



*Микросателлитные
локусы, аллели,
одомашниваемые лоси,
поголовье*

*Microsatellite loci, alleles,
elks under domestication,
population*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОГОЛОВЬЯ ОДОМАШНИВАЕМЫХ ЛОСЕЙ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТАМ ДНК

Н.С. Марзанов

д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории
генетики сельскохозяйственных животных

ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», п. Дубровицы

О.Н. Ситникова (фото)

старший научный сотрудник отдела инновационных
разработок в животноводстве

ФГБНУ «Костромской научно-исследовательский институт
сельского хозяйства», с. Минское

С появлением иммунологических и биохимических маркеров был сделан настоящий прорыв в исследованиях популяционной генетики. Использование биохимических маркеров в популяционной генетике позволило выявить гигантскую наследственную изменчивость и дать оценку основным популяционно-генетическим параметрам около 2000 видов животных, растений и микроорганизмов, а также человека [1]. В результате было установлено, что до трети локусов эукариотического генома представлены аллельными вариантами, а средняя гетерозиготность на одну особь может достигать 12% и более. Эта изменчивость поддерживается мутациями, миграцией, случайным генетическим дрейфом и отбором [2].

В последние годы широкое распространение получили методы одновременного генотипирования на ДНК-матрице одного животного полиморфизма нескольких десятков участков ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов (Inter-Simple Sequence Repeat – ISSR-PCR). Именно микросателлиты составляют значительную группу генетических маркеров, удобных для целого ряда исследований, таких как характеристика генетической структуры популяций и степени инбредности, оценка генетических расстояний между семействами, линиями, породами и видами животных, филогенетических исследований [3, 4].

Применение микросателлитных маркеров даёт возможность определять корреляцию между хозяйственно-полезными признаками и определяющими их генетическими структурами, проводить отбор животных с желательным генотипом в любом возрасте [5, 6].

Цель работы заключалась в том, чтобы изучить полиморфизм шести микросателлитных локусов у поголовья одомашниваемых лосей и дать генетическую характеристику данному поголовью.

Методика

Исследования проводили в течение 2013–2017 гг. Материалом для исследований служили образцы луковиц шерсти от 24 различных половозрастных групп лосей, обитающих на территории ОГБУ ГПЗ «Сумароковский» (далее – Сумароковская лосеферма).

Генетическая характеристика поголовья одомашниваемых лосей была произведена на основе изучения полиморфизма в микросателлитных локусах ядерного ДНК. Выделение ДНК из луковицы волоса лосей проводили с помощью сорбентного метода, в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию выделенной ДНК и содержание белка в образцах измеряли на биофотометре Gene Quant (RNA/DNA calculator) фирмы Pharmacia Biotech (Швеция).

Проведение молекулярно-генетической характеристики поголовья лосей осуществляли на основе мультиплексного ПЦР-анализа 6-ти локусов, содержащих короткие tandemные повторы (STR). Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК методом капиллярного электрофореза проводили по методологии ООО «ГОРДИЗ» в модификации ООО «СИНТОЛ» (г. Москва).

При подготовке смеси продукта амплификации использовали флуоресцентно-меченые праймеры. Для генетической характеристики поголовья определяли среднее число, наблюдаемую (H) и ожидаемую (O) гетерозиготность и уровень гомозиготности (Ca) в каждом исследуемом локусе, коэффициент эксцесса (D). Тест гетерозиготности (Т.Г.) определяли путём сопоставления отношений между эмпирическими гетерозиготами и эмпирическими гомозиготами с аналогичным отношением, полученным по теоретическим данным. Степень реализации генетической изменчивости и нарушение генетического равновесия оценивали общепринятыми методами [7].

Результаты исследований

Исследования проводили по трём микросателлитным локусам лосей (BM6438; CSSM43; BM1225) и трём – крупного рогатого скота

(ETH225; TGLA53; CSRM60), адаптированные для данных исследований.

Для проведения генетической оценки поголовья одомашниваемых лосей был рассчитан уровень фактической и теоретической гетерозиготности, коэффициент эксцесса (D) по исследованным локусам микросателлитов у лосей. Коэффициент эксцесса (D) количественно оценивает нехватку или избыток фактической гетерозиготности у исследуемых популяций в сравнении с теоретически рассчитанным показателем.

Таким образом, был проведён сравнительный анализ фактической гетерозиготности по шести локусам микросателлитов (BM6438, CSSM43, BM1225, ETH225, TGLA53, CSRM60) с теоретически рассчитанной гетерозиготностью. Результаты представлены в таблице 1.

Установлено, что уровень фактической гетерозиготности (Ho) варьировал от 0,375 в локусе ETH225 до 0,985 в локусе BM1225, а показатель теоретически рассчитанный (He) составлял 0,457 и 0,744 соответственно. Наибольшее число аллелей было выявлено в локусах BM1225 (n = 8) и CSSM43 (n = 10), затем BM6438 и ETH225 (n = 5). Меньше всего аллелей оказалось также в двух локусах микросателлитов TGLA53 (n = 3) и CSRM60 (n = 3).

Сопоставление фактического и теоретического уровня гетерозиготности показало, что в трёх локусах микросателлитов (BM6438, CSRM60 и ETH225) у изучаемого поголовья лосей отмечался дефицит гетерозигот, что видно из данных по коэффициенту эксцесса (D). Он был наименьшим в локусе BM6438 (4,8%), затем в CSRM60 (8,4%) и очень высоким в локусе ETH225 (45%). Значительный избыток гетерозигот был выявлен в локусах CSSM43 (22,1%), TGLA53 (27,6%), BM1225

Таблица 1 – Число аллелей на локус, уровень фактической и теоретической гетерозиготности и коэффициент эксцесса (D) по исследованным локусам микросателлитов у лосей

Локусы микросателлитов	n	Число аллелей на локус	Уровень гетерозиготности		D
			фактический	теоретический	
BM6438	24	5	0,708	0,744	-0,048
CSSM43	24	10	0,917	0,751	0,221
BM1225	24	8	0,985	0,679	0,411
ETH225	24	5	0,375	0,683	-0,45
TGLA53	24	3	0,583	0,457	0,276
CSRM60	24	3	0,417	0,455	-0,084
В среднем	24	5,67	0,6642	0,6282	0,057

(41,1%). Превышение средней фактической гетерозиготности в сравнении с теоретической составило 3,6%. Среднее значение коэффициента эксцесса (D) по всем локусам микросателлитов оказалось равным 5,7%.

При анализе результатов по данному показателю было выявлено, что у исследованного поголовья одомашниваемых лосей преобладает правосторонний эксцесс (CSSM43, BM1225, TGLA53), который свидетельствует об избытке гетерозигот. Но из общего количества исследуемых микросателлитных локусов у трёх (BM6438, ETH225, CSRM60) отмечается левосторонний эксцесс.

Таким образом, присутствие микросателлитных локусов с левосторонним эксцессом и низкое среднее значение эксцесса по всем исследуемым локусам ($D \leq 0,057$) свидетельствует о дефиците гетерозигот по отдельным локусам в исследованном поголовье лосей. Данное явление показывает элиминацию гетерозиготных генотипов, что возможно связано с закрытостью поголовья, моногамностью семей и близкородственными связями животных в период гона.

Предельным значением показателя числа эффективных аллелей является величина, равная возможному числу действующих аллелей в локусе микросателлита. Как видно из полученных материалов (табл. 1), все показатели по данному

признаку у исследованных микросателлитных локусов меньше возможных чисел.

В таблице 2 представлен ряд генетических показателей, полученных в процессе проведённых исследований.

Для получения достоверной генетической оценки поголовья одомашниваемых лосей в работе был использован тест гетерозиготности (Т.Г.) по Робертсону, который был вычислен при сопоставлении отношения между эмпирическими гетерозиготами и эмпирическими гомозиготами с аналогичным отношением полученных данных с теоретическими. При анализе данных таблицы 2 было установлено, что по трём локусам получены отрицательные данные по тесту гетерозиготности (BM6438, -0,48; ETH225, -1,55; CSRM60, -0,121), что говорит о меньшем количестве доли фактических гетерозигот относительно доли теоретических гетерозигот. Что касается трёх других локусов микросателлитов (CSSM43, TGLA53 и BM1225), то по ним были получены положительные результаты (7,98; 0,6 и 20,88 соответственно), что свидетельствует об избытке доли фактических гетерозигот относительно доли теоретических гетерозигот.

Далее при проведении генетического анализа был вычислен коэффициент гомозиготности (Ca) по Робертсону. Он оказался наименьшим по следующим микросателлитным локусам BM6438

Таблица 2 – Показатели генетической структуры поголовья одомашниваемых лосей на Сумароковской лосеферме

Локус	n	Гт	Генетические показатели				
			число гетерозиготных генотипов	число гомозиготных генотипов	Т.Г.	Ca	% гомозиготности
BM6438	24	Н	17	7	-0,48	0,256	29,2
		О	17,86	6,14			
CSSM43	24	Н	22	2	7,98	0,233	8,3
		О	18,03	5,97			
ETH225	24	Н	9	15	-1,55	0,317	62,5
		О	16,38	7,62			
TGLA53	24	Н	14	10	0,6	0,543	41,7
		О	10,97	13,03			
BM1225	24	Н	23	1	0,88	0,322	4,2
		О	16,3	7,7			
CSRM60	24	Н	10	14	-0,121	0,545	58,3
		О	10,92	13,08			

Примечания: Гт – генотип; Н – наблюдаемое число генотипов; О – ожидаемое число генотипов; Т.Г. – тест гетерозиготности; Ca – коэффициент гомозиготности.

(0,256) и CSSM43 (0,233), средним – у ETH225 (0,317) и ETH225 (0,322). Наибольшее значение коэффициента гомозиготности имели два локуса микросателлитов TGLA53 (0,543) и CSRM60 (0,545).

Наибольший процент гомозиготности из шести исследованных локусов был установлен в ETH225 (62,5%), CSRM60 (58,3%) и TGLA53 (41,7%). Средний показатель был выявлен в BM6438 локусе (29,2%). Наименьшие показатели по данному показателю были получены в локусах BM1225 (4,2%) и CSSM43 (8,3%).

Нарушение генетического равновесия отмечали у пяти из шести микросателлитных локусов – BM6438, CSSM43, ETH225, BM1225, CSRM60. Исключением являлся TGLA53 локус, у которого не было отмечено нарушения генного равновесия ($\chi^2 = 2,42$; $df = 3$; $P > 0,05$).

Выводы

Таким образом, приведённые выше данные свидетельствуют о том, что естественный и искусственный отбор оказывают определённое влияние на генетическую составляющую поголовья одомашниваемых лосей, увеличивая его огомозиготивание, уменьшая число эффективных аллелей, снижая генетическое разнообразие, повышая тем самым однородность исследованной группы одомашниваемых лосей Сумароковской лосефермы Костромской области. Поэтому необходим определённый контроль аллелофонда поголовья одомашниваемых лосей, разводимого не только на Сумароковской лосеферме, но и живущих в условиях дикой природы Костромской области.

Литература

1. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях [Текст] / Ю.П. Алтухов. – М.: Академкнига, 2003. – 431 с.
2. Марзанов, Н.С. ДНК-маркеры в генетике и селекции сельскохозяйственных животных [Текст] / Н.С. Марзанов, В.С. Фокеев, Л.К. Марзанова // Генетические маркеры и экстерьерные признаки в селекции сельскохозяйственных животных: сб. – Сыктывкар, 2009. – С. 67–74.
3. Machugh, D.E. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers [Text] / D.E. Machugh, R.T. Loftus, D.G. Bradley // Animal Genetics. – 1998. – V. 29. – P. 333–340.
4. Slate, J. Bovine microsatellite loci are highly conserved in red deer (*Cervuselaphus*), sika deer (*Cervusnippon*) and Soay sheep (*Ovisaries*) [Text] / J. Slate, D.W. Coltman // Animal Genetics. – 1998. – V. 29. – P. 307–315.
5. Lipkin, E. Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective milk DNA pooling using dinucleotide microsatellite markers [Text] / E. Lipkin, M.O. Mosig, A. Darvasi // Genetics. – 1998. – V. 149. – P. 1557–1567.
6. Spelman, R.J. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL breeding programmes [Text] / R.J. Spelman, H. Bovenhuis // Animal Genetics. – 1998. – V. 29. – P. 77–84.
7. Вейр, Б. Анализ генетических данных [Текст]: монография / Б. Вейр. – М.: Мир, 1995.

References

1. Altukhov, Yu.P. Geneticheskie processy v populacijah [Tekst] / Yu.P. Altukhov. – М.: Akademkniga, 2003. – 431 s.
2. Marzanov, N.S. DNK-markery v genetike i selekcii sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh [Tekst] / N.S. Marzanov, V.S. Fokeev, L.K. Marzanova // Geneticheskie markery i jekster'ernye priznaki v selekcii sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh: sb. – Syktyvkar, 2009. – S. 67–74.
3. Machugh, D.E. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers [Text] / D.E. Machugh, R.T. Loftus, D.G. Bradley // Animal Genetics. – 1998. – V. 29. – P. 333–340.
4. Slate, J. Bovine microsatellite loci are highly conserved in red deer (*Cervuselaphus*), sika deer (*Cervusnippon*) and Soay sheep (*Ovisaries*) [Text] / J. Slate, D.W. Coltman // Animal Genetics. – 1998. – V. 29. – P. 307–315.
5. Lipkin, E. Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective milk DNA pooling using dinucleotide microsatellite markers [Text] / E. Lipkin, M.O. Mosig, A. Darvasi // Genetics. – 1998. – V. 149. – P. 1557–1567.
6. Spelman, R.J. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL breeding programmes [Text] / R.J. Spelman, H. Bovenhuis // Animal Genetics. – 1998. – V. 29. – P. 77–84.
7. Vejr, B. Analiz geneticheskikh dannyh [Tekst]: monografija / B. Vejr. – М.: Mir, 1995.