

ОСОБЕННОСТИ SSR-ПОЛИМОРФИЗМА ЛОШАДЕЙ

**Н.А. ГЛИНСКАЯ¹, Е.И. ПРИЛОВСКАЯ¹, Д.А. КАСПИРОВИЧ¹,
О.А. ЕПИШКО², Е.С. ЧЕБУРАНОВА²**

¹Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь, nil_pb@mail.ru

²Гродненский государственный аграрный университет,
г. Гродно, Республика Беларусь, dnateh@mail.ru

Введение. Успешность решения задач общей и частной популяционной генетики многих видов, в том числе и сельскохозяйственных, зависит от изученности полиморфизма различных элементов геномов. Микросателлитные последовательности ДНК (SSR-локусы) широко используются для генотипирования особей, исследования генофондов растений и животных, описания их изменений под влиянием факторов естественного и искусственного отборов, установления происхождения, поисков связей с фенотипическими признаками, картирования главных генов количественных признаков [1].

В отечественном коневодстве остро стоит проблема оценки и сохранения генетических ресурсов. Благодаря высокой информативности ДНК-маркеров появилась возможность с большей точностью дифференцировать породы и изучать процессы пороодообразования, а также возможность поддержания высокого уровня генетического разнообразия для сохранения пород во избежание неблагоприятных последствий инбридинга. В связи с чем, нами проведен анализ и изучен полиморфизм 17 SSR-локусов лошадей [2].

Методика и объекты исследования. Исследования были проведены в научно-исследовательской лаборатории «Прикладной и фундаментальной биотехнологии» на базе УО «Полесский государственный университет», а также в научно-исследовательской лаборатории ДНК-технологий на базе УО «Гродненский государственный аграрный университет».

Объектом исследования являлась популяция лошадей, разводимых в СПК «Прогресс-Вертилишки» Гродненской области (n=50). Материалом для исследования послужили пробы буккального эпителия лошадей заводских пород: ахалтекинской (n=17), чистокровной верховой (n=17), тракененской (n=16).

Таблица 1 – Характеристика STR-локусов, отобранных для проведения установления происхождения лошадей

Локус	Длина фрагментов, п.н.	Метка праймера, Dye	Цвет
VHL20	83-102	6-FAM TM	синий
HTG4	116-137	6-FAM TM	синий
АНТ4	140-166	6-FAM TM	синий
HMS7	167-187	6-FAM TM	синий
HTG6	74-103	VIC	зеленый
АНТ5	126-147	VIC	зеленый
HMS6	154-170	VIC	зеленый
ASB23	176-212	VIC	зеленый
ASB2	237-268	VIC	зеленый
HTG10	83-110	NED	желтый
HTG7	114-128	NED	желтый
HMS3	146-170	NED	желтый
HMS2	215-236	NED	желтый
ASB17	104-116	PET	красный
LEX3	137-160	PET	красный
HMS1	166-178	PET	красный
CA425	224-247	PET	красный

Генотипирование лошадей проводили по 17 микросателлитным локусам, рекомендованным Международным обществом по генетике животных (ISAG) с использованием набора для генотипирования лошадей «StockMarks for Horses». Характеристика последовательностей микросателлитных локусов ДНК, используемых для проведения оценки достоверности происхождения лошадей, представлена в таблице 1.

ДНК экстрагировали перхлоратным методом с двойной очисткой (по методу Зиновьевой). Концентрацию ДНК оценивали спектроскопическим методом на спектрофотометре Implen P360. Оптимальная концентрация геномной ДНК, необходимой для проведения мультиплексной реакции, составляла 1-10 нг/мкл.

Нативность ДНК определяли проведением электрофореза в 1% агарозном геле при напряжении 100V 20–30 мин по отсутствию «шлейфа» фрагментов ДНК и интенсивности свечения бромистого этидия в УФ-свете. Амплификацию проводили с использованием реакционной смеси объемом 15 мкл, включающей следующие компоненты: буфер – 2,5 мкл; дНТП – 4,0 мкл, Taq-полимераза – 0,5 мкл, деионизированная вода – 3 мкл, смесь праймеров – 4,0 мкл, геномная ДНК – 1-10 нг/мкл.

Для проведения реакции использовали ПЦР программу: денатурация – 10 минут при температуре 95°C; 30 циклов: плавление – 30 секунд при температуре 95°C, отжиг праймеров – 30 секунд при температуре 60°C, элонгация – 1 минута при температуре 72°C; финальная элонгация – 1 час при температуре 72°C; финальное удержание при температуре 4°C. После чего проводилась непосредственная загрузка образцов в анализатор 3500 фирмы Applied Biosystems, который позволяет проводить генетическую экспертизу в автоматическом режиме с высокой степенью точности, руководствуясь протоколом. Анализ результатов осуществляли с помощью программного обеспечения GenMapper 5 (рисунок 1).

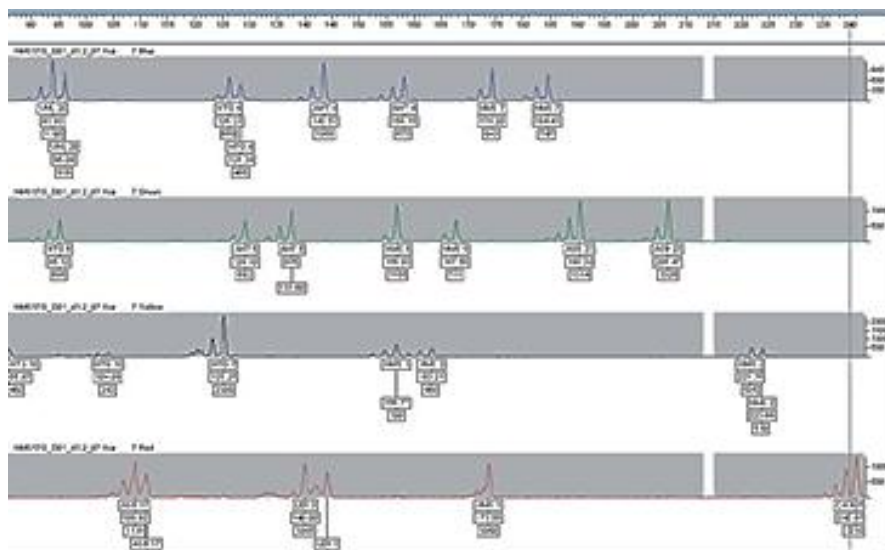


Рисунок 1 – Анализ амплифицированных SSR-локусов на генетическом анализаторе 3500

В ходе проведения исследований были рассчитаны следующие показатели (с помощью Microsoft Office Excel 2010): частота встречаемости аллелей (формула 1); среднее число аллелей на локус (NV); эффективное число аллелей (формула 2); процент гомо- и гетерозиготных генотипов в каждом микросателлитном локусе; наблюдаемая (формула 3) и ожидаемая гетерозиготность (формула 4); индекс фиксации Райта (формула 5); величина информативной ценности использованных маркеров (формула 6).

$$p = n/2N \quad (1)$$

где p – частота аллеля; n – число животных носителей данного аллеля; N – общее количество обследованных животных [5].

$$A_e = 1/\sum p_{ij}^2 \quad (2)$$

где A_e – уровень полиморфности (показатель числа действующих эффективных аллелей), p – частота встречаемости j аллеля для локуса i и суммирование распространяется на n аллелей [6, 8].

$$H_o = h_j/n \quad (3)$$

где H_o – наблюдаемая гетерозиготность по одному локусу; h_j – количество гетерозиготных генотипов в локусе; n – общее количество генотипов в локусе [9].

$$H_e = 1 - \sum p_i^2 \quad (4)$$

где H_e – ожидаемая гетерозиготность по одному локусу; p_i – частота встречаемости i -го аллеля [6, 12].

$$F_{is} = (H_e - H_o)/H_e \quad (5)$$

где F_{is} – индекс фиксации Райта, H_e – ожидаемая гетерозиготность, H_o – наблюдаемая гетерозиготность [10, 11].

$$PIC_i = 1 - \sum p_{ij}^2 \quad (6)$$

где PIC_i – полиморфное информационное содержание i -го локуса; p – частота j аллеля для локуса i и суммирование распространяется на n аллелей [6].

Результаты и их обсуждение. В ходе анализа аллелофонда исследованных пород лошадей по 17 микросателлитов ДНК были получены данные, которые характеризуют полиморфизм каждого из маркеров (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика полиморфизма изученных локусов микросателлитов ДНК исследованной популяции лошадей

Микросателлитный локус	Ср. число аллелей на локус (NV)	Уровень полиморфности (Ae)	Наблюдаемая гетерозиготность (H _o)	Ожидаемая гетерозиготность (H _e)	Индекс фиксации (F _{is})	Величина информативной ценности (PIC)
АНТ4	6,625	3,651	0,759	0,711	-0,068	0,621
АНТ5	5,375	3,980	0,712	0,731	0,026	0,661
ASB17	7,625	4,739	0,777	0,774	-0,004	0,722
ASB2	9,000	5,131	0,722	0,787	0,083	0,628
ASB23	6,750	4,362	0,765	0,764	-0,001	0,699
CA425	6,143	3,252	0,597	0,646	0,076	0,521
HMS1	4,250	2,990	0,663	0,655	-0,012	0,544
HMS2	6,125	3,449	0,678	0,688	0,015	0,573
HMS3	7,000	3,867	0,609	0,721	0,155	0,645
HMS6	5,375	2,863	0,695	0,628	-0,107	0,597
HMS7	6,250	3,912	0,755	0,725	-0,041	0,647
HTG10	7,000	4,449	0,806	0,768	-0,049	0,721
HTG4	5,375	2,609	0,660	0,592	-0,115	0,504
HTG6	5,500	2,968	0,679	0,642	-0,058	0,518
HTG7	3,875	2,769	0,693	0,616	-0,125	0,505
LEX 3	6,750	4,381	0,575	0,765	0,248	0,718
VHL 20	7,750	4,740	0,818	0,780	-0,049	0,725
В среднем	6,281	3,771	0,704	0,706	x	0,621

По 17-ти изученным SSR-локусам идентифицировано от 6 до 15 аллелей. Среднее число аллелей на локус (NV) варьировало от 3,875 до 9,000. Чем большим числом аллелей представлена популяция и чем более равномерно они распределены, тем более варибельным является генетический потенциал популяции. С другой стороны, чем большим числом аллелей представлены SSR-локусы, тем более информативными они являются для характеристики популяции.

Средний показатель уровня полиморфности локуса (Ae) составил 3,771 единицы, в связи с чем все локусы были разделены на две группы. В первую группу вошли локусы, которые имеют значение уровня полиморфности ниже среднего уровня – это локусы HTG4, HTG7, HMS6, HMS1, HTG6, АНТ4, СА425, HMS2. Минимальным значением характеризовался локус HTG4 – 2,609. Вторую группу составили локусы, имеющие значение уровня полиморфности превышающие средние показатели: ASB2, ASB17, ASB23, HTG10, LEX3, VHL20. Максимальным уровнем полиморфности обладает локус ASB2 – 5,131.

Учитывая, что уровень полиморфности, по сути, является показателем эффективно действующих в популяции аллелей, эта величина коррелирует с числом аллелей, выявленных в каждом из исследованных локусов (т.е. чем больше выявлено аллелей, тем больше уровень полиморфности) [2].

В вопросах динамики генетического состава популяций важным параметром является гетерозиготность. Это генетическое явление наблюдается у организмов, гомологичные хромосомы которых имеют разные формы (аллели) того или иного гена. Гетерозиготность возникает при слиянии разнокачественных гамет в гетерозиготу, широко распространена в природных популяциях и является одной из причин гетерозиса. Гетерозиготность играет положительную роль в адаптации популяций к изменяющимся условиям окружающей среды, а также в микроэволюционном процессе. Поэтому ее оценка в настоящее время необходима практически во всех популяционно-генетических исследованиях [3].

Степень наблюдаемой гетерозиготности является мерой генетической изменчивости в популяции. Частота гетерозигот – важный показатель, поскольку каждая гетерозигота несет разные аллели и иллюстрирует наличие изменчивости [4].

Для точной оценки изменчивости популяции вводится показатель ожидаемой гетерозиготности, рассматривающий уровень аллельного разнообразия. В связи с этим нами была дана оценка наблюдаемой и ожидаемой степени гетерозиготности, рассчитанная по 17 SSR-локусам, средние показатели которых составили 0,704 и 0,706 соответственно.

Наибольшим уровнем наблюдаемой (Ho) гетерозиготности характеризовался локус VHL 20, а ожидаемой (He) гетерозиготности – локус ASB2 (0,818 и 0,787 соответственно), в то время как наименьшим наблюдаемым уровнем гетерозиготности характеризовался локус LEX 3 (0,575), а наименьшим ожидаемым уровнем гетерозиготности локус HTG4 (0,592). Установить связь между индивидуумами отдельной популяции и популяцией в целом позволяет индекс фиксации Fis. Так как данный показатель количественно отражает отклонение частот встречаемости гетерозиготных генотипов от теоретически ожидаемой по Харди-Вайнбергу доли гетерозигот при случайном спаривании внутри популяции, он может рассматриваться в качестве одного из критериев инбредности популяции. При этом положительное значение индекса Fis означает нехватку гетерозигот в данной популяции, в то время как отрицательное значение индекса указывает на избыток гетерозигот [7].

В нашем исследовании выявлено, что недостаток гетерозигот наблюдается у локусов АНТ5, ASB2, СА425, HMS2, HMS3, LEX 3 (рисунок 2).

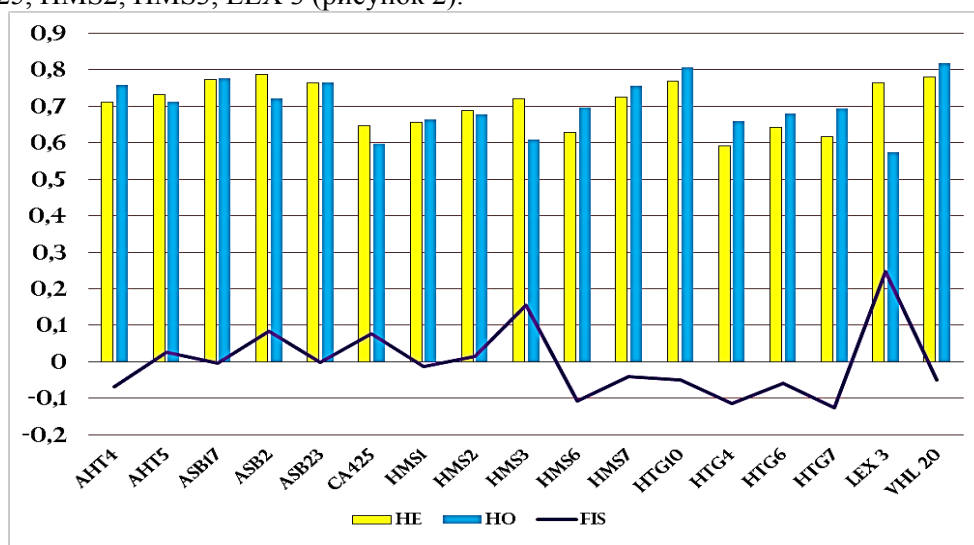


Рисунок 2 – Ожидаемая (He), наблюдаемая (Ho) гетерозиготность и индекс фиксации (Fis) в изученной популяции лошадей

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. Этот показатель характеризует дискриминационную силу локуса не только по количеству выявленных аллелей, но и по относительным частотам их встречаемости. Значение PIC приближается к единице, если локус имеет множество аллелей с приблизительно равной частотой встречаемости, и равен 0, если локус мономорфный [12, 13].

В проведенных нами исследованиях было установлено, что все изученные SSR-локусы имели $PIC > 0,5$, что указывает на их высокую информативность в качестве молекулярно-генетических маркеров для оценки достоверности происхождения животных.

Выводы. На основании полученной характеристики аллельного разнообразия и частот генотипов исследуемых SSR-локусов можно заключить, что все они соответствуют основным требованиям, делающим их привлекательными для анализа генетической дифференциации животных – высокий уровень полиморфизма, хорошо сбалансированные частоты аллелей, высокая степень гетерозиготности. Результаты исследований позволяют рекомендовать локусы АНТ4, АНТ5, АСВ17, АСВ2, АСВ23, СА425, НМС1, НМС2, НМС3, НМС6, НМС7, НТГ10, НТГ4, НТГ6, НТГ7, LEX 3, VHL 20 для характеристики аллелофонда лошадей, оценки генетической дифференциации, идентификации групп животных и отдельных особей. Высокий уровень полиморфизма и кодоминантный характер наследования открывают возможность поиска взаимосвязей аллельных вариантов микросателлитных локусов с продуктивными признаками животных.

Таким образом, обнаруженные особенности SSR-полиморфизма исследуемой популяции лошадей позволяет более эффективно использовать отдельные локусы для различных целей генетико-популяционных исследований.

Литература

1. Зайцева, М.А. Использование микросателлитных маркеров ДНК в контроле происхождения лошадей / М.А. Зайцева // Вклад молодых ученых в развитие аграрной науки 21 века : материалы междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов, Рязань, 2–3 марта, 2004 г. / М-во сел. хоз-ва Рос. Федерации, Ряз. гос. с.-х. акад. им. П.А. Костычева. – Рязань, 2004. – С. 105–107.
2. Глинская, Н.А. Анализ генетического разнообразия популяций черно-пестрого крупного рогатого скота по STR-локусам / Н.А. Глинская, Т.И. Епишко, О.А. Епишко // Актуальные проблемы сельскохозяйственной биотехнологии: сб. науч. тр. / Нац. банк Респ. Беларусь, Учреждение образования "Полес.гос. ун-т"; [редкол.: Т.И. Епишко (отв. ред.) и др.]. – Пинск, 2012. – С. 21–25.
3. Коновалова, Е.Н. Характеристика симментальского скота различного происхождения с использованием ДНК-микросателлитов / Е.Н. Коновалова, В.И. Сельцов, Н.А. Зиновьева // Зоотехния. – 2006. – № 8. – С. 6–9.
4. Лазовский, А.А. Селективная и адаптационная значимость генетического полиморфизма : учеб.-метод. пособие / А.А. Лазовский ; М-во сел. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь, Витеб. гос. акад. ветеринар. медицины. – Витебск, 2005. – 30 с.
5. Меркурьева, Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве : учеб. пособие / Е.К. Меркурьева. – М. : Колос, 1977. – 174 с.
6. African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations / O. Hanotte [et al.] // Science. – 2002. – Vol. 296, № 5566. – P. 336–339.
7. African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations / O. Hanotte [et al.] // Science. – 2002. – Vol. 296, № 5566. – P. 336–339.
8. Genetic diversity analysis of five cattle breeds native to China using microsatellites / G. Zhou [et al.] // J. Of Genetics. – 2005. – Vol. 84, № 1. – P. 77–80.
9. Genetic diversity and population structure of 20 north European cattle breeds / J. Kantanen [et al.] // J. Of Heredity. – 2000. – Vol. 91, № 6. – P. 446–457.
10. Guo, S.W. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles / S.W. Guo, E.A. Thomson // Biometrics. – 1992. – Vol. 48, № 2. – P. 361–372.
11. Triplex-induced recombination and repair in the pyrimidine motif / J.M. Kalish [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2005. – Vol. 33, № 11. – P. 3492–3502.
12. Yu, G.X. An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid Avena / G.X. Yu, R.P. Wise // Genome. – 2000. – Vol. 43, № 5. – P. 736–749.

13. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafatski, D. Labuda // Genomics. – 1994. – Vol. 20, № 2. – P. 176–183.

FEATURES OF SSR-POLYMORPHISM OF HORSES

***N.A. GLINSKAYA, E.I. PRILOVSKAYA, D.A. KASPIROVICH, O.A. EPISHKO,
E.S. CHEBURANOVA***

Summary

To date, the use of DNA markers is the most effective, informative and reliable method used in fundamental and applied genetic research, both at the individual and at the population level.

The research was conducted in the research laboratory "Applied and Fundamental Biotechnology" on the basis of the Polesky State University, as well as in the research laboratory of DNA technologies on the basis of the Grodno State Agrarian University. Horse genotyping was performed at 17 microsatellite loci recommended by the International Society for Animal Genetics (ISAG) using the StockMarks for Horses kit for horse genotyping. The studies were carried out with the biological material of 3 plant breeds of horses: Akhal-Teke (n = 17), thoroughbred horse (n = 17), tracene (n = 16).

Статья поступила 1 марта 2017г.