

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КУР ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Новгородова Инна Петровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории клеточной инженерии, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л. К. Эрнста».

1421432, Московская область, г. Подольск, пос. Дубровицы, д. 60.

E-mail: novg-inna2005@yandex.ru

Ключевые слова: микросателлитные, маркеры, аллели, порода, курица, генетическое, разнообразие.

Цель исследования – совершенствование процесса идентификации породной принадлежности птиц с использованием микросателлитных локусов. Исследования проводили на 9 породах кур: австролоп черно-пестрый (АВС_ЧП), австролоп черный (АВС_Ч), куланги (КУЛ), чешская золотистая (ЧЕШ_З), андалузская голубая (АНД_Г), голошейная (ГЛШ), брекель серебристый (БР_С), русская черная бородатая (РУС_ЧБ) и минорка (МИН) (в количестве $n=268$) по 16-ти маркерам. В каждой опытной группе было 29-30 голов птиц. Исследования были проведены в лаборатории молекулярной генетики животных ВИЖа им. Л.К. Эрнста. Разделение и детекцию продуктов амплификации выполняли на генетическом анализаторе ABI3130xl («AppliedBiosystems», США). Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GenAIEx (v.6.4.). В ходе работы изучено генетическое разнообразие кур (среднее число аллелей, число эффективных аллелей, уровень гомо- и гетерозиготности и т.д.) по микросателлитным локусам. Следует отметить, что среднее число аллелей в проведенном исследовании колебалось от $6,06 \pm 0,050$ у кур породы АНД_Г до $7,81 \pm 0,73$ у кур породы ГЛШ, в то время как число информативных аллелей варьировало от $3,63 \pm 0,30$ у птиц породы АНД_Г до $5,44 \pm 0,34$ у птиц породы БРЕК_С. В ходе исследований была отмечена высокая информативность 16-ти выбранных локусов и в зависимости от локуса число аллелей колебалось от 8 (локус MCW0037) до 25 аллелей (локус MCW0183). Проведенные исследования позволили выявить наличие частных аллелей у изучаемых пород кур, которые были обнаружены у птиц 7 пород из 9 с частотой встречаемости от 1,7 до 67,7%. Для более точной оценки изменчивости исследуемых пород птиц определили ожидаемую и наблюдаемую гетерозиготность, средние значения которых, соответственно, достигали 66,9 и 37,1%. Идентификация породной принадлежности кур к своей популяции, рассчитанная на основании анализа 16-ти микросателлитных маркеров, варьировала от 79,3 до 100,0%. Таким образом, использование микросателлитных локусов в племенной работе кур открывает большие возможности при комплектовании генофондного стада птиц.

Для подтверждения достоверности происхождения в последнее время в животноводстве и птицеводстве используют ДНК-маркеры. Международное научное сообщество признало наиболее надежным и эффективным методом анализа происхождения животных, – анализ, основанный на генотипировании ДНК [1]. На сегодняшний день создан ряд различных национальных и международных программ по генетическим исследованиям в животноводстве (например, в США *Genetics Breeding and Animal Health Research Unit*, в Ирландии *Animal and Public Health Information System (APHIS)*), наиболее значимой на сегодняшний день является программа всемирной продовольственной организации ООН (FAO, *State of the World's animal genetic program for food and agriculture*). Для генотипирования животных FAO рекомендовало определенные микросателлитные маркеры (MC). В рамках объединения мирового опыта по генетическим исследованиям в животноводстве было создано ISAG (Международное общество по изучению генетики животных) [3, 6]. Новые молекулярно-генетические методы, используемые в селекции, служат отличным инструментом, позволяющим идентифицировать не только отдельные особи и группы животных, но и позволяют оценивать генетические различия между популяциями [2]. Это не только упрощает, но и ускоряет селекционный процесс. Наиболее информативными среди ДНК-маркеров являются микросателлитные локусы, которые могут использоваться для оценки дифференциации разных пород и линий, и в дальнейшем определять маркеры, ассоциированные с хозяйственно-полезными признаками (QTL). Вопросам сохранения генетического разнообразия сельскохозяйственных животных и птиц отводится большое внимание во всем мире, так как за счет обеднения их генетического ресурса может быть потерян ценнейший материал происхождения пород [5].

Цель исследований – совершенствование процесса идентификации породной принадлежности птиц с использованием микросателлитных локусов.

Задачи исследований – изучить генетическое разнообразие исследуемых 9-ти пород кур, дать характеристику их аллелофонда, а также выявить частные аллели.

Материалы и методы исследований. Материалом для исследований служили образцы пера (пульпы) кур ($n=268$), разводимых в генофондном стаде ГНУ ВНИТИП. Исследования проводили в лаборатории молекулярной генетики животных ВИЖа им. академика Л.К. Эрнста на 9-и породах кур: австролоп черно-пестрый (АВС_ЧП), австролоп черный (АВС_Ч), куланги (КУЛ), чешская золотистая (ЧЕШ_З), андалузская голубая (АНД_Г), голошейная (ГЛШ), брекель серебристый (БР_С), русская черная бородатая (РУС_ЧБ) и

минорка (МИН). Исследование проводили в Центре биотехнологии и молекулярной диагностики ВИЖа им. Л. К. Эрнста. Выделение ДНК проводили согласно стандартным методикам. Генотипирование птиц осуществляли с помощью тест-системы для проведения ДНК-экспертизы кур, включающей необходимый комплект реагентов (ДНК-ЭЛЮТ, Россия). Мультиплексный микросателлитный анализ по 16-и локусам выполняли на генетическом анализаторе ABI3130xl («AppliedBiosystems», США). Ранее проводили исследование генетических параметров кур по одной панели (8 локусов), в настоящее время мультиплексная панель дополнена второй панелью, также состоящей из 8 локусов (всего 16). Анализ популяционно-генетических параметров проводили с помощью программного обеспечения GenAlEx (v.6.4.). Для статистической обработки данных использовали стандартные методы, применяемые при изучении генетического разнообразия популяций.

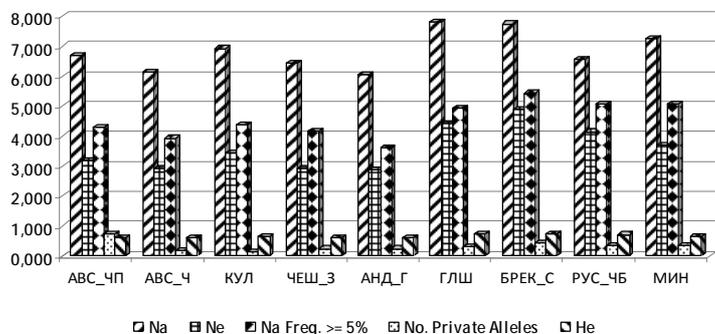


Рис. 1. Показатели генетической информативности мультиплексной тест-системы у исследуемых пород кур:

Na – среднее число аллелей, Ne – число эффективных аллелей, NaFreq>=5% – число информативных аллелей, No. PrivateAlleles – среднее число частных аллелей, He – ожидаемая гетерозиготность

нему числу аллелей на локус характеризовались куры породы ГЛШ – $7,81 \pm 0,73$, в то время как среднее число эффективных и информативных аллелей было наибольшим у породы БРЕК_С – $4,92 \pm 0,48$ и $5,44 \pm 0,34$; соответственно. Наименьшим генетическим разнообразием характеризовались птицы породы АНД_Г, у которых среднее число аллелей, эффективных и информативных аллелей составило, соответственно, $6,06 \pm 0,50$; $2,89 \pm 0,28$ и $3,63 \pm 0,30$. Анализ локусов показал высокую информативность выбранных микросателлитных маркеров (табл. 1). Число аллелей в зависимости от локуса варьировало от 8 в локусе MCW0037 до 25 аллелей в локусе MCW0183. Число выявленных аллелей в зависимости от породы варьировало от 2 у кур АНД_Г в локусе MCW0037 до 15 у кур ABC_ЧП в локусе MCW0034.

Таблица 1

Характеристика полиморфизма микросателлитных маркеров у исследуемых пород кур

Локус	ABC_ЧП	ABC_Ч	КУЛ	ЧЕШ_3	АНД_Г	ГЛШ	БРЕК_С	РУС_ЧБ	МИН	Итого аллелей в локусе
MCW0111	7*	4	4	6	6	7	6	6	5*	10
MCW0067	8	6**	7	6*	10	7	8	7	8	12
LEI0094	5	7	10	6	8	9	9**	6**	6	16
MCW0123	5*	4	5***	6	4**	12	9	7	7**	14
MCW0081	7	6	9	10*	4	7**	7	4	7	13
MCW0069	6**	5	7**	4	6	7	8	6*	6	9
MCW0104	6	7	7	7**	7	7	9*	8	9*	18
MCW0183	4**	12	11	5	7	14	9	10	12	25
MCW0295	8	10	8*	11	5**	9	10	5	8	17
ADL0112	7	6	8	5***	5**	5***	5***	3	4	10
MCW0037	5*	5*	5	5	2	3	5	6**	3	8
MCW0034	15*	7	6**	7	9*	12	13	8	11	22
ADL0268	7*	6	5***	7	7	7	6	6	8	11
MCW0222	5**	4	6	4	5	5**	6***	7	7	11
MCW0014	6**	3	6	8*	5*	5	8	8***	8*	15
LEI0074	6	6	7	6	7**	9	6	8	6	13

Примечание: *P>0,05, **P>0,01, P>0,001.

Наличие частных аллелей является одним из критериев характеристики специфичности популяции и отсутствия интенсивного обмена генами между сравниваемыми породами. Частные аллели были отмечены у 7 пород кур из 9. Наибольшее число частных аллелей с частотой встречаемости от 1,7 до 11,7% было выявлено у птиц породы ABC_ЧП (5 аллелей в локусах MCW0081, MCW0104, ADL0112 и MCW0034). Минимальное число частных аллелей было отмечено у кур породы КУЛ с частотой встречаемости от 1,7 до 3,3% (2 аллели в локусах LEI0094 и ADL0112). Полученные результаты подтверждают гипотезу о наличии породоспецифичных аллелей, свойственных замкнутым популяциям. Был выполнен расчет наблюдаемой и ожидаемой степеней гетерозиготности с целью оценки генетической изменчивости у изучаемых пород кур. Значения генетической изменчивости в породах птиц, рассчитанные по 16-ти локусам, представлены в таблице 2. Показатели ожидаемой гетерозиготности дают более точную оценку

изменчивости популяции и позволяют рассматривать уровень аллельного разнообразия. Значения ожидаемой гетерозиготности незначительно отличались и колебались от 60,5% (у кур породы АНД_Г) до 76,2% (у кур БРЕК_С). Среднее значение ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности составляло 66,9 и 37,1% соответственно. Показатели наблюдаемой гетерозиготности у исследуемых популяций птиц варьировали от 20,6 (у кур БРЕК_С) до 54,4% (у кур АВС_ЧП).

Таблица 2

Показатели генетического разнообразия у исследуемых пород кур

Порода	n	He	Ho	I	Fis
АВС_ЧП	30	0,629±0,04*	0,544±0,07	1,335±0,10	0,135
АВС_Ч	30	0,617±0,04*	0,323±0,05*	1,250±0,10	0,476
КУЛ	30	0,675±0,03*	0,508±0,04*	1,415±0,08	0,247
ЧЕШ_З	30	0,609±0,04*	0,321±0,06	1,267±0,09	0,473
АНД_Г	29	0,605±0,04*	0,489±0,06	1,227±0,09	0,192
ГЛШ	30	0,735±0,03*	0,269±0,07	1,613±0,10	0,634
БРЕК_С	30	0,762±0,03*	0,206±0,06	1,704±0,10	0,730
РУС_ЧБ	29	0,724±0,03*	0,306±0,07	1,529±0,09	0,577
МИН	30	0,661±0,04*	0,369±0,08	1,464±0,09	0,442
Итого	268	0,669±0,03	0,371±0,06	1,422±0,09	0,446

Примечание: He – ожидаемая гетерозиготность, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, I – индекс Шеннона, Fis – коэффициент инбридинга.

*P>0,05.

Высокие значения коэффициента инбридинга у таких пород птиц как БРЕК_С (73,0%), ГЛШ (63,4%) и РУС_ЧБ (57,7%) свидетельствуют об их высоком уровне инбридинга. Среднее значение Fst (название) по 16-ти локусам всех пород равнялось 0,344. Это свидетельствует о том, что 65,6% всей изменчивости обусловлено внутривидовым разнообразием, 34,4% – приходится на межпородные различия.

На основании анализа 16-ти микросателлитных локусов была рассчитана генетическая принадлежность птиц к соответствующей популяции. Вероятность идентификации породной принадлежности особи на основании ее анализа по микросателлитным маркерам показывает, насколько далеко находится друг от друга каждая из популяций, при условии независимого наследования микросателлитов [4]. В среднем у исследуемого поголовья кур была отмечена высокая идентичность особей в породах – 91,78%. Наиболее консолидированными были птицы пород АВС_ЧП, АНД_Г и ГЛШ. Породная принадлежность этих пород была определена в 100% случаев. Такие породы птиц как КУЛ (96,7%), ЧЕШ_З (93,3%) и АВС_Ч (90,0%) характеризовались также высокой консолидированностью. Что свидетельствует о высокой степени типичности каждой особи внутри породы. Наименее генетически консолидированными оказались куры породы РУС_ЧБ (79,3%). Идентифицирование породной принадлежности при использовании микросателлитных маркеров обеспечивается за счет наследования особями специфичных для той или иной породы аллелей локусов.

Заключение. Использование микросателлитных локусов при оценке генетических показателей 9-ти пород кур позволило выявить существенную степень полиморфизма и оценить генетическое разнообразие, изучаемых групп птиц. Эти данные позволяют проводить идентификацию породной принадлежности птиц с целью их дальнейшей ДНК-паспортизации. Наибольшее генетическое разнообразие по среднему числу аллелей на локус было выявлено у кур породы ГЛШ (7,81±0,73), а по числу информативных аллелей – у птиц породы БРЕК_С (5,44±0,34), наименьшее – у кур породы АНД_Г (среднее число аллелей 6,06±0,50 и число информативных аллелей 3,63±0,30). Приватные аллели были обнаружены у 7 пород из 9 (частота встречаемости от 1,7 до 67,7%). Также установлена высокая генетическая консолидированность изучаемых пород на основании анализа микросателлитных маркеров, средние значения идентификации породной принадлежности составили 91,78%.

Библиографический список

1. Alipanah, M. Study of Genetic diversity of Dashtiari, Khazak and Zabol chicken using microsatellite markers / M. Alipanah, A. Torkamanzehi, Z. Amiry, F. Rabani // *Trakia Journal of Sciences*. – 2011. – Vol. 9(2). – P. 76-81.
2. FAO. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture // Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. – Rome, 2007. – 510 p.
3. Hoffmann Global plan of action for animal genetic resources: The global plan of action for animal genetic resources and the conservation of poultry genetic resource // *Animal Production and Health Division // World's Poultry Science Journal*. – 2009. – Vol. 65. – P. 286-297.
4. Pritchard, J. K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics*. – 2000. – Vol. 155(2). – P. 945-959.
5. Semik, E. The state of poultry genetic resources and genetic diversity of hen populations / E. Semik, J. Krawczyk // *Ann. Anim. Sci.* – 2011. – Vol. 11(2). – P. 181-191.
6. Yahav, S. Challenges in poultry production during the 21st century // *Proceedings of XIV European Poultry Conference*. – Stavanger, 2014. – P. 67-77.
7. Zhao, Z.-H. Analysis of Genetic Structure and Diversity of Chai Chicken Breed Using Microsatellite Marker / Z.-H. Zhao, J.-Z. Xi, Q. Jia, S.-F. Li and H.-Y. Huang // *J. of Anim. and Veter. Advan.* – 2010. – Vol. 9 (8). – P. 1197-1200.