

ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО МИКРОСАТЕЛЛИТАМ ДНК

О. А. Епишко, Т. И. Епишко¹, В. С. Слышенков
¹УО «Гродненский государственный аграрный университет»
УО «Гродненский государственный университет
им. Янки Купалы» г. Гродно,
Республика Беларусь

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.

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

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.

На базе УО «Полесский государственный университет» в научно-исследовательской лаборатории промышленной биотехнологии было проведено генетическое тестирование по 11 микросателлитным локусам нуклеотидных последовательностей ДНК: BM1824, BM 2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53.

В качестве объекта исследований использовали крупный рогатый скот черно-пестрой породы, разводимый в хозяйствах: КСУП «Племенной 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 «NanoDrop 1000».

Реакционная смесь для проведения мультиплексной реакции готовилась в объеме 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 *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 «ABI Prism 31302», руководствуясь протоколом.

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

Были рассчитаны популяционно-генетические характеристики.

Важным параметром динамики генетической изменчивости состава популяций является гетерозиготность. Гетерозиготность, присущее всякому гибриднему 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.

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

В результате генотипирования популяций животных СПК «Першаи-2003», ОАО «1-я Минская птице фабрика», КСУП «Племенной завод «Красная звезда» и СПК «Агрокомбинат Снов» по изучаемым локусам был проведен популяционно-генетический анализ исследуемых популяций крупного рогатого скота. В частности, определено количество аллелей на локус (N), ожидаемая гетерозиготность по каждому локусу, средняя ожидаемая гетерозиготность на локус ($h_{\text{т}} \text{ ср}$), наблюдаемая гетерозиготность, средняя наблюдаемая гетерозиготность ($H_{\text{обс}} \text{ ср}$).

В ходе анализа популяции животных, разводимых в СПК “Першаи-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 птице фабрика», 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.

Установлено, что популяция животных ОАО «1-я Минская птицефабрика» отличалась более высокой гетерозиготностью (91 %) в сравнении с популяцией СПК «Першаи-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».

В группе исследованных животных КСУП «Племенной завод «Красная звезда» наибольшее количество аллелей наблюдалось 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.

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.

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

Таким образом, в исследованных популяциях обнаружен высокий «запас» генетического разнообразия 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.