

Некоторые аспекты применения микросателлитных маркёров в сельскохозяйственной практике*

*К.П. Гайнуллина, к.б.н.,
Башкирский НИИСХ УФИЦ РАН*

В последние годы современные молекулярно-генетические методы получают всё более широкое распространение в сельском хозяйстве [1, 2]. Так, благодаря внедрению мультилокусных маркёров появилась возможность проведения отбора желательных генотипов на ранних этапах селекционного процесса, картирования генов хозяйственно ценных признаков, индивидуальной, сортовой и породной идентификации, установления родства, что способствует решению проблем снижения генетического разнообразия, устойчивости организмов к болезням и вредителям, ускорения селекции пород и сортов [3, 4].

Среди высокополиморфных кодоминантных генетических маркёров в растениеводстве с большим успехом применяются микросателлиты. С их помощью может осуществляться эффективный подбор родительских пар при скрещиваниях, генетическая паспортизация сортов для защиты авторских прав селекционеров, контроль генетической чистоты и однородности семенного материала [5].

В области продуктивного молочного и мясного скотоводства остро стоит проблема идентификации, паспортизации животных, а также поиска генетических маркёров для решения широкого круга селекционных задач, включая определение степени гомозиготности, генетического родства по отцовской и материнской линии, оценку уровня внутривидовой генеалогической дифференциации, а также прогнозирование работоспособности и плодовитости [6]. Согласно базе данных INRA (French National Institute for Agricultural research) у крупного рогатого скота выявлено 2402 микросателлитных маркёра, из которых 2244 картированы [7, 10]. Тем не менее генетическая структура многих отечественных пород крупного рогатого скота в России по-прежнему остаётся недостаточно изученной [8]. Основными плановыми породами крупного рогатого скота молочного направления разведения в Республике Башкортостан являются чёрно-пёстрая (61% от общего поголовья), симментальская (25%) и бестужевская (14%), отличающиеся высокой и стабильной молочной продуктивностью, выносливостью, адаптационной пластичностью, неприхотливостью к кормам, а также хорошей оплатой корма и приростом.

В связи с вышеизложенным применение микросателлитов в исследованиях отечественных пород крупного рогатого скота является актуальным, поскольку позволяет выявлять своеобразные чер-

ты их генофонда, генетической структуры пород и популяций, определять степень инбредности, генетическое расстояние между семействами, линиями, породами [9].

Цель исследования заключается в изучении генетического разнообразия чёрно-пёстрой, симментальской и бестужевской пород крупного рогатого скота с помощью микросателлитных маркёров.

Вышеозначенная цель предопределила необходимость решения следующих задач:

1. Исследовать полиморфизм шести микросателлитных локусов ДНК основных пород крупного рогатого скота молочного направления разведения;
2. Выявить дифференциацию изученных пород на основе ДНК-типирования;
3. Отобрать потенциально информативные микросателлитные маркёры для чёрно-пёстрой, симментальской и бестужевской пород крупного рогатого скота.

Материал и методы исследования. Опыты проводили в лаборатории молекулярно-генетической экспертизы Башкирского НИИСХ УФИЦ РАН.

Объектом изучения послужили животные, принадлежащие трём основным породам крупного рогатого скота молочного направления разведения в Республике Башкортостан: чёрно-пёстрой (ООО «Агрофирма им. Цюрупы», $n=50$), симментальской (СПК им. Кирова, $n=50$) и бестужевской (СПК им. Иванова, $n=50$). В качестве исследуемого биологического материала в работе использовали образцы периферической венозной крови, в качестве антикоагулянта применяли 5-процентный раствор цитрата натрия. ДНК выделяли с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas»).

Для исследования были отобраны шесть микросателлитных локусов, рекомендованных Международным обществом генетики животных (International Society for Animal Genetics – ISAG) для контроля достоверности происхождения крупного рогатого скота. Их характеристика приведена в таблице 1.

Полимеразная цепная реакция проводилась в амплификаторе ДТ-322 (ДНК-Технология). Использовали праймеры, синтезированные фирмой «Евроген». Реакционная смесь объёмом 20 мкл содержала следующие компоненты: 7,5 мкл PCR Master Mix (Fermentas), 7,5 мкл H_2O , 2 мкл каждого из праймеров, 1 мкл тотальной геномной ДНК. Условия амплификации были следующими: начальная денатурация 5 мин. при $94^{\circ}C$; 35 циклов: денатурация при $94^{\circ}C$ – 30 с., отжиг праймеров при $55^{\circ}C$ – 30 с. и элонгация при $72^{\circ}C$ – 90 с.; заключительная элонгация 10 мин. при $72^{\circ}C$.

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Республики Башкортостан молодым учёным и молодёжным научным коллективам в 2018 г. (Постановление Правительства Республики Башкортостан от 7 февраля 2018 г. № 56)

1. Характеристика микросателлитов, использованных для генетической оценки крупного рогатого скота

Локус	Хромосома	Длина аллелей, п.н.	Максимальное число аллелей	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'→3')
BM1824	1-я	179 – 191	7	cattctccaactctctcctc caccaacctctttccaatc
BM2113	2-я	122 – 142	10	ctctcctctaccaaatacc cttctcacacaaccaacacc
SPS115	15-я	244 – 257	6	aaactcacacaacacctctccac aaccactctctacttctcctctc
TGLA122	21-я	138 – 182	17	aatcacatcccaataactacatac ccctctccacctaaatcacc
ETH10	5-я	211 – 223	7	cttcaccactccccctctaaca cctccacccacttctctctc
ETH225	9-я	139 – 153	8	catcaccttcccactatttct acatcacaccacactctact

Примечание: п.н. – пар нуклеотидов

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 7-процентном полиакриламидном геле с трис-боратным электродным буфером в вертикальной камере VE-20 (Хеликон).

Результаты исследования. При анализе полиморфизма микросателлитных локусов исследуемых пород крупного рогатого скота суммарно было выявлено 47 различных аллельных вариантов. Амплифицированные аллели микросателлитных локусов чётко визуализировались в полиакриламидном геле (рис.). Количество полученных аллелей для крупного рогатого скота чёрно-пёстрой породы составило 41, или в среднем 6,83 аллеля на локус, бестужевской породы – 37, или 6,17 аллеля на локус, симментальской породы – 34, или 5,67 аллеля на локус.

Для каждой из исследованных пород нами были рассчитаны наблюдаемая гетерозиготность (H_o) и индекс полиморфизма (PIC). Наблюдаемая гетерозиготность определялась как отношение числа гетерозигот к размеру выборки, индекс полиморфизма – по формуле:

$$PIC_j = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2,$$

где i – i -й аллель j -го маркера;

n – количество аллелей j -го маркера;

P – частота аллелей.

Полученные результаты представлены в таблице 2.

Как видно по данным таблицы, у крупного рогатого скота чёрно-пёстрой породы средняя гетерозиготность была равна 0,97, у бестужевской породы – 0,95, у симментальской породы – 1, что находится в соответствии с данными о численности данных пород в республике: чем больше поголовье, тем меньше вероятность инбридинга и выше гетерогенность.

Индекс полиморфизма в нашем опыте у крупного рогатого скота чёрно-пёстрой породы варьировал от 0,73 (BM1824) до 0,79 (TGLA122, ETH225, ETH10), что в среднем составляло 0,77. У бестужевской породы данный показатель колебался

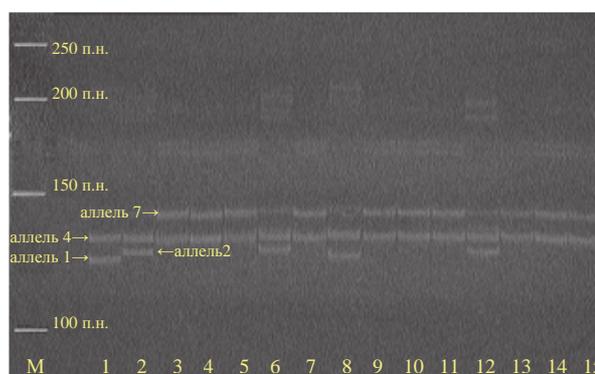


Рис. – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК крупного рогатого скота чёрно-пёстрой породы по локусу BM2113 в полиакриламидном геле: М – маркер молекулярной массы GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas; дорожки 1–15 – образцы ДНК исследованных животных

в пределах от 0,66 (ETH225) до 0,82 (TGLA122), в среднем составляя 0,72, у симментальской породы – от 0,75 (ETH10) до 0,84 (BM2113), в среднем – 0,78. В соответствии с классификацией Botstein et al. (1990), к высокоинформативным маркерам относятся такие маркеры, у которых $PIC \geq 0,5$, к среднеинформативным – имеющие PIC от 0,25 до 0,5, к малоинформативным – с $PIC \leq 0,25$ [10]. Следовательно, все использованные нами в исследовании микросателлиты оказались высокоинформативными.

Сравнительная характеристика распределения частот аллелей локуса SPS115 среди исследованных нами пород крупного рогатого скота показала, что у чёрно-пёстрой породы преобладают аллели 1 и 3 (38 и 23% соответственно), у бестужевской – 3 и 1 (36 и 29% соответственно), в то время как у симментальской породы наблюдалось более-менее равномерное распределение всех аллелей, кроме аллеля 6, который отсутствовал в генотипах животных данной породы.

При проведении анализа распределения частот аллелей по локусу BM2113 было выявлено,

2. Число аллелей на локус (Na), наблюдаемая гетерозиготность (H_o) и индекс полиморфизма (PIC) в популяциях крупного рогатого скота чёрно-пёстрой, симментальской и бестужевской пород в Республике Башкортостан

Локус	Na			H _o			PIC		
	ЧП	С	Б	ЧП	С	Б	ЧП	С	Б
BM2113	7	7	7	1	1	0,72	0,76	0,84	0,68
TGLA122	5	6	7	0,98	1	1	0,79	0,81	0,82
ETH225	8	6	6	0,96	1	1	0,79	0,76	0,66
BM1824	7	5	5	1	1	1	0,73	0,76	0,70
ETH10	8	5	6	1	1	1	0,79	0,75	0,71
SPS115	6	5	6	0,88	1	1	0,75	0,79	0,75
Среднее	6,83	5,67	6,17	0,97	1	0,95	0,77	0,78	0,72

Примечание: ЧП – чёрно-пёстрая порода; С – симментальская порода; Б – бестужевская порода

что у чёрно-пёстрой породы крупного рогатого скота преобладает аллель 4 (40%), а аллели 8 и 9 отсутствуют. Для симментальской породы было характерно отсутствие аллелей 2, 3. В генотипах животных бестужевской породы наиболее часто встречались аллели 4 и 7 (47 и 26% соответственно), а аллели 6 и 9 не были обнаружены.

По локусу ETH225 у чёрно-пёстрой породы крупного рогатого скота чаще встречались аллели 2, 4, 1 и 6–28; 28; 17 и 15% соответственно. Симментальская порода отличалась преобладанием аллелей 4, 1 и 2 (32; 29 и 18% соответственно), и отсутствием аллеля 7. По данному локусу у бестужевской породы отмечались высокие значения частот встречаемости аллелей 4 и 7 (44 и 36% соответственно), а аллель 1 при проведении SSR-анализа у данной породы выявлен не был.

На основе полученных нами данных о распределении аллелей по локусу TGLA122 можно сделать вывод о том, что у исследованных животных чёрно-пёстрой породы аллели 2, 1, 3, 4, 5 характеризовались близкими по значению частотами (22, 21, 21, 19, 17% соответственно), а аллели 6, 7, 8 отсутствовали. У симментальской породы не был обнаружен аллель 3, а остальные аллели встречались в генотипах данной породы с приблизительно одинаковой частотой. Отличительной особенностью бестужевской породы оказалась относительно высокая частота встречаемости аллелей 1, 3, 4, 2, 5 (24, 20, 18, 16, 12% соответственно) и отсутствие аллеля 7.

В нашем опыте для чёрно-пёстрой породы крупного рогатого скота была характерна высокая частота встречаемости аллеля 3 микросателлитного локуса BM1824 (41%). У животных симментальской породы достаточно высокие значения процентного соотношения были установлены для аллелей 4 и 5–31 и 30% соответственно. Аллели 6 и 7 у данной породы не были обнаружены. Отличительной особенностью бестужевской породы по данному локусу является высокая частота встречаемости аллелей 1 и 4 (42 и 32% соответственно) и отсутствие аллеля 7.

Наше исследование показало, что у чёрно-пёстрой породы по локусу ETH10 была отмечена относительно высокая частота встречаемости аллелей 3, 5, 7, 1 и 6 (34, 21, 21, 16 и 14% соответственно),

а аллель 3 не был обнаружен. Симментальская порода характеризовалась высокими значениями частот аллелей 3 и 5 (36 и 27% соответственно), и отсутствием аллелей 2 и 4. В генотипах животных бестужевской породы преобладал аллель 3 (46%).

Выводы.

1. В результате SSR-анализа образцов ДНК крупного рогатого скота чёрно-пёстрой, симментальской и бестужевской пород получены данные по аллельным состояниям исследованных микросателлитных локусов, которые являются основой для расчёта уровня внутривидовой изменчивости, а также определения породной и индивидуальной принадлежности животных.

2. Установлено наличие выраженной генетической дифференциации исследованных пород.

3. Наибольшей информативностью обладали микросателлитные маркёры TGLA122 и SPS115.

Литература

1. Глазко В.И. Молекулярная биология для животноводства // Farm Animals. 2012. № 1 (1). С. 24–29.
2. Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П. Изучение полиморфизма микросателлитных локусов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2013. № 2 (26). С. 10.
3. Гайнуллина К.П. Генетическое разнообразие исходного материала для селекции гороха (*Pisum sativum* L.) в условиях Предуральской степи Башкортостана: дисс. ... канд. биол. наук. СПб., 2013.
4. Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П. Влияние метеорологических условий на результаты гибридизации // Аграрный вестник Урала. 2011. № 4. С. 5–6.
5. Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П., Ахмадуллина И.И. Комплексная оценка нового сорта гороха Юлаш и его родительских форм с применением современных молекулярно-генетических методов // Зерновое хозяйство России. 2017. № 4 (52). С. 24–26.
6. Шириев В.М., Уразбахтин Р.Ф., Гайнуллина К.П. Исследование полиморфизма микросателлитной ДНК у лошадей башкирской породы // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. 2014. № 5. С. 13–15.
7. Киселёва Т.Ю. Анализ 30 микросателлитных маркёров у шести локальных популяций крупного рогатого скота / Т.Ю. Киселёва, Б.Е. Подоба, Е.Е. Заблудовский [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2010. № 6. С. 20–25.
8. Зиновьева Н.А. Изучение генетического разнообразия и популяционной структуры российских пород крупного рогатого скота с использованием полногеномного анализа SNP / Н.А. Зиновьева, А.В. Доцев, А.А. Сермягин [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. № 6. С. 788–800.
9. Шумкина С.Г. Полиморфизм микросателлитных локусов ДНК крупного рогатого скота красно-пёстрой породы: дисс. ... канд. биол. наук. П. Лесные поляны (Моск. обл.), 2004. 105 с.
10. Botstein D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // American Journal of Human Genetics. 1980. Vol. 32. № 3. P. 314–331.