	170-218	NED	Желтый

В качестве объекта исследований использовали крупный рогатый скот черно-пестрой породы, разводимый в хозяйствах: КСУП "Пле-

менной завод "Красная звезда", СПК "Агрокомбинат Снов", СПК "Першай-2003", ОАО "1-я Минская птицефабрика".

Геномную ДНК выделяли из ткани животных перхлоратным методом, концентрацию которой измеряли на спектрофотометре "Nano-Drop 1000".

Реакционная смесь для проведения мультиплексной реакции готовилась в объеме 15 мкл и включала следующие компоненты:

1. ПЦР буфер – 1,5 мкл
2. $MgCl_2$ (25 mM) – 1,8 мкл
3. dNTP mix (10-12 mM) – 1,5 мкл
4. Праймеры (mix) – 3 мкл
5. Taq-полимераза – 1 ед
6. Вода (дистиллированная) – до 15 мкл
7. ДНК 1 мкл (конц. 100 – 200 нг/мкл)

Для проведения амплификации использовались меченые праймеры. В качестве меток использовались FAM, JOE и NED метки, флюорисцирующие синим, зеленым и желтым цветами соответственно.

Полимеразная цепная реакция была проведена на амплификаторе *TProfessional basic*. Режим амплификации состоял из следующих шагов: "горячий старт" – 3 мин при $95^{\circ}C$; $97^{\circ}C$ – 20 сек; 32 цикла: денатурация – 30 сек при $95^{\circ}C$, отжиг – $65^{\circ}C$ – 1 сек и $59^{\circ}C$ – 1 мин 15 сек; синтез 30 сек при $68^{\circ}C$; достройка 30 сек – $70^{\circ}C$ и охлаждение $4^{\circ}C$.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали в 1,5% агарозном геле (при напряжении 130 В в течение 20 минут).

Визуализацию и анализ результатов осуществляли на трансиллюминаторе Quantum.

Перед постановкой в секвенатор, образцы помещали в амплификатор на денатурацию в смеси объемом 15 мкл, включающую: 1,2 мкл амплификата, 0,5 мкл LIZ-500 size standart и 13,3 мкл формамида.

Денатурацию проводили в течении 5 мин при $95^{\circ}C$ с последующим охлаждением при $4^{\circ}C$. Затем производили непосредственную загрузку образцов в секвенатор "ABI Prism 3130", руководствуясь протоколом.

Определение длин выявленных генотипов ДНК в исследуемых локусах проводили при помощи программы GenieMapper Software Version 4.0.

Популяционно-генетические характеристики были рассчитаны по следующим формулам:

$$h_k = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2, \quad (1)$$

где: h_k – ожидаемая гетерозиготность по одному локусу,

p_i – частота i -го аллеля [4].

$$H_{obs} = \frac{h_i}{n}, \quad (2)$$

где: H_{obs} – наблюдаемая гетерозиготность по одному локусу,
 h_j – количество гетерозиготных генотипов в локусе,
 n – общее количество генотипов в локусе [4].

$$PIC = 1 - \sum p^2 - \sum \sum p^2 p^2, \quad (3)$$

где: PIC – полиморфное информационное содержание локуса,
 p – частота аллеля [2].

Результаты исследований и их обсуждение. Важным параметром динамики генетической изменчивости состава популяций является гетерозиготность. Гетерозиготность, присущее всякому гибридному организму состояние, при котором его гомологичные хромосомы несут разные формы (аллели) того или иного гена или различаются по взаиморасположению генов. Она служит мерой генетической изменчивости популяции и определяется как средняя частота гетерозиготных особей относительно численности популяций по определенным локусам. Это мера изменчивости, которая служит оценкой вероятности того, что два аллеля данного локуса, взятые наугад из генофонда популяции, окажутся различными. Высокая гетерозиготность обеспечивает большое количество информативных мейозов (случаев рекомбинации), что повышает эффективность тестов сцепления.

На гетерозиготность популяций влияют: мутационный процесс, различные типы отбора, дрейф генов, неслучайное скрещивание и другие факторы. Поэтому ее оценка в настоящее время необходима практически во всех популяционно-генетических исследованиях.

Увеличение гомозиготности сопровождается снижением генетического и фенотипического разнообразия и приводит к повышению однородности популяций.

В результате генотипирования популяций животных СПК “Першан-2003”, ОАО “1-я Минская птицефабрика”, КСУП “Племенной завод “Красная звезда” и СПК “Агрокомбинат Снов” по изучаемым локусам был проведен популяционно-генетический анализ исследуемых популяций крупного рогатого скота (таблицы 2, 3). В частности, определено количество аллелей на локус (N), ожидаемая гетерозиготность по каждому локусу (формула 1), средняя ожидаемая гетерозиготность на локус (h_e ср), наблюдаемая гетерозиготность (формула 2), средняя наблюдаемая гетерозиготность (H_{obs} ср).

В ходе анализа данных таблицы 2 по исследуемым популяциям животных, разводимых в СПК “Першан-2003” и ОАО “1-я Минская птицефабрика” установлено, что наибольшее количество аллелей наблюдалось в локусах TGLA122 и ETH10 – 16 и 12, соответственно. Остальные аллели характеризовались достаточно равномерным распределением в специфических локусах (от 7 до 15), кроме локуса

TGLA126 у животных предприятия ОАО "1-я Минская птицефабрика", по которому было идентифицировано только пять аллелей.

Таблица 2 – Популяционно-генетические характеристики черно-пестрого крупного рогатого скота по 11 микросателлитным локусам СПК "Першая-2003" и ОАО "1-я Минская птицефабрика"

Локус	СПК "Першая-2003" (n=54)				ОАО "1-я Минская птицефабрика" (n=27)					
	N	h_k , %	h_k ср, %	H_{obs} %	N	h_k , %	h_k ср, %	H_{obs} %	H_{obs} ср, %	
BM1824	12	78	62	93	82	7	80	69	82	91
BM 2113	8	25		78		12	82		96	
ETH10	10	46		72		12	84		100	
ETH 225	9	76		32		7	72		89	
ETH 3	8	70		94		7	66		88	
INRA023	9	64		100		8	66		89	
SPS115	8	40		82		8	28		89	
TGLA122	16	76		93		11	78		100	
TGLA 126	8	37		67		5	36		70	
TGLA227	13	85		100		9	77		100	
TGLA 53	15	86		94		10	87		100	

Результаты исследований свидетельствуют о том, что в обеих популяциях крупного рогатого скота микросателлитные локусы характеризуются высокой степенью полиморфизма. Так, показатель степени средней наблюдаемой гетерозиготности для каждого маркера превысил среднюю ожидаемую гетерозиготность в обоих случаях.

Установлено, что популяция животных ОАО "1-я Минская птицефабрика" отличалась более высокой гетерозиготностью (91%) в сравнении с популяцией СПК "Першая-2003" (82%). Это может быть, прежде всего, причиной дрейфа генов извне в результате искусственного осеменения животных, целенаправленного отбора.

Нами также был проведен анализ генетического разнообразия популяций черно-пестрого крупного рогатого скота, разводимого в КСУП "Племенной завод "Красная звезда" и СПК "Агрокомбинат Снов" (таблица 3).

В группе исследованных животных КСУП "Племенной завод "Красная звезда" наибольшее количество аллелей наблюдается в локусах TGLA122 и TGLA227 – 34 и 33 соответственно; наибольшим уровнем наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности характеризовался локус TGLA227 (98% и 94% соответственно), а наименьшим значением наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности – локусы TGLA126 (89%) и BM1824 (81%) соответственно.

Таблица 3 – Популяционно-генетические характеристики черно-пестрого крупного рогатого скота по 11 микросателлитным локусам КСУП "ПЗ "Красная звезда" и СПК "Агрокомбинат Снов"

Локус	КСУП "ПЗ "Красная звезда" (n=216)					СПК "Агрокомбинат Снов" (n=109)				
	N	h_k , %	h_k ср. %	H_{obs} %	H_{obs} ср. %	N	h_k , %	h_k ср. %	H_{obs} %	H_{obs} ср. %
BM1824	31	81	81	93	93	12	85	78	85	87
BM2113	23	92		93		15	85		83	
ETH10	22	88		92		16	80		83	
ETH225	25	90		94		14	77		90	
ETH3	18	89		95		11	63		79	
INRA023	28	89		96		16	83		92	
SPS115	22	86		92		14	57		81	
TGLA122	34	86		97		20	85		92	
TGLA126	21	87		89		11	59		82	
TGLA227	33	94		98		15	87		100	
TGLA53	31	94		90		15	98		98	

В популяции животных СПК "Агрокомбинат Снов" наибольшее количество аллелей наблюдалось в локусах TGLA122, ETH10 и INRA023 – 20, 16 и 16 соответственно; наибольшей наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью отличались локусы TGLA227 (100%) и TGLA53 (98%) соответственно, в то время как наименьшей наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью характеризовались локусы ETH3 (79%) и SPS115 (57%) соответственно.

В общем уровень гетерозиготности в четырех выборках по одиннадцати исследованным микросателлитным локусам превысил 50%, что свидетельствует о высоком полиморфизме изучаемых микросателлитных маркеров и целесообразности их использования для оценки генетического разнообразия популяции и достоверности происхождения животных с высокой степенью точности.

Кроме того, нами была рассчитана величина информативной ценности использованных маркеров (PIC). Чем больше величина PIC для данного локуса, тем информативнее оказывается он в качестве маркера. Принято следующее разделение величин PIC: при $PIC > 0,5$ локус очень информативен, при $0,5 > PIC > 0,25$ достаточно информативен и при $PIC < 0,25$ слегка информативен (формула 3).

В проведенных нами исследованиях было установлено, что все изученные микросателлитные последовательности имели $PIC > 0,5$ (таблица 4). Следовательно, совокупность полученных данных указывает на целесообразность использования этих маркеров в дальнейшем поиске с локусами хозяйственно-полезных признаков.

Таблица 4 – Информативная ценность микросателлитных локусов в качестве маркеров в исследуемых популяциях черно-пестрого крупного рогатого скота

Локус	Величина информативной ценности использованных маркеров (PIC)			
	КСУП "ПЗ "Красная звезда"	СПК "Агро- комбинат Снов"	СПК "Пер- шаи-2003"	ОАО "1-я Минская пти- цефабрика"
BM1824	0,90	0,84	0,93	0,82
BM2113	0,93	0,85	0,78	0,96
ETH10	0,91	0,83	0,73	0,98
ETH 225	0,95	0,90	0,51	0,89
ETH 3	0,95	0,79	0,94	0,88
INRA023	0,92	0,96	0,98	0,89
SPS115	0,96	0,79	0,82	0,89
TGLA122	0,97	0,92	0,93	0,88
TGLA 126	0,89	0,82	0,67	0,70
TGLA227	0,98	0,94	0,90	0,91
TGLA 53	0,90	0,98	0,94	0,97

Заключение. Исследованные популяции характеризуются высоким генетическим разнообразием по микросателлитным локусам, что свидетельствует о возможности их использования для паспортизации, идентификации, подтверждения происхождения отдельных индивидов и изучения генетического разнообразия пород и популяций черно-пестрого крупного рогатого скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вейр, Б. Анализ генетических данных / Б. Вейр. – М.: Мир, 1995. – 399 с.
2. Животовский, Л. А. Популяционная биометрия / Л. А. Животовский. – М.: Наука, 1991. – 271 с.
3. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci / D. B. Goldstein [et al.] // *Genetics*. – 1995a. – Vol. 139. – P. 463–471.
4. Guo, S. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles / S. Guo, E. Thomson // *Biometrics*. – 1992. – Vol. 48 – P. 361–372.
5. Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating / S. Wright // *Evolution*. – 1965. – Vol. 19. – P. 355–420.