

Е.Б. ШУКЮРОВА, А.А. ЛУКАШИНА, А.Н. БУЗЬКО

Генетическая характеристика голландского крупного рогатого скота по ДНК-микросателлитам

Представлена генетическая характеристика 300 голов крупного рогатого скота голландской породы, завезенных с Северного Зауралья в Хабаровский край, по 15 микросателлитным локусам ДНК. Установлено, что в исследуемой группе животных число аллелей на локус составляет 8,8, при этом эффективных аллелей – 4,5. Выявлено всего 132 аллеля, из них часто встречались четыре – 102 (локус CSRM 60), 117 (локус ETH 3), 117 (локус TGLA 126), 258 (локус SPS 115). Частота их встречаемости от 0,538 до 0,587. Наибольшим уровнем генетического разнообразия характеризовался локус TGLA 122, в нем установлено максимальное число аллелей – 20. Средний уровень наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности по всем изученным локусам составлял 0,700. Высокий уровень гетерозиготности свидетельствует о генетическом разнообразии соответствующих локусов генома животных.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, голландская порода, микросателлиты, аллели, число эффективных аллелей, гетерозиготность.

Genetic characteristics of Holstein cattle by DNA microsatellites. E.B. SHUKYUROVA¹, A.A. LUKASHINA, A.N. BUZKO² (¹Far Eastern Research Institute of Agriculture, FEB RAS, Khabarovsk Region, Vostochnoe village, ²“Sergeevskoe” LLC, Khabarovsk Region, Sergeevka village).

The results of genetic characteristic of 300 heads of Holstein cattle, brought from the Northern Trans-Urals at Khabarovsk Region by 15 microsatellite loci of DNA are presented in this article. It was determined that in the group of animals being under study the number of alleles on one locus was 8.8 while effective alleles – 4.5. In general 132 alleles were revealed, four of them met often: 102 (locus CSRM 60), 117 (locus ETH 3), 117 (locus TGLA 126), 258 (locus SPS 115) with frequency from 0.538 to 0.587. The greatest level of genetic variety was characterised by locus TGLA 122, it had a maximum number of alleles – 20. The middle level of the observed and expected heterozygosity for all the studied loci was 0.700. The high level of heterozygosity testifies to the genetic variety of corresponding animal genome loci.

Key words: cattle, Holstein breed, microsatellites, alleles, the number of effective alleles, heterozygosity.

Характеристика генофонда, поддержание и сохранение биологического разнообразия видов домашних животных являются актуальными задачами современной биологической науки [5]. Интенсификация современного животноводства требует развития теоретических основ и совершенствования организационных форм селекции сельскохозяйственных животных за счет привлечения новых методов оценки генотипов животных. В практику племенной работы стали внедрять маркерную систему оценки родословных, включающую определение степени гетерозиготности, контроль передачи геномной информации из поколения в поколение и оценку фактического генотипического сходства пробанда с выдающимися предками [6]. В настоящее время существует 10 типов различных систем генетических маркеров [3, 7]. Практически все виды сельскохозяйственных

*ШУКЮРОВА Елена Борисовна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ЛУКАШИНА Анастасия Алексеевна – младший научный сотрудник (Дальневосточный научно-исследовательский институт сельского хозяйства ДВО РАН, Хабаровский край, с. Восточное), БУЗЬКО Андрей Николаевич – главный зоотехник (ООО «Сергеевское», Хабаровский край, с. Сергеевка). *E-mail: dvniishimgen@mail.ru

животных хорошо изучены с помощью этих систем, за исключением ДНК-маркеров. Наиболее информативными оказались сравнительно недавно открытые генетические маркеры, принадлежащие к повторяющейся фракции геномной ДНК, – микросателлиты [10]. Микросателлиты представляют собой фрагменты ДНК с большим количеством tandemно повторяющихся идентичных «мотивов», обычно называемых «повторами» – короткими последовательностями из нескольких пар нуклеотидов. Микросателлиты высокополиморфны, имеют десятки аллелей в каждом локусе и высокие темпы мутирования. Аллели микросателлитного локуса отличаются друг от друга в основном числом повторов и длиной [2, 9].

Микросателлиты являются нейтральными маркерами, обладают высокой изменчивостью и показывают высокий уровень аллельного разнообразия. Это делает возможным их использование для оценки генетического разнообразия популяций. Значительный полиморфизм микросателлитов и кодоминантное наследование обеспечивают возможность исследований на достоверность происхождения потомства, проведения теста на диагностику эффекта «бутылочного горлышка» в популяции и выполнения генетической категоризации пород. Микросателлиты наследуются из поколения в поколение и обладают относительно высокой скоростью мутаций, что позволяет использовать их при оценке дивергенции и для установления эволюционно-генетических связей между популяциями. Таким образом, микросателлиты обладают рядом свойств, которые делают их наиболее практичными маркерами [9].

Цель данной работы – оценить генетическую структуру крупного рогатого скота голштинской породы, завезенного из Северного Зауралья в Хабаровский край, по полиморфным микросателлитным ДНК-маркерам.

Материал и методы

Объектом исследования служил племенной крупный рогатый скот голштинской породы в количестве 300 голов, завезенных в ООО «Сергеевское» Хабаровского края в 2019 г. из Тюменской области. Племенные голштины были приобретены в ООО «ПК «Молоко», которое является одним из самых крупных и динамично развивающихся компаний по производству и переработке молока в Тюменской области. В Тюменскую область голштинский скот был завезен в 2009 г. из Венгрии. В 2013 г. предприятие получило статус племенного репродуктора для разведения чистопородного крупного рогатого скота и приступило к реализации высокопродуктивных коров голштинской породы (<https://www.dairynews.ru/company/russia/ufo/tyumenskaya-oblast/proizvodstvennaya-kompaniya-moloko-ooo-pk-moloko> (дата обращения: 14.02.2020)). К 2017 г. маточное поголовье хозяйства составляло более 1700 голов, продуктивность достигла 6939 кг молока за 305 дней лактации (http://old.mcx.ru/documents/section/v7_show/3831.htm (дата обращения: 14.02.2020)).

Генетическая аттестация скота была проведена по 15 локусам микросателлитной ДНК. Анализ ДНК и постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили согласно методическим рекомендациям [2] в Центре геномных технологий Государственного аграрного университета Северного Зауралья (г. Тюмень). Набор маркеров включал следующие локусы микросателлитов: BM 1818, BM 1824, BM 2113, CSRM 60, CSSM 66, ETH 3, ETH 10, ETH 225, ILST 6, INRA 23, SPS 115, TGLA 53, TGLA 122, TGLA 126, TGLA 227.

Частота встречаемости аллелей, число эффективных аллелей, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, индекс фиксации Райта рассчитаны по общепринятым методикам [1, 4].

Результаты и обсуждение

Голштинский крупный рогатый скот обладает самым высоким в мире потенциалом молочности и комплексом качеств, обеспечивающих лучшую приспособляемость к производственным условиям.

Анализ 15 микросателлитных локусов коров голштинской породы выявил 132 аллеля (табл. 1). Частота встречаемости аллелей в исследуемой группе животных варьировала от 0,020 до 0,587. С наибольшей частотой (от 0,538 до 0,587) встречались четыре аллеля: 102 (локус CSRM 60), 117 (локус ETH 3), 117 (локус TGLA 126), 248 (локус SPS 115). С минимальной частотой встречался 31 аллель – от 0,002 до 0,008.

Таблица 1

Частота встречаемости аллелей 15 микросателлитных локусов крупного рогатого скота голштинской породы

Локус	Аллель	Число аллелей	Частота	Локус	Аллель	Число аллелей	Частота
ETH 3	129	147	0,245	TGLA 122	143	159	0,267
	131	3	0,005		161	42	0,070
	117	317	0,528		171	24	0,040
	127	65	0,108		183	73	0,122
	121	11	0,018		151	61	0,102
	125	50	0,083		159	13	0,022
	119	7	0,012		173	4	0,008
					163	86	0,144
CSSM 66	185	115	0,194		149	105	0,176
	189	248	0,418		157	2	0,003
	193	96	0,162		167	1	0,002
	187	49	0,083		141	6	0,010
	183	57	0,096		153	4	0,007
	195	3	0,005		145	1	0,002
	181	17	0,029		147	1	0,002
	191	3	0,005		181	2	0,003
197	4	0,007	169	6	0,010		
INRA 23	202	95	0,159	155	2	0,003	
	210	160	0,268	169	6	0,010	
	214	192	0,322	155	2	0,003	
	206	125	0,210	165	3	0,005	
	208	12	0,020	165	3	0,005	
	198	2	0,003	139	1	0,002	
	200	5	0,008	248	351	0,587	
	216	4	0,007	252	140	0,234	
260	1	0,002	254	23	0,038		
BM 1818	266	269	0,450	256	68	0,114	
	262	257	0,430	260	10	0,017	
	270	8	0,013	258	4	0,007	
	264	26	0,043	246	2	0,003	
	260	8	0,013	248	351	0,587	
	268	23	0,039	252	140	0,234	
	258	5	0,008	254	23	0,038	
	206	2	0,003	256	68	0,114	
			260	10	0,017		
ILST 6	288	203	0,339	258	4	0,007	
	294	279	0,467	246	2	0,003	
	292	101	0,169	248	351	0,587	
	290	7	0,012	252	140	0,234	
	296	7	0,012	254	23	0,038	
	300	1	0,002	256	68	0,114	
				260	10	0,017	
				258	4	0,007	
			246	2	0,003		
				248	351	0,587	
				252	140	0,234	
				254	23	0,038	
				256	68	0,114	
				260	10	0,017	
				258	4	0,007	
				246	2	0,003	
				248	351	0,587	
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		
			258	4	0,007		
			246	2	0,003		
			248	351	0,587		
			252	140	0,234		
			254	23	0,038		
			256	68	0,114		
			260	10	0,017		

Локус	Аллель	Число аллелей	Частота	Локус	Аллель	Число аллелей	Частота
ETH 10	217	103	0,183	TGLA 53	184	16	0,029
	219	256	0,456		172	15	0,028
	213	43	0,077		162	104	0,191
	223	61	0,109		170	16	0,029
	209	39	0,069		182	11	0,020
	225	49	0,090		186	16	0,029
	221	7	0,012		180	22	0,040
	215	3	0,005		174	3	0,006
	123	1	0,002		164	1	0,002
TGLA 227	87	51	0,089	CSRM 60	92	130	0,217
	89	143	0,250		102	311	0,518
	83	29	0,051		96	59	0,098
	97	91	0,160		100	51	0,085
	103	50	0,090		98	49	0,082
	81	55	0,100	BM2113	135	203	0,340
	91	108	0,189		137	44	0,074
	85	4	0,007		127	160	0,268
	95	16	0,028		133	10	0,017
	99	7	0,012		125	114	0,191
	93	7	0,012		139	57	0,096
	101	9	0,016		127	7	0,012
					143	1	0,002
TGLA 126	115	161	0,269	BM 1824	180	92	0,154
	117	322	0,538		188	261	0,436
	121	34	0,057		182	52	0,087
	119	33	0,055		178	188	0,314
	123	48	0,080		190	5	0,008

Всего в изученных локусах установлено от 5 (TGLA 126, CSRM 60, BM 1824) до 20 аллелей (TGLA 122). Среднее число аллелей на локус составляло 8,8 (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика 15 микросателлитных локусов крупного рогатого скота голштинской породы

Локус	Аллели	Число аллелей на локус	Число эффективных аллелей
ETH 3	117–131	7	2,8
CSSM 66	181–197	9	3,9
INRA 23	198–260	9	4,1
BM 1818	206–270	8	2,6
ILST 6	288–300	6	2,8
TGLA 227	81–103	12	6,5
TGLA 126	115–123	5	2,7
TGLA 122	139–183	20	14,3
SPS 115	246–260	7	2,4
ETH 225	140–152	7	3,0
TGLA 53	154–186	15	8,3
CSRM 60	92–102	5	2,9
BM 2113	125–143	8	4,2
BM 1824	178–190	5	3,1
ETH 10	123–225	9	3,7
\bar{x}	–	8,8	4,5
$S_{\bar{x}}$	–	1,1	0,8

Примечание. Здесь и в табл. 3 \bar{x} – среднее арифметическое значение, $S_{\bar{x}}$ – стандартное отклонение.

Для оценки генетического разнообразия (уровня полиморфности) было рассчитано число эффективных аллелей. Число эффективных аллелей является функцией от доли полиморфных локусов, числа аллелей на локус и выравниваемости частот аллелей и, таким образом, может рассматриваться как мера генетического разнообразия популяции. Чем меньше число эффективных аллелей, тем ниже генетическое разнообразие в популяции. Расчеты показали, что число действующих аллелей колебалось от 2,4 в локусе SPS 115 до 14,3 в локусе TGLA 122. Средний показатель числа эффективных аллелей исследуемых локусов составил 4,5. Из общего числа 12 локусов имели количество аллелей меньше среднего числа эффективных аллелей, а оставшиеся 3 – больше.

В популяционно-генетических исследованиях оценка гетерозиготности очень важна. Гетерозиготы несут разные аллели, и степень наблюдаемой гетерозиготности служит показателем генетической изменчивости в популяции. Гетерозиготность имеет положительное значение для адаптации животных к изменяющимся условиям среды, что подтверждается многочисленными исследованиями. У гетерозиготных особей повышена жизнеспособность.

Наравне с наблюдаемой гетерозиготностью нами определялся показатель ожидаемой гетерозиготности, который точнее характеризует разнообразие исследуемой популяции. Наибольшие уровни наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (0,857 и 0,930 соответственно) были обнаружены в локусе TGLA 122, а наименьшие (0,530 и 0,586 соответственно) – в локусе SPS 115 (табл. 3). Средний уровень наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности составлял примерно 0,700.

Таблица 3

Уровень гетерозиготности по 15 микросателлитным локусам крупного рогатого скота голштинской породы

Локус	Гетерозиготность		Индекс фиксации Райта (Fis)
	ожидаемая	наблюдаемая	
ETH 3	0,642	0,673	-0,050
CSSM 66	0,744	0,720	0,032
INRA 23	0,755	0,753	0,003
BM 1818	0,609	0,620	-0,020
ILST 6	0,638	0,647	-0,010
TGLA 227	0,846	0,733	0,134
TGLA 126	0,626	0,597	0,046
TGLA 122	0,930	0,857	0,078
SPS 115	0,586	0,530	0,096
ETH 225	0,670	0,667	0,004
TGLA 53	0,880	0,707	0,197
CSRM 60	0,661	0,680	-0,030
BM 2113	0,761	0,790	-0,040
BM 1824	0,680	0,797	-0,170
ETH 10	0,728	0,717	0,015
\bar{x}	0,700	0,700	0,019
S_x	0,030	0,020	–

Для оценки отклонения гетерозиготных генотипов от теоретически ожидаемых показателей использовали значение индекса фиксации Райта (Fis), который отражает состояние исследуемой группы по отношению к гетерозиготным генотипам. Величина индекса может иметь положительные и отрицательные значения: в первом случае это свидетельствует о нехватке гетерозигот, во втором – указывает на их избыток. Из табл. 3 видно, что нехватка гетерозигот была по локусам CSSM 66, INRA 23, TGLA 227, TGLA 126, TGLA 122, SPS 115, ETH 225, TGLA 53 и ETH 10, при этом индекс фиксации находился в диапазоне от 0,003 до 0,197. Избыток гетерозигот наблюдался по шести локусам, индекс

фиксации для них колебался в диапазоне от $-0,170$ по локусу VM 1824 до $-0,010$ по локусу ILST 6. В среднем по 15 локусам индекс фиксации составлял 0,019, что свидетельствует о недостатке гетерозигот.

Заключение

В исследуемой группе крупного рогатого скота голштинской породы среднее число микросателлитных аллелей на локус составляло 8,8, из них эффективных аллелей – 4,5. Увеличение числа аллелей в локусе сопровождается повышением генетического разнообразия (уровня полиморфности). Наибольшим уровнем полиморфности характеризовался локус TGLA 122: здесь выявлено 20 аллелей. Средний уровень наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности составлял 0,700, индекс фиксации Райта имел величину 0,019.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика. М.: Мир, 1988. 336 с.
2. Зиновьева Н.А., Попов А.Н., Эрнст Л.К. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. Дубровицы: ВИЖ, 1998. 47 с.
3. Марзанов Н.С., Девришов Д.А., Марзанова С.Н., Комкова Е.А., Озеров М.Ю., Кантанен Ю. Генетическое маркирование, сохранение биоразнообразия и проблемы разведения животных // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 2. С. 3–14.
4. Меркурьева Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве. М.: Колос, 1977. 174 с.
5. Улимбашев М.Б., Кулинцев В.В., Селионова М.И., Улимбашева Р.А., Абилов Б.Т. Рациональное использование генофонда ценных пород животных с целью сохранения биологического разнообразия // Юг России: экология, развитие. 2018. Т. 13, № 2. С. 165–183.
6. Храброва Л.А., Труфанов В.Г. Применение ДНК-технологии для оценки потенциала лошадей // Коневодство и конный спорт. 2015. № 1. С. 20–22.
7. Cockett N.E., Shay T.L., Smit M. Analysis of the sheep genome // *Physiol. Genomics*. 2001. Vol. 7. P. 69–78.
8. Henderson S.T., Petes T.D. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 1992. Vol. 12. P. 2749–2757.
9. Maleviciute J., Baltreinaite L., Miceikienė I. Domestic cattle breed diversity in Lithuania // *Vet. Med. and Zootechn.* 2002. Vol. 20. P. 87–91.
10. Tapio M., Miceikienė I., Vilkki J., Kantanen J. Comparison of microsatellite and blood protein diversity in sheep: inconsistencies in fragmented breeds // *Mol. Ecol.* 2003. Vol. 12 (8). P. 2045–2056.