

УДК 636.082.11:636.22/.28.082.13

Характеристика генетической структуры стада герефордской породы по STR-локусам**О.М. Шевелёва, М.А. Часовщикова***ФГБОУ ВО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья»*

Аннотация. В статье представлена характеристика генетической структуры стада герефордской породы по 15 STR-локусам нуклеотидных последовательностей ДНК. Материалом для исследования послужили ткани уха 30 тёлочек из ООО «Бизон» Тюменской области. Набор маркеров для анализа включал 15 микросателлитов – BM 1818, BM 1824, BM 2113, CSRM 60, CSSM 66, ETH 3, ETH 10, ETH 225, ILST 006, INRA 023, SPS 115, TGLA 53, TGLA 122, TGLA 126, TGLA 227. Для достижения поставленной цели были определены частоты встречаемости аллелей, уровень полиморфности, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, индекс фиксации Райта. В результате исследования установлено, что 15 микросателлитных локусов включали в себя 104 аллеля, частоты которых колебались в диапазоне от 0,017 до 0,683. Среднее число информативных аллелей на локус составляло 6,93, эффективных аллелей – 4,96 или 71,6 %. Увеличение числа аллелей в локусе сопровождалось повышением уровня полиморфности, что подтверждает положительный коэффициент корреляции, величина которого составляла 0,794 ($p < 0,001$). Наибольшим уровнем полиморфности характеризовался локус TGLA 53 с числом эффективных аллелей, равным 10,0, а наименьшим – локус TGLA 126 с числом эффективных аллелей 2,3. Анализ генетического разнообразия показал, что наибольшая наблюдаемая гетерозиготность была в локусе TGLA 53 – 0,950, а наибольшая ожидаемая в локусе CSSM 66 – 0,860. Средний уровень наблюдаемой гетерозиготности составлял 0,783, ожидаемой – 0,691, индекс фиксации Райта имел величину, равную минус 0,133, что указывает на высокий уровень генетического разнообразия стада герефордского скота.

Ключевые слова: тёлки, герефордская порода, микросателлиты, полиморфизм, локус, аллель, гетерозиготность.

Введение.

Крупный рогатый скот герефордской породы в Тюменской области разводят с 1996 года, современная популяция животных этой породы формировалась из племенного поголовья, завезённого из племенных заводов Западной Сибири – Новосибирская, Омская области и Алтайский край. В 2012 году с целью обновления генофонда чистопородных стад на территорию области были завезены герефорды из Швеции [1]. На сегодня герефордская порода – самая многочисленная среди всех пород мясного направления продуктивности в области, составляет 55 % или 7789 голов от всего поголовья мясного скота.

Селекционно-племенная работа с породой ведётся посредством отбора и подбора по фенотипическим признакам с учётом родословной. Но как известно, это длительный путь к достижению высоких результатов в селекции. До недавнего времени в практике животноводства области не было доступно использование современных ДНК-технологий, например, таких как геномная оценка. Хотя в практике молочного скотоводства области есть опыт использования результатов ДНК-диагностики генов, ассоциированных с молочной продуктивностью и наследственными заболеваниями [2]. В настоящее время в Тюменской области работает молекулярно-генетическая лаборатория, созданная на базе Государственного аграрного университета Северного Зауралья, которая осуществляет микросателлитный анализ ДНК сельскохозяйственных животных.

Введение в практику высокопроизводительных методов микросателлитного типирования позволит на молекулярном уровне оценить генетическое разнообразие пород, популяций и использовать эту информацию для повышения эффективности геномной селекции, в задачу которой входит использование взаимосвязей между фенотипом и генотипом [3-5]. Микросателлиты являются ДНК-маркерами, которые используют для тестирования отцовства и верификации родословной

скота, а также анализа связи с хозяйственно-полезными признаками и генетическими заболеваниями [6, 7]. Популярность микросателлитных маркеров объясняется их равномерным распределением в геноме, высоким полиморфизмом, кодоминантным наследованием по менделевскому типу, высокой воспроизводимостью результатов [8]. Несмотря на то, что метод микросателлитного анализа общепринят как для индивидуальной, так и для популяционной паспортизации животных, отечественные породы крупного рогатого скота практически не идентифицированы по микросателлитным локусам [9, 10], хотя такая работа уже успешно началась и проводится в разных регионах России, в том числе и Тюменской области [8, 11, 12].

Цель исследования.

Охарактеризовать генетическую структуру стада герефордской породы по STR-локусам нуклеотидных последовательностей ДНК.

Материалы и методы исследования.

Объект исследования. Тёлки герефордской породы.

Обслуживание животных и экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с инструкциями Russian Regulations, 1987 (Order No. 755 on 12.08.1997 the USSR Ministry of Health) and «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D. C. 1996)». При выполнении исследований были предприняты усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшения количества используемых образцов.

Схема эксперимента. Исследования микросателлитных STR-локусов проведены в 2017 году в ООО «Бизон» Тюменской области. Материалом для исследования являлись пробы ткани уха животных ($n=30$).

Проводились выделения геномной ДНК с помощью набора реагентов для выделения ДНК, анализ ДНК и постановка ПЦР согласно «Методических рекомендаций по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве» [13]. Идентификация фрагментов проводилась методом ПЦР-анализа микросателлитных локусов с последующей детекцией флюоресцентно меченых фрагментов методом капиллярного электрофореза с помощью генетического анализатора. Набор маркеров для анализа включал 15 микросателлитов – BM 1818, BM 1824, BM 2113, CSRM 60, CSSM 66, ETH 3, ETH 10, ETH 225, ILST 006, INRA 023, SPS 115, TGLA 53, TGLA 122, TGLA 126, TGLA 227.

В ходе проведения исследований рассчитаны следующие показатели: частота встречаемости аллелей (p) [14], число эффективных аллелей или уровень полиморфности (A_e) [14], наблюдаемая гетерозиготность (H_o) [15], ожидаемая гетерозиготность (H_e) [15], индекс фиксации Райта (F_{is}) [15].

Оборудование и технические средства. Выделение геномной ДНК проводилось с помощью набора реагентов для выделения ДНК DIAAtom™ DNA Prep100 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Для амплификации использован амплификатор ProFlex™96-Well PCR System («ThermoFisher Scientific», США). Идентификация фрагментов проводилась методом ПЦР-анализа микросателлитных локусов с последующей детекцией флюоресцентно меченых фрагментов методом капиллярного электрофореза с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Thermo Fisher («Applied Biosystems», США) в молекулярно-генетической лаборатории Государственного аграрного университета Северного Зауралья (г. Тюмень).

Статистическая обработка. Полученный цифровой материал обработан методами вариационной статистики с помощью офисного программного комплекса «Microsoft Office» с применением программы «Excel» («Microsoft», США).

Результаты исследований.

Исследования показали, что в 15 микросателлитных локусах у тёлочек герефордской породы суммарно обнаружено 104 аллеля, диапазон размеров которых варьировал от 79 до 300 бп. При этом в изучаемых STR-локусах идентифицировано от 4,0 до 11,0 аллелей. Среднее число аллелей на локус составляло 6,93. Наиболее информативными из 15 микросателлитных локусов для исследуемого стада являлись локусы с наибольшим числом аллелей от 9 до 11 – это TGLA 122, TGLA 227, TGLA 53, CSSM 66 и наименее информативными, с минимальным от 4 до 6 – это BM 1824, INRA 023, TGLA 126, BM 1818, CSRM 60, ETH 3, ETH 225 локусы. Анализ частот встречаемости аллелей показал варьирование в диапазоне от 0,017 до 0,683 (табл. 1).

Таблица 1. Частоты аллелей 15 микросателлитов, р

Локус	Аллель	Частота	Локус	Аллель	Частота
BM 2113	260	0,083	ILST 006	286	0,017
	262	0,233		288	0,383
	264	0,050		292	0,217
	266	0,583		294	0,250
	268	0,033		296	0,083
	270	0,017		298	0,033
	178	0,167		300	0,017
CSRM 60	180	0,067	INRA 023	206	0,117
	182	0,667		208	0,150
	188	0,100		214	0,683
	125	0,067		216	0,050
CSSM 66	127	0,017	SPS 115	246	0,017
	131	0,100		248	0,350
	133	0,117		252	0,083
	135	0,100		254	0,050
	137	0,050		256	0,183
	139	0,417		258	0,017
	141	0,133		260	0,300
	92	0,033	TGLA 53	154	0,033
	96	0,083		160	0,200
	98	0,117		162	0,233
	100	0,067		164	0,067
	102	0,667		168	0,067
	104	0,033		170	0,133
	179	0,017		172	0,200
	181	0,033		176	0,033
	183	0,067		184	0,017
	185	0,217		186	0,017
	187	0,167	TGLA 122	141	0,167
	189	0,167		143	0,383
	191	0,033		147	0,017
	193	0,150		151	0,250
	195	0,050		153	0,017
	197	0,067		159	0,017
	199	0,033		161	0,033

Продолжение 1 таблицы

1	2	3	4	5	6
ETH 3	115	0,017		167	0,017
	117	0,517		183	0,100
	119	0,350	TGLA 227	79	0,017
	121	0,017		81	0,083
	125	0,033		83	0,067
	127	0,067		87	0,050
ETH 10	211	0,017		89	0,267
	213	0,017		91	0,283
	215	0,083		93	0,150
	217	0,233		97	0,067
	219	0,200		103	0,017
	221	0,433	ETH 225	140	0,267
TGLA 126	225	0,017		144	0,117
	115	0,433		146	0,167
	117	0,417		148	0,217
	121	0,033		150	0,217
	123	0,117		152	0,017

Наибольшая частота встречаемости от 0,517 до 0,683 была характерна для пяти аллелей из пяти разных локусов – 117 (ETH 3), 266 (BM 1818), 182 (BM 1824), 102 (CSRM 60), 214 (INRA 023), а наименьшая – 0,017 для 21 аллеля из 11 локусов – 270 (BM 1818), 127 (BM 2113), 179 (CSSM 66), 115, 121 (ETH 3), 211, 213 и 225 (ETH 10), 152 (ETH 225), 286 и 300 (ILST 006), 246, 258 (SPS 115), 184 и 186 (TGLA 53), 147, 153, 159 и 167 (TGLA 122) и 79, 103 (TGLA 227).

Для оценки уровня полиморфности рассчитали число эффективных аллелей. Известно, что чем меньше число эффективных или активно действующих аллелей, тем ниже генетическое разнообразие популяции. Расчёты показали, что число активно действующих аллелей колебалось от 2,3 в локусе TGLA 126 до 10,0 в локусе TGLA 53. Средний показатель уровня полиморфности анализируемых STR-локусов составил 4,96 (табл. 2). У анализируемых нами подконтрольных животных из 15 идентифицированных STR-локусов пять имели количество аллелей больше среднего уровня полиморфности и оставшиеся 10 – меньше, от 2,3 до 4,7 аллелей. В целом между общим числом аллелей в локусе и числом эффективных аллелей была установлена высокая положительная корреляционная зависимость с коэффициентом корреляции, равным 0,794 ($p < 0,001$), из чего следует, что чем больше аллелей в локусе, тем выше уровень полиморфности и генетическое разнообразие стада.

Таблица 2. Характеристика полиморфизма STR-локусных микросателлитов

Локус	Аллели	Число аллелей на локус	Число эффективных аллелей на локус (A_e)
BM 1818	260-270	6,0	4,5
BM 1824	178-188	4,0	3,0
BM 2113	127-141	8,0	3,6
CSRM 60	92-104	6,0	4,5
CSSM 66	179-199	11,0	6,3
ETH 3	115-127	6,0	4,5
ETH 10	211-225	7,0	5,0
ETH 225	140-152	6,0	4,7
ILST 006	286-300	7,0	4,3
INRA 023	206-216	4,0	3,5
SPS 115	246-260	7,0	3,5
TGLA 53	154-186	10,0	10,0
TGLA 122	141-183	9,0	8,0
TGLA 126	115-123	4,0	2,3
TGLA 227	79-103	9,0	6,7
$\bar{x}$	-	6,93	4,96
$S_{\bar{x}}$	-	0,52	0,49

Степень наблюдаемой гетерозиготности является показателем генетической изменчивости в популяции, это связано с тем, что гетерозиготы несут разные аллели. Наравне с наблюдаемой гетерозиготностью оценивается показатель ожидаемой гетерозиготности, который точнее характеризует разнообразие исследуемой популяции. Наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность локусных микросателлитов у тёлочек герефордской породы представлены в таблице 3.

Таблица 3. Гетерозиготность локусных микросателлитов

Локус	Наблюдаемая гетерозиготность (H _o)	Ожидаемая гетерозиготность (H _e)	Индекс фиксации (F _{is})
BM 1818	0,750	0,595	-0,261
BM 1824	0,667	0,513	-0,301
BM 2113	0,688	0,767	0,104
CSRM 60	0,778	0,528	-0,474
CSSM 66	0,864	0,860	-0,051
ETH 3	0,778	0,604	-0,288
ETH 10	0,800	0,710	-0,126
ETH 225	0,909	0,793	-0,147
ILST 006	0,750	0,735	-0,020
INRA 023	0,714	0,495	-0,443
SPS 115	0,769	0,744	-0,034
TGLA 53	0,950	0,836	-0,136
TGLA 122	0,923	0,751	-0,230
TGLA 126	0,571	0,624	0,085
TGLA 227	0,833	0,807	-0,032
$\bar{H}$	0,783	0,691	-0,133
$S_{\bar{H}}$	0,026	0,031	-

Наибольшим уровнем наблюдаемой гетерозиготности характеризовались локусы TGLA 53 – 0,950, TGLA 122 – 0,923 и ETH 225 – 0,909, наименьшим локус TGLA 126 – 0,571. В свою очередь наибольшей ожидаемой гетерозиготностью обладали локусы CSSM 66 – 0,860, TGLA 53 – 0,836 и TGLA 227 – 0,807, а наименьшей локус INRA 023 – 0,495. Средний показатель наблюдаемой гетерозиготности составлял 0,783, а ожидаемой был меньше и составлял 0,691.

Для установления отклонения гетерозиготных генотипов от теоретически ожидаемой использовали значение индекса фиксации Райта, который имел как положительные, так и отрицательные значения, в первом случае он показывал нехватку гетерозигот, во втором указывал на их избыток. Анализируя индекс фиксации, выяснили, что нехватка гетерозигот наблюдалась по локусам BM 2113 и TGLA 126, при этом величины индексов были не значительными по величине и составляли 0,104 и 0,085 соответственно. Избыток гетерозигот наблюдали по остальным тринадцати локусам, где индекс фиксации колебался в диапазоне от минус 0,474 по локусу CSRM 60 до минус 0,020 по локусу ILST 006. В среднем по 15 STR-локусам индекс фиксации составлял минус 0,133, что свидетельствовало об избытке гетерозигот.

Обсуждение полученных результатов.

Исследования микросателлитных локусов или STR-локусов – коротких tandemных повторов показывают, что для животных одной породы в разных стадах ДНК-профиль индивидуален. Так, например, по сведениям С.Д. Нурбаева [3], А.Т. Tyngoziyeva [16], в популяциях герефордов Республики Казахстан среднее количество аллелей в 11 локусах, которые анализировались и в нашей работе, составляло 11,8-12,2, при этом в одной из популяций только локус TGLA 122 сохранил 24 аллеля, а локус TGLA 227 – 15 аллелей. В исследуемом нами стаде герефордов эти ло-

кусы также были наиболее информативными, но содержали по 9 аллелей. А вот герефорды, завезённые в Республику Башкортостан из Австралии, по среднему числу информативных аллелей, а также по количеству аллелей в указанных выше локусах оказались более сходны с нашим поголовьем. Как указывают Т.А. Седых и соавторы [4], количество аллелей в локусах TGLA 122 и TGLA 227 у австралийских герефордов составляло 7,0 и 8,0 соответственно, а среднее число информативных аллелей на локус оказалось равным 6,0. В свою очередь по количеству аллелей в локусах ETH 10 и ETH 225 значительных различий между исследуемыми популяциями герефордов, в том числе и нашей, не наблюдали [3, 4, 16].

Средний уровень полиморфности анализируемых STR-локусов, являющийся показателем эффективно действующих аллелей в исследуемом нами стаде, составлял 4,96 аллелей, что согласуется с данными Е.А. Гладырь и других авторов [10], которые указывают на существование в популяции сибирских герефордов в среднем 4,66 эффективных аллелей.

Генетическое или аллельное разнообразие стада характеризуется уровнем ожидаемой гетерозиготности. Гетерозиготность играет значительную роль в адаптации животных, с ней связывают явление гетерозиса. Расчёт этого показателя в подконтрольном нам стаде указал на высокую гетерозиготность – более 0,691, по 9 из 15 локусов. При этом индекс фиксации Райта указывал на незначительный избыток гетерозигот в среднем по анализируемым STR-локусам, что свидетельствует о высоком уровне генетического разнообразия в исследуемом стаде герефордского скота.

Выводы.

Для герефордской породы было характерно наличие в 15 STR-локусах 104 аллелей, при этом на один локус приходилось от 4 до 11 аллелей. Среднее число информативных аллелей на локус составляло 6,93, при этом число эффективных аллелей – 4,96 или 71,6 %. Увеличение числа аллелей в локусе сопровождалось увеличением уровня полиморфности. Наибольшим уровнем полиморфности характеризовался локус TGLA 53 с числом эффективных аллелей, равным 10,0, а наименьшим – локус TGLA 126, содержащий в среднем 2,3 эффективных аллеля. Подконтрольное стадо характеризовалось высоким уровнем генетического разнообразия. Средний уровень наблюдаемой гетерозиготности составлял 0,783, ожидаемой гетерозиготности – 0,691, индекс фиксации Райта имел величину минус 0,133.

Литература

1. Бахарев А.А., Шевелёва О.М., Беседина Г.Н. Характеристика и история формирования мясного скотоводства Тюменской области // Мир Инноваций. 2017. №1. С. 65-69.
2. Relationship between the genetic variants of kappa-casein and prolactin and the productive-biological characteristics of cows of the black-motley breed / M.A. Chasovshchikova, O.M. Sheveleva, M.A. Svjazhenina et al. // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2017. № 7. V. 9. P. 1038-1044.
3. Характеристика генофонда крупного рогатого скота герефордской породы по микросателлитным ДНК / С.Д. Нурбаев, А.М. Омбаев, Т.Н. Карымсаков и др. // Современные проблемы сельскохозяйственных наук в мире: сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф. Казань, 2016. С. 33-36.
4. Полиморфизм микросателлитных локусов крупного рогатого скота герефордской породы различных эколого-генетических генераций / Т.А. Седых, Е.А. Гладырь, И.Ю. Долматова и др. // Вестник АПК Ставрополя. 2014. № 3. С. 121-128.
5. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges / B.J. Hayes, P.J. Bowman, A.J. Chamberlain et al. // Journal Dairy Sciences. 2009. № 2. P. 433-443.
6. Application of eighteen microsatellite markers in studies parentage testing and genetic diversity in Holstein cattles / R. Ashoory, C. Amirinia, A. Noshary et al. // International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences. 2015. № 4. P. 5823-5832.

7. Microsatellite DNA polymorphism and its usefulness for pedigree verification in Simmental cattle from Serbia / J. Stevanovic, Z. Stanimirovic, V. Dimitrijevic et al. // *Acta Veterinaria (Beograd)*. 2009. № 5-6. V. 59. P. 621-631.
8. Генетическая характеристика красной горбатовской и суксунской пород крупного рогатого скота по микросателлитным маркерам / В.В. Волкова, Т.Е. Денискова, О.С. Романенкова и др. // *Молочное и мясное скотоводство*. 2017. № 6. С. 6-8.
9. Оценка результативности тест-системы на основе микросателлитов в проведении ДНК-экспертизы крупного рогатого скота / Е.А. Гладырь, П.В. Горелов, В.Н. Маурчева и др. // *Молочное и мясное скотоводство*. 2011. № 8. С. 51-54.
10. Изучение изменчивости микросателлитов при создании нового типа мясного скота Сибири / Е.А. Гладырь, Г.М. Гончаренко, П.В. Горелов и др. // *Достижения науки и техники АПК*. 2011. № 10. С. 30-32.
11. Polymorphism of Cattle Microsatellite Complexes / A.V. Garkovenko, V.V. Radchenko, E.V. Ilitskaya et al. // *Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 2018. V. 10. P. 1545-1551.
12. Characterization of the Russian breed cattle breed gene pools using inter simple sequence repeat DNA analysis (ISSR analysis) / G.E. Sulimova, V.N. Voronkova, A.V. Perchun et al. // *Russian Journal of Genetics*. 2016. № 52. P. 963-968.
13. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве / Н.А. Зиновьева, А.Н. Попов, Л.К. Эрнст и др. Дубровицы: ВИЖ, 1998. 47 с.
14. Меркурьева Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве: учеб. пособие. М.: Колос, 1977. 174 с.
15. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир, 1988. Т. 3. 336 с.
16. Tyngoziyeva A.T., Karymsakov T.N., Nurbaev S.D. Genetic structure of populations of uazakh whiteheaded and Hereford cattles on the basis of microsatellite DNA // *OnLine Journal of Biological Sciences*. 2017. № 17. P. 359-362.

Шевелёва Ольга Михайловна, доктор сельскохозяйственных наук, заведующий кафедрой технологии производства и переработки продукции животноводства ФГБОУ ВО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья», 625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7, тел.: 83452290391, e-mail: shevelevaom@gausz.ru

Часовщикова Марина Александровна, доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры технологии производства и переработки продукции животноводства ФГБОУ ВО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья», 625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7, тел.: 83452290391, e-mail: chsovschikovama@gausz.ru

Поступила в редакцию 26 ноября 2018 года

UDC 636.082.11:636.22/.28.082.13

Shevelyova Olga Mikhailovna, Chasovshchikova Marina Aleksandrovna

FSBEI HE «State Agrarian University of Northern Zauralye», e-mail: shevelevaom@gausz.ru

Characteristics of the genetic structure of the Herford herd according to STR loci

Summary. The article presents the characteristic of the genetic structure of the Herford breed herd at 15 STR-loci of nucleotide DNA sequences. The material for the study was the ear tissue of 30 calves from LLC «Bizon» of the Tyumen region. The set of markers for analysis included 15 microsatellites – BM 1818, BM 1824, BM 2113, CSRM 60, CSSM 66, ETH 3, ETH 10, ETH 225, ILST 006, INRA 023, SPS 115, TGLA 53, TGLA 122, TGLA 126, TGLA 227. To achieve this goal, the frequencies of allele occurrence, polymorphism level, observed and expected heterozygosity, Wright fixation index were determined. The survey found that 15 mic-

rosatellite loci included 104 alleles, whose frequencies ranged from 0.017 to 0.683. The average number of informative alleles per locus was 6.93, effective alleles – 4.96 or 71.6 %. The increase in the number of alleles in the locus was accompanied by an increase in the level of polymorphism, which confirms a positive correlation coefficient, the value of which was 0.794 ($p < 0.001$). The highest level of polymorphism was characterized by the TGLA 53 locus with the number of effective alleles equal to 10.0, and the smallest – the TGLA 126 locus with the number of effective alleles 2.3. Analysis of genetic diversity showed that the greatest observed heterozygosity was observed in the TGLA 53 locus – 0.950, and the greatest expected in the CSSM 66 locus – 0.860. The average level of observed heterozygosity was 0.783, the expected level was 0.691, the Wright fixation index had a value of minus 0.133, which indicates a high level of genetic diversity of the Herford herd.

Key words: heifers, Hereford breed, microsatellites, polymorphism, locus, allele, heterozygosity.