

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ БЕЛОРУССКОЙ СЕЛЕКЦИИ ПО STR-ЛОКУСАМ

Н.А. ГЛИНСКАЯ

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

Введение. Одним из приемов выявления генетических различий между популяциями, оценки структуры популяций является использование микросателлитов (STR-локусов). Исследование крупного рогатого скота (КРС) по микросателлитам и построение на их основе специфических ДНК-профилей пород, типов и линий позволяет использовать данные анализа в планировании селекционной работы в популяциях сельскохозяйственных животных [2]. Необходимость применения методов анализа генетической изменчивости, основанных на изучении ДНК, диктуется тем, что ранее широко использовавшиеся для этой цели белковые системы не могут в полной мере адекватно отражать генетическое сходство в группах животных. Дело в том, что различия между синонимическими кодонами не меняют кодируемых аминокислот, а это значит, что процесс накопления мутаций не регистрируется анализом синтезируемых организмом белков. Анализ ДНК используется не только на отдельных особях, но и на целых популяциях животных [1]. Таким путем можно проводить мониторинг состояния популяций. В связи с чем, в наших исследованиях был проведен анализ генетической дифференциации популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусской селекции по STR-локусам.

Методика и объекты исследования. В УО «Гродненский государственный аграрный университет», а также УО «Полесский государственный университет» в научно-исследовательской лаборатории промышленной биотехнологии проведено генетическое тестирование по 11 STR-локусам нуклеотидных последовательностей ДНК: BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53.

В качестве объекта исследований использовали крупный рогатый скот черно-пестрой породы, разводимый в хозяйствах: КСУП «ПЗ «Красная звезда», СПК «Агрокомбинат Снов», ОАО «1-я Минская птицефабрика», СПК «Першаи-2003», РСУП «Брестплемпредприятие», РСУП «Шикотавичи», ПЗ «Муховец», ОАО «Птицефабрика «Дружба», РУСП «Минское племпредприятие».

Геномную ДНК выделяли из ткани животных перхлоратным методом, концентрацию которой измеряли на спектрофотометре «NanoDrop 1000».

Реакционная смесь для проведения мультиплексной реакции готовилась в объеме 15 мкл и включала следующие компоненты: ПЦР буфер – 1,5 мкл; MgCl₂ (25 mM) – 1,8 мкл; dNTP mix (10–12 mM) – 1,5 мкл; праймеры (mix) – 3 мкл; Taq-полимераза – 1 ед; ДНК 1 мкл (конц. 100 – 200 нг/мкл); вода (дистиллированная) – до 15 мкл.

Для проведения амплификации использовались меченные 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°C; 97°C – 20 сек; 32 цикла: денатурация – 30 сек при 95°C, отжиг – 65°C – 1 сек и 59°C – 1 мин 15 сек; синтез 30 сек при 68°C; достройка 30 сек – 70°C и охлаждение 4°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 течение 5 мин при 95°C с последующим охлаждением при 4°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 GenneMapper Software Version 4.0.

Были рассчитаны следующие популяционно-генетические показатели (с помощью Microsoft Office Excel 2007): частота встречаемости аллелей [3]; уровень полиморфности [6]; наблюдаемая [5] и ожидаемая гетерозиготность [5]; индекс фиксации Райта [8]; величина информативной ценности использованных маркеров [4]; генетические дистанции [7].

Результаты и их обсуждение. В результате генотипирования популяции животных КСУП «ПЗ «Красная звезда» (n=191) по изучаемым STR-локусам были получены данные, характеризующие полиморфизм каждого из маркеров. Число идентифицированных аллелей варьировало от 18 до 34, причем минимальное количество в локусах BM1824 и ETH3, а максимальное в локусе TGLA122. Средний показатель уровня полиморфности, рассчитанный на один локус составил 10,799 ед.

В исследуемой популяции КРС практически во всех локусах показатель наблюдаемой гетерозиготности превышал значение ожидаемой гетерозиготности, за исключением локусов BM1824 и TGLA53, в которых, наоборот, ожидаемая гетерозиготность превышала наблюдаемую. Наибольшим уровнем наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности характеризовался локус TGLA227 (0,960 и 0,946, соответственно), а наименьшим – BM1824 (0,870 и 0,873, соответственно).

Анализ показателя F-статистики индекса фиксации Fis показал, что локусы BM1824 и TGLA53 отличаются смещением равновесия в сторону недостатка гетерозигот (Fis = 0,003 и Fis = 0,022, соответственно), в то время как все остальные локусы характеризовались избытком гетерозигот.

Все изученные микросателлитные последовательности в популяции КРС КСУП «ПЗ «Красная звезда» имели PIC>0,5, что указывает на их высокую информативность.

Анализ результатов ДНК-типирования популяции КРС СПК «Агрокомбинат Снов» показал, что количество аллелей в исследуемых локусах варьировало от 10 (локус TGLA126) до 19 (локус TGLA122).

Средний показатель уровня полиморфности близок к таковому в популяции КСУП «ПЗ «Красная звезда» и составил 10,767 ед.

В локусах ETH225, ETH3, SPS115 и TGLA126 показатель наблюдаемой гетерозиготности значительно превосходил ожидаемую гетерозиготность, в локусах BM2113 и TGLA53 ожидаемая гетерозиготность превышала наблюдаемую, в остальных локусах отмечалась разная степень преобладания наблюдаемой гетерозиготности над ожидаемой. Наибольшей наблюдаемой гетерозиготностью характеризовался локус TGLA227 (1,000), а наибольшей ожидаемой – локус TGLA53 (0,985). Наименьшей наблюдаемой гетерозиготностью характеризовался локус ETH3 (0,800), в то время как наименьшей ожидаемой гетерозиготностью характеризовался локус SPS115 (0,563).

В исследуемой выборке все локусы отличались избытком гетерозигот, за исключением локусов BM2113 (Fis = 0,010) и TGLA53 (Fis = 0,028), в которых наблюдалось смещение равновесия в сторону недостатка гетерозигот.

Величина PIC для локуса TGLA126 составила 0,414, что говорит о его достаточной информативности в качестве маркера, в то время как все остальные локусы характеризовались очень высокой информативностью (для них PIC>0,5).

В группе животных, разводимых в СПК ОАО «1-я Минская птицефабрика» (n=50) минимальное количество аллелей выявлено в локусе TGLA126, а максимальное – в локусе TGLA122, как в популяции КРС СПК «Агрокомбинат Снов», 8 и 22, соответственно. Средний показатель уровня полиморфности составил 6,294 ед.

В трех локусах BM1824, BM2113 и TGLA53 ожидаемая гетерозиготность превысила наблюдаемую. В них же наблюдался недостаток гетерозигот (индекс фиксации составил 0,030, 0,047 и 0,081, соответственно). В остальных локусах наблюдалась разная степень преобладания наблюдаемой гетерозиготности над ожидаемой.

Наибольшая наблюдаемая гетерозиготность отмечена для локуса TGLA227 (0,963), наибольшая ожидаемая – для локуса TGLA53 (0,967). Наименьшая наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность отмечена для локуса TGLA126 (0,737 и 0,682, соответственно).

В данной популяции все локусы характеризовались очень высокой информативностью (PIC>0,5).

В популяции животных СПК «Першаи-2003» (n=42) количество аллелей варьировало от 6 до 17, причем минимальным числом аллелей характеризовались локусы BM1824, ETH3 и TGLA126, а максимальным характеризовался локус BM2113. Средний показатель уровня полиморфности составил 4,150 ед.

В локусах BM1824, ETH225, INRA023 и TGLA122 показатель наблюдаемой гетерозиготности значительно превысил показатель ожидаемой гетерозиготности, в локусе ETH10 ожидаемая гетерозиготность превосходила наблюдаемую, а в остальных локусах отмечалась различная степень преобладания наблюдаемой гетерозиготности над ожидаемой. Наибольшей наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью характеризовался локус TGLA227 (1,000 и 0,875, соответственно), как и в популяции КРС КСУП «ПЗ «Красная звезда», а наименьшей наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью – локусы ETH3 и BM1824 (0,727 и 0,516, соответственно).

Анализ показателя индекса фиксации F_{is} показал, что только локус ETH10 отличался смещением равновесия в сторону недостатка гетерозигот ($F_{is} = 0,073$), а все остальные локусы характеризовались избытком гетерозигот.

В популяции животных СПК «Першаи-2003» локусы BM1824 и ETH3, относительно величины PIC, являлись достаточно информативными, в то время как все остальные оказались очень информативными в качестве маркеров.

В ходе анализа полученных данных в популяции КРС РСУП «Брестплемпредприятие» ($n=40$) по 11 STR-локусам выявлено от 6 (TGLA126) до 18 (TGLA53) аллелей по 11 исследуемым локусам. Средний показатель уровня полиморфности, рассчитанный на один локус, варьировал от 2,019 до 12,441ед.

В локусе TGLA53 ожидаемая гетерозиготность превысила наблюдаемую, в связи с чем, равновесие в этом локусе сместилось в сторону недостатка гетерозигот ($F_{is} = 0,010$). В остальных локусах наблюдаемая гетерозиготность превышала ожидаемую, причем максимальной величиной наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности характеризовался локус TGLA227 (0,969 и 0,920, соответственно), как и в популяциях КРС СПК «Першаи-2003» и КСУП «ПЗ «Красная звезда», а минимальной величиной наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности – локус SPS115 (0,769 и 0,505, соответственно).

Относительно величины PIC, в популяции КРС РСУП «Брестплемпредприятие» локусы ETH3 и SPS115 достаточно информативны, а все остальные – очень информативны.

В исследуемой выборке КРС ($n=39$), разводимого в РСУП «Шикотовичи» минимальным числом аллелей (11) характеризовались локусы BM1824, ETH3, SPS115 и TGLA126, а максимальным числом аллелей – локус BM2113 (23), как в популяции КРС СПК «Першаи-2003». Средний показатель уровня полиморфности составил 9,534 ед.

Наблюдаемая гетерозиготность варьировала от 0,722 (локус TGLA53) до 0,967 (локус INRA023), а ожидаемая – от 0,700 (локус SPS115) до 0,956 (локус TGLA53). В локусах ETH10, ETH3, TGLA126 и TGLA53 показатель ожидаемой гетерозиготности превысил показатель наблюдаемой гетерозиготности, что привело к смещению равновесия в сторону недостатка гетерозигот, особенно в локусе TGLA53 ($F_{is} = 0,245$).

В данной популяции КРС все локусы характеризовались очень высокой информативностью ($PIC > 0,5$).

ДНК-анализ популяции КРС ГУСП ПЗ «Муховец» ($n=25$) по исследуемым локусам показал, что количество аллелей варьировало от 10 (локус TGLA126) до 17 (локусы TGLA122 и TGLA227).

Средний показатель уровня полиморфности составил 6,778, величина которого близка к таковому в популяциях КРС РСУП «Брестплемпредприятие» и ОАО «1-я Минская птицефабрика».

Наибольшим уровнем наблюдаемой гетерозиготности характеризовались локусы TGLA122 (1,000) и TGLA227 (1,000), а наибольшим уровнем ожидаемой гетерозиготности – локус INRA023 (0,903), в то время как наименьшим уровнем наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности отличался локус TGLA126 (0,813 и 0,724, соответственно). Во всех локусах наблюдаемая гетерозиготность превышала ожидаемую, за исключением локуса TGLA53, в котором наблюдалось смещение равновесия в сторону недостатка гетерозигот ($F_{is} = 0,045$).

В исследуемой популяции КРС черно-пестрой породы все локусы характеризовались очень высокой информативностью ($PIC > 0,5$).

В результате генотипирования КРС ОАО «Птицефабрика «Дружба» ($n=10$) по 11 исследуемым локусам выявлено от 6 (локусы BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, TGLA126) до 9 (локус TGLA53) аллелей. Средний показатель уровня полиморфности составил 4,134 ед.

Наблюдаемая гетерозиготность во всех локусах превышала ожидаемую и по всем локусам наблюдался избыток гетерозигот. Наибольшей наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью характеризовались локусы ETH225 (1,000 и 0,730), TGLA227 (1,000 и 0,788) и TGLA53 (1,000 и 0,903), а наименьшей наблюдаемой – локусы BM1824 (0,778) и ETH10 (0,778), наименьшей ожидаемой –

локус TGLA122 (0,425). В локусе TGLA122 наблюдаемая гетерозиготность в 2 раза превышала ожидаемую и величина $PIC < 0,25$, что говорит о его малой информативности в качестве маркера.

При анализе популяции КРС черно-пестрой породы РУСП «Минское племпредприятие» по 11 STR-локусам наименьшее число аллелей выявлено в локусе BM1824 (4), а максимальное – в локусе INRA023 (10). Средний показатель уровня полиморфности составил 4,117, величина которого близка к таковому в популяциях КРС ОАО «Птицефабрика «Дружба» и СПК «Першаи-2003».

Как и в популяции КРС ГУСП ПЗ «Муховец» во всех локусах наблюдаемая гетерозиготность превышала ожидаемую, за исключением локуса TGLA53, в котором наблюдалось смещение равновесия в сторону недостатка гетерозигот ($Fis=0,200$). Наибольшим уровнем наблюдаемой гетерозиготности характеризовались локусы BM1824 (1,000), ETH225 (1,000), ETH3 (1,000), INRA023 (1,000) и TGLA227 (1,000), а наибольшим уровнем ожидаемой гетерозиготности – локус INRA023 (0,865). Наименьшей наблюдаемой гетерозиготностью отличался локус TGLA53 (0,667), а наименьшей ожидаемой гетерозиготностью – локус ETH3 (0,415), причем значение наблюдаемой гетерозиготности, для этого локуса, больше чем в 2 раза превысило значение ожидаемой гетерозиготности и величина PIC гораздо меньше 0,25, что говорит о его малой информативности. В остальных локусах наблюдалось разное преобладание наблюдаемой гетерозиготности над ожидаемой и, относительно величины PIC , все они очень информативны.

Полученные данные по 11 STR-локусам 9 изученных популяций были обобщены и сведены в таблицу 1.

Было установлено, что популяции крупного рогатого скота черно-пестрой породы КСУП «ПЗ «Красная звезда», СПК «Агрокомбинат Снов», ОАО «1-я Минская птицефабрика», СПК «Першаи-2003», РСУП «Брестплемпредприятие», РСУП «Шикотовичи», ПЗ «Муховец», ОАО «Птицефабрика «Дружба» и РУСП «Минское племпредприятие» заметно различаются по наличию, частоте встречаемости аллелей микросателлитных локусов и уровню полиморфности. Были выявлены специфические для определенной популяции аллели – «приватные» аллели (P_a). Двенадцать «приватных» аллелей обнаружено в популяции КРС КСУП «ПЗ «Красная звезда»: 74, 96, 102, 108, 110, 111, 112, 169, 197, 198, 239, 259; по одному – в СПК «Першаи-2003» и РУСП «Минское племпредприятие», 70 и 169, соответственно.

Таблица 1 – Характеристика популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы по изученным STR- локусам

Популяция	n	Na	P_a	A_e	H_o	H_e	Fis
КСУП «ПЗ «Красная звезда»	191	167	12	10,799	0,923	0,894	-0,020
СПК «Агрокомбинат Снов»	111	114	-	10,767	0,886	0,789	-0,149
ОАО «1-я Минская птицефабрика»	50	111	-	9,069	0,864	0,841	-0,031
СПК «Першаи-2003»	42	75	1	4,550	0,870	0,742	-0,170
РСУП «Брестплемпредприятие»	40	96	-	6,269	0,859	0,778	-0,135
РСУП «Шикотовичи»	39	121	-	9,534	0,867	0,857	-0,019
ГУСП ПЗ «Муховец»	25	108	-	6,778	0,909	0,834	-0,092
ОАО «Птицефабрика «Дружба»	10	62	-	4,134	0,882	0,709	-0,279
РУСП «Минское племпредприятие»	8	68	1	4,117	0,882	0,716	-0,289

Самый широкий спектр аллелей (167 аллелей по 11 локусам), максимальное число «приватных» аллелей (12) и наибольший уровень полиморфности (10,799) были выявлены у исследованных животных КСУП «ПЗ «Красная звезда», в то время как самый узкий спектр аллелей (62), отсутствие «приватных» аллелей и наименьший уровень полиморфности (4,134) были выявлены у животных, разводимых в ОАО «Птицефабрика «Дружба».

Необходимо отметить, что выборка животных ОАО «Птицефабрика «Дружба» значительно меньше и, возможно, этот фактор препятствовал эффективному раскрытию резервов изменчивости

данной популяций и в дальнейших исследованиях, посвященных ей, будут найдены дополнительные аллели локусов микросателлитов ДНК.

Анализ генетического разнообразия исследованных популяций показал, что наблюдаемая степень гетерозиготности варьировала от 0,859 (РСУП «Брестплемпредприятие») до 0,923 (КСУП «ПЗ «Красная звезда»). Показатели ожидаемой степени гетерозиготности варьировали от 0,709 (ОАО «Птицефабрика «Дружба») до 0,894 (КСУП «ПЗ «Красная звезда»). Следует отметить, что в популяции КРС РСУП «Шикотовичи» наблюдалось равновесное распределение наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, в то время как в популяциях КРС ОАО «Птицефабрика «Дружба» и РУСП «Минское племпредприятие» показатель наблюдаемой гетерозиготности значительно превышал показатель ожидаемой гетерозиготности. Индекс фиксации (Fis) имел отрицательное значение во всех исследованных популяциях животных, что говорит о смещении генетического равновесия в данных группах в сторону избытка гетерозигот.

Также был проведен кластерный анализ генетических расстояний между изученными популяциями животных крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусской селекции (таблица 2).

Генетическое расстояние (D_A) – мера генетического различия (дивергенции) между видами, подвидами, или популяциями одного вида. Малое генетическое расстояние означает генетическое сходство, большее генетическое расстояние означает меньшее генетическое сходство.

Таблица 2 – Генетические дистанции между популяциями крупного рогатого скота черно-пестрой породы

Популяция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-								
2	0,116	-							
3	0,101	0,085	-						
4	0,122	0,107	0,093	-					
5	0,085	0,069	0,054	0,076	-				
6	0,098	0,082	0,068	0,089	0,051	-			
7	0,095	0,079	0,065	0,086	0,048	0,062	-		
8	0,100	0,084	0,070	0,091	0,053	0,066	0,064	-	
9	0,086	0,070	0,056	0,077	0,039	0,053	0,049	0,055	-

Примечание – 1 – КСУП «ПЗ «Красная звезда», 2 – СПК «Агрокомбинат Снов», 3 – ОАО «1-я Минская птицефабрика», 4 – СПК «Першаи-2003», 5 – РСУП «Брестплемпредприятие», 6 – РСУП «Шикотовичи», 7 – ГУСП ПЗ «Муховец», 8 – ОАО «Птицефабрика «Дружба», 9 – РУСП «Минское племпредприятие»

Проведенный анализ показал, что наименьшее генетическое расстояние наблюдалось между популяциями КРС РСУП «Брестплемпредприятие» и РУСП «Минское племпредприятие» (0,039), а наибольшее – между популяциями КРС КСУП «ПЗ «Красная звезда» и СПК «Першаи-2003» (0,122).

Выводы. Таким образом, сравнительная оценка полиморфизма 11 STR-локусов у КРС черно-пестрой породы 9 изученных популяций показала, что каждая популяция имеет свою генетическую структуру с наличием или отсутствием «приватных» аллелей. Причем в большинстве популяций локус TGLA126 характеризовался наименьшим числом аллелей, а локус TGLA122 – наибольшим. В 7 из 9 изученных популяций в локусе TGLA53 ожидаемая гетерозиготность превышала наблюдаемую, что привело к смещению равновесия в сторону недостатка гетерозигот. Но в целом, по 11 локусам, во всех анализируемых популяциях соотношение ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, а также показателя Fis, говорит об избытке гетерозигот в них и высоком «запасе» генетического разнообразия по STR-локусам.

Установлен высокий уровень генетического сходства данных популяций, о чем свидетельствует небольшое генетическое расстояние между ними.

Выявленные генетические особенности КРС черно-пестрой породы, разводимого в Беларуси, дают дополнительную информацию для изучения их происхождения и могут быть использованы в программах по сохранению генофонда малочисленных популяций.

ЛИТЕРАТУРА

1. ДНК технологии оценки сельскохозяйственных животных / Л.А. Калашникова [и др.]. – Московская обл. – ВНИИплем, 1999. – 148 с.
2. Калашникова, Л.А. Селекция XXI века: использование ДНК-технологий / Л.А. Калашникова, И.М. Дупин, В.И. Глазко. – Московская обл. – ВНИИплем, 2000. – 31 с.
3. Меркурьева, Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве / Е. К. Меркурьева – Москва: «Колос» – 1977. – 174 с.
4. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms / D. Botstein [et al] // Am. J. Hum. Genet. – 1980. – V. 32 – P.314–331..
5. Guo, S. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles / S. Guo, E. Thomson // Biometrics. – 1992. – Vol. 48 – P. 361–372.
6. Maughan, P. Microsatellite and amplified sequence length polymorphism in cultivated and wild soybean / P. Maughan, M. Saghai-Marooof, G. Buss // Genome. – 1995. – V. 38. – P. 715–723.
7. Nei, M. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data / M. Nei, F. Tajima, Y. Tateno // Journal of Molecular Evolution. – 1983. – Vol. 19. – P. 153–170.
8. 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.

THE ANALYSIS OF GENETIC DIFFERENTIATION OF POPULATIONS OF CATTLE OF BLACK AND MOTLEY BREED OF THE BELARUSIAN SELECTION ON STR-LOCI

N. HLINSKAYA

Summary

According to statistical data 20-30% of animals, not corresponding to their genetic description, participate in the selection process for different reasons; that greatly restrains their selection process of livestock breeding. For this reason and in accordance with international codes and requirements of pedigree products certification it is necessary to carry out obligatory genetic expertise of pedigree cattle origin on STR-loci.

© Глинская Н.

Поступила в редакцию 19 сентября 2013г.