

Т. И. Епишко

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,

Беларусь

ГЕНЕТИКО – ПОПУЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЧЕРНО – ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ ПО STR – ЛОКУСАМ

Проведен генетико-популяционный анализ по 11 микросателлитным локусам BM1824, BM 2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53. Рассчитан уровень гомозиготности четырех популяций молочного скота по полиморфизму нуклеотидных последовательностей ДНК.

Повышение эффективности контроля происхождения крупного рогатого скота – одна из важнейших задач животноводства. На сегодняшний день единственным наиболее точным способом оценки достоверности происхождения и идентификации племенного поголовья молочного скота является генетическое тестирование по микросателлитным локусам с последующим определением полиморфизма исследуемых популяций [5].

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

Полиморфизм микросателлитных локусов также используется при изучении генетической структуры породы, в анализе генетических состояний между линиями, породами и популяциями, при оценке генетической вариабельности и внутривидового родства, а также для прогноза возможного гетерозиготного эффекта при разведении [1].

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

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели нами проведено ДНК-тестирование четырех популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы, разводимых в КСУП «Племенной завод «Красная

звезда», СПК «Агрокомбинат Снов», СПК «Першай-2003», ОАО «1-я Минская птицефабрика» по 11 микросателлитным локусам нуклеотидных последовательностей ДНК: BM1824, BM 2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53, характеристика которых представлена в таблице 1.

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. Характеристика микросателлитных локусов, рекомендованных ISAG для проведения достоверности происхождения крупного рогатого скота

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

1. ПЦР буфер–1,5 мкл
2. MgCl₂ (25 mM) – 1,8 мкл
3. dNTPmix (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 меченные праймеры. В качестве меток использовались FAM, JOE и NED метки, флюоресцирующие синим, зеленым и желтым цветами, соответственно. Характеристика последовательностей микросателлитных локусов ДНК, отобранных для проведения анализа представлена в таблице 2.

Полимеразная цепная реакция была проведена на амплификаторе *T Professional basic*. Режим амплификации состоял из следующих шагов: «горячий старт» – 3 мин при 95⁰С; 97⁰С – 20 сек; 32 цикла: денатурация – 30 сек при 95⁰С, отжиг – 65⁰С – 1 сек и 59⁰С – 1 мин 15 сек; синтез 30 сек при 68⁰С; достройка 30 сек – 70⁰С и охлаждение 4⁰С.

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 95⁰С с последующим охлаждением при 4⁰С. Затем производили непосредственную загрузку образцов в секвенатор «ABIPrism 3130», руководствуясь протоколом.

2. Характеристика праймеров, используемых при проведении мультиплексной реакции для определения достоверности происхождения крупного рогатого скота

Локус	Структура праймера (5'--> 3')	Температура отжига, °С
BM1824 F BM1824 R	gagcaagggtgttttccaatc cattctccaactgcttccttg	70
BM2113 F BM2113 R	gctgccttctaccaaatccc cttctgagagaagcaacacc	70,5
ETH10 F ETH10 R	gttcaggactggccctgctaaca cctccagcccactttctctctc	72
ETH225 F ETH225 R	gatcaccttgccactatttctc acatgacagccagctgctact	70,9
ETH3 F ETH3 R	gaacctgcctctcctgcattgg actctgcctgtggccaagtagg	72
INRA023 F INRA023 R	gagtagagctacaagataaacttc taactacagggtgttagatgaactc	62
SPS115 F SPS115 R	aaagtgacacaacagcttccagaac- gagtgctcctagttggctgtg	72
TGLA122 F TGLA122 R	ccctcctccaggtaaatcagc aatcacatggcaaataagtacatac	68
TGLA126 F TGLA126 R	ctaattagaatgagagaggcttct ttggtctctattctctgaatattcc	67
TGLA227 F TGLA227 R	cgaattccaaatctgtaatttgct acagacagaaactcaatgaaagca	71
TGLA53 F TGLA53 R	gctttcagaaatagttgcattca atcttcacatgatattacagcaga	67

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

Популяционно-генетические характеристики были рассчитаны по следующим формулам:

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

где: h_x – ожидаемая гетерозиготность по одному локусу,

p_i – частота i -го аллеля [4].

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

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 и обсуждение. Известно, что эффективность селекции и отбора определяется генетическим разнообразием популяции, которое характеризуется наличием гетерозиготных форм. Гетерозиготность отражает запас эволюционной пластичности пород за счет постоянного выщепления и комбинации различных генотипов, относительная приспособленность которых способна меняться в различных условиях существования особей. Гетерозиготность, служит мерой генетической изменчивости популяции и определяется как средняя частота гетерозиготных особей относительно численности популяции по определенным локусам. Высокая гетерозиготность всегда сопровождается повышенной жизнеспособностью в пре- и постнатальный периоды онтогенеза, воспроизводительной и адаптационной способностью к изменениям природно-хозяйственных условий среды обитания.

На величину гетерозиготности популяций оказывает влияние мутационный процесс, различные типы отбора, дрейф генов, неслучайное скрещивание и другие факторы. Поэтому ее оценка необходима практически во всех популяционно-генетических исследованиях.

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

На основе результатов генотипирования животных СПК «Першаи-2003», ОАО «1-я Минская птицефабрика», КСУП «Племенной завод «Красная звезда» и СПК «Агрокомбинат Снов» по тринадцати SNR-локусам был проведен популяционно-генетический анализ исследуемых популяций крупного рогатого скота (табл. 3, 4). В частности, определено количество аллелей на локус (N), ожидаемая гетерозиготность (h_k) и средняя ожидаемая (h_k ср.) гетерозиготность по каждому локусу, наблюдаемая $[(H)_{obs}]$ и средняя наблюдаемая гетерозиготность (H_{obs} ср.).

Анализ данных, представленных в таблице 3 по исследуемым популяциям животных, разводимым в СПК «Першаи-2003» и ОАО «1-я Минская птицефабрика» выявил, 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.

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.

3. Популяционно-генетические характеристики черно-пестрого крупного рогатого скота по 11 микросателлитным локусам СПК «Першаи-2003» и ОАО «1-я Минская птицефабрика»

Локус	СПК «Першаи-2003», (n = 54)					ОАО «1-я Минская птицефабрика», (n = 27)				
	N	h_k , %	h_k ср, %	H_{obs} , %	H_{obs} ср, %	N	h_k , %	h_k ср, %	H_{obs} , %	H_{obs} ср, %
BM1824	12	79,7	62,13	92,6	82	7	79,5	68,7	81,5	91,1
BM 2113	8	24,9		77,8		12	81,8		96,3	
ETH10	10	45,7		72,2		12	83,9		100	
ETH 225	9	75,6		31,5		7	71,8		88,9	
ETH 3	8	69,9		94,4		7	66,1		87,5	
INRA023	9	64,2		100		8	66,4		88,9	
SPS115	8	40,4		81,5		8	28,1		88,9	
TGLA122	16	75,8		92,6		11	77,5		100	
TGLA 126	8	36,8		66,7		5	36,4		70,4	
TGLA227	13	84,6		100		9	77,3		100	
TGLA 53	15	85,5		93,5		10	86,7		100	

Установлено, что популяция животных ОАО «1-я Минская птицефабрика» отличалась более высокой гетерозиготностью (91,1%) в сравнении с популяцией СПК «Першаи-2003» (82%). Это может быть, прежде всего, причиной дрейфа генов извне в результате искусственного осеменения животных и 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» (табл. 4).

В группе исследованных животных КСУП «Племенной завод «Красная звезда» наибольшее количество аллелей наблюдалось в локусах TGLA122 и TGLA227 – 34 и 33, соответственно; наиболее высоким уровнем наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности характеризовался локус TGLA227 (0,98 и 0,94, соответственно), а наименьшими значениями – локусы TGLA126 (0,89) и BM1824 (0,81), соответственно.

В популяции животных СПК «Агрокомбинат Снов» наибольшее количество аллелей идентифицировано в локусах TGLA122, ETH10 и INRA023 – 20, 16 и 16, соответственно. Наиболее высокими значениями наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности отличались локусы TGLA227 (1,00) и TGLA53 (0,98), соответственно, наименьшими показателями наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности – локусы ETH3 (0,79) и SPS115 (0,57), соответственно.

4. 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	0,81	81	0,93	93	12	0,85	78	0,85	87
BM 2113	23	0,92		0,93		15	0,85		0,83	
ETH10	22	0,88		0,92		16	0,80		0,83	
ETH 225	25	0,90		0,94		14	0,77		0,90	
ETH 3	18	0,89		0,95		11	0,63		0,79	
INRA023	28	0,89		0,96		16	0,83		0,92	
SPS115	22	0,86		0,92		14	0,57		0,81	
TGLA122	34	0,86		0,97		20	0,85		0,92	
TGLA 126	21	0,87		0,89		11	0,59		0,82	
TGLA227	33	0,94		0,98		15	0,87		1,00	
TGLA 53	31	0,94		0,90		15	0,98		0,98	

В общем, средний уровень наблюдаемой гетерозиготности в четырех популяциях по исследованным STR-локусам варьировал от 82% до 93% и был выше уровня ожидаемой гетерозиготности (от 62,13% до 81%).

Высокая гетерозиготность является следствием высокого полиморфизма изучаемых микросателлитных маркеров и свидетельствует о целесообразности их использования для оценки генетического разнообразия популяции и достоверности происхождения животных с высокой степенью точности.

В то же время, изученные нами популяции характеризовались различным уровнем средней гомозиготности отдельных STR-локусов, что указывает на различную интенсивность селекционных процессов, протекающих в стадах. Таким образом, искусственный отбор оказал влияние на проявление полиморфизма микросателлитных локусов в популяциях молочного скота в изучаемых популяциях. Следовательно, для одновременного поддержания в популяциях продуктивности и жизнеспособности при постоянном совершенствовании племенных качеств молочного скота, не-

обходимо изучение его генетического статуса, что позволит:

- консолидировать наследственную устойчивость животных, с одной стороны, путем увеличения числа потомков по нескольким локусам;
- контролировать и поддерживать гетерозиготность на уровне, обеспечивающем достаточную изменчивость и пластичность популяций.

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 (табл. 5).

5. Информативная ценность STR - локусов в качестве маркеров в исследуемых популяциях крупного рогатого скота черно-пестрой породы

Локус	Величина информативной ценности использованных маркеров (PIC)			
	КСУП «ПЗ «Красная звезда»	СПК «Агро-комбинат Снов»	СПК «Першаи-2003»	ОАО «1-я Минская птицефабрика»
BM1824	0,90	0,84	0,93	0,82
BM 2113	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

Установлено, что все изученные микросателлитные последовательности имели $PIC > 0,5$. Следовательно, совокупность полученных данных указывает на целесообразность использования этих маркеров в дальнейшем поиске ассоциаций с локусами хозяйственно-полезных признаков.

Таким образом, в исследованных популяциях обнаружен высокий «запас» генетического разнообразия по микросателлитным локусам, что свидетельствуют о возможности их использования для паспортизации, идентификации, подтверждения происхождения отдельных индивидов и изучения генетического разнообразия пород и популяций черно-пестрого крупного рогатого скота.

Библиографический список

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*. – 1995 а. – 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.

Епишко Т. И. Генетико-популяционный анализ крупного рогатого скота черно-пестрой породы по str- локусам // Корми і кормовиробництво. – 2012. – Вип. 73. – С. 204—211.

Проведен генетико-популяционный анализ по 11 микросателлитным ло-кусам BM 1824, BM 2113, ETH 10, ETH225, ETH3, INRA 023, SPS 115, TGLA

122, TGLA 126, TGLA 227, TGLA 53. Рассчитан уровень гомозиготности четы-рех популяций молочного скота по полиморфизму нуклеотидных последова-тельств ДНК.

Epishko T. I. Genetic and population analysis of the cattle of black and white breed by str-loci // Feeds and Feed Production. – 2012. – Issue 73. – P. 204—211.

Genetic population analysis by 11 microsatellite loci BM 1824, BM 2113, ETH 10, ETH225, ETH3, INRA 023, SPS 115, TGLA 122, TGLA 126, TGLA 227, TGLA

53 is carried out. Calculated The level of homozygosity of four populations of dairy cattle by polymorphism of the nucleotide sequences of DNA is calculated.