

МЕЖПОРОДНАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ОВЕЦ, РАЗВОДИМЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ПО STR-ЛОКУСАМ

Е. С. ЧЕБУРАНОВА

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь, 230008, e-mail: echeburanova@inbox.ru

(Поступила в редакцию 02.07.2021)

Важным аспектом создания разных пород сельскохозяйственных животных, в том числе овец, является оценка генетического разнообразия, генетической дифференциации и гетерозиготности популяций животных, а также наблюдение изменений в породах животных, происходящих в результате селекции и разведения на сохранение или улучшения хозяйственно полезных признаков. Данные исследования проводятся с помощью технологий изучения ДНК, которые основываются на использовании различных типов маркеров ДНК. В данном исследовании изучалась межпородная дифференциация пород овец по STR-локусам, а также их генетические связи. Объектом исследования служили бараны-производители, ремонтные баранчики и овцематки различных пород, разводимых на территории Республики Беларусь. Выделение нуклеиновых кислот проводили перхлоратным методом, изучение генетической структуры популяций овец по 12 STR-локусам проводили с помощью полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом микросателлитов. Для изучения межпородной дифференциации овец по STR-локусам были рассчитаны показатели: частота встречаемости аллелей, уровень полиморфности, наблюдаемая гетерозиготность, ожидаемая гетерозиготность, индекс фиксации Райта, величина информативной ценности изучаемых STR-маркеров. В результате изучения генетической структуры пород овец по STR-локусам, было выявлено небольшое содержание гетерозиготных генотипов, об этом свидетельствуют значения индекса фиксации Райта (F_{is}), который колебался в зависимости от породы от 0,1882 в породе Суффолк до 0,3703 в породе Дорпер. Небольшое генетическое расстояние, между изучаемыми породами овец варьирующее от 0,0137 до 0,2130 свидетельствует о возможном сокращении генетического разнообразия овец, разводимых на территории Республики Беларусь.

Ключевые слова: STR-локус, полиморфизм, овцы, микросателлиты, гетерозиготность.

An important aspect of creating different breeds of farm animals, including sheep, is the assessment of genetic diversity, genetic differentiation and heterozygosity of animal populations, as well as observation of changes in animal breeds that occur as a result of selection and breeding to preserve or improve economically useful traits. These studies are carried out using DNA research technologies, which are based on the use of various types of DNA markers. In this research, we studied the inter-breed differentiation of sheep breeds according to STR-loci, as well as their genetic relationships. The object of the study was ram-producers, repair rams and ewes of various breeds bred in the territory of the Republic of Belarus. The isolation of nucleic acids was carried out by the perchlorate method, the study of the genetic structure of sheep populations according to 12 STR-loci was carried out using the polymerase chain reaction with subsequent fragment analysis of microsatellites. To study the interbreed differentiation of sheep according to STR-loci, the following indicators were calculated: the frequency of occurrence of alleles, the level of polymorphism, the observed heterozygosity, the expected heterozygosity, the Wright fixation index, the value of informative value of the studied STR-markers. As a result of studying the genetic structure of sheep breeds according to STR-loci, a small content of heterozygous genotypes was revealed, as evidenced by the value of Wright fixation index (F_{is}), which varied depending on the breed from 0.1882 in the Suffolk breed to 0.3703 in the Dorper breed. The small genetic distance between the studied sheep breeds, varying from 0.0137 to 0.2130, indicates a possible reduction in the genetic diversity of sheep bred on the territory of the Republic of Belarus.

Key words: STR-locus, polymorphism, sheep, microsatellites, heterozygosity.

Введение

Эффективность работы племенной службы Республики Беларусь сегодня, возможна за счет внедрения современных инновационных технологий и новейших достижений, в том числе и в области молекулярной биотехнологии. В овцеводстве все большее значение приобретает генетическая оценка особей, популяций и пород с использованием различных генетических маркеров [1].

Широко распространенным приемом для повышения продуктивных качеств стало прилитие крови, в результате чего можно прийти к вымыванию уникальных, свойственных определенным породам аллелей, снижению генетического разнообразия и стиранию генетических различий между породами.

Оценка межпородной дифференциации овец, разводимых на территории Республики Беларусь, является одним из наиболее актуальных элементов селекции овцеводства. Основными критериями, необходимыми для оценки этой характеристики, является анализ генетического разнообразия пород овец и изучение филогенетических связей между ними. STR-локусы (микросателлиты), обладающие высоким уровнем полиморфности, кодоминантным типом наследования, являются идеальными маркерами для изучения генетического разнообразия и филогенетических связей [2, 3, 4]. Международным обществом генетики животных (ISAG) рекомендован перечень из 13 микросателлитов, позволяющих изучить межпородную дифференциацию овец.

Цель работы: явилось изучение межпородной дифференциации овец, разводимых в Республике Беларусь и генетических связей между ними.

Основная часть

Исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «Гродненский государственный аграрный университет». В качестве объекта исследований использовали баранов-производителей, ремонтных баранчиков и овцематок различных пород (тексель, дорпер, Иль-де-Франс, суффолк) и их биологический материал (ушной выщип и носовая слизь), разводимых в КСУП «Хвиневи́чи», РУП «Витебское племпредприятие», ИООО «Истер-Шип», Агроусадьба Мазычи (n=411).

Ядерную ДНК выделяли перхлоратным методом с двойной очисткой. Качество выделенных нуклеиновых кислот проверяли, используя спектрофлуориметр Implen NanoPhotometer N60-Touch, оптимальная концентрация для проведения ПЦР и фрагментного анализа составила 10 нг/мкл.

Межпородную дифференциацию изучали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и фрагментного анализа по STR-локусам (McM042, McM527, CSRD247, OarFCB20, INRA063, MAF065, ETH152, INRA005, INRA006, INRA023, INRA172, MAF214).

Для амплификации ПЦР использовали термоциклер C1000 Touch™ BIORAD. Общий объем смеси составил 14 мкл и включал: ПЦР буфер 10-х, 50 mM MgCl₂, dNTP 2,0 mM, 15 pM каждого праймера, 0,25 U Tag-полимеразы, 10 нг/мкл ДНК и H₂O до 14 мкл.

Параметры ПЦР: денатурация – 95 °С – 4 мин; 35 циклов: денатурация – 94 °С – 30 сек; отжиг олигонуклеотидных последовательностей 57 °С – 45 сек; элонгация – 72 °С – 45 сек; финальная элонгация 72 °С – 10 мин.

После проведения ПЦР продукт амплификации подвергали денатурации в термостате при температуре 95 °С в течение 3 минут, с последующим охлаждением на льду в течение 10 минут. Для проведения фрагментного анализа использовали генетический анализатор 3500 (Applied Biosystems), обработку данных проводили с помощью специализированного программного обеспечения GeneMapper 3.0.

Для изучения межпородной дифференциации овец по STR-локусам были рассчитаны показатели (с помощью Microsoft Office Excel 2007): частота встречаемости аллелей (формула 1), уровень полиморфности (формула 2), наблюдаемая гетерозиготность (формула 3), ожидаемая гетерозиготность (формула 4), индекс фиксации Райта (формула 5), величина информативной ценности изучаемых STR-маркеров (формула 6).

$$p = n/2N, \quad (1)$$

где p – частота аллеля; n – число животных носителей данного аллеля; N – общее количество обследованных животных.

$$A_e = 1/\sum p_{ij}^2, \quad (2)$$

где A_e – уровень полиморфности (показатель числа действующих эффективных аллелей), p – частота встречаемости j аллеля для локуса i и суммирование распространяется на n аллелей.

$$H_o = h_j/n, \quad (3)$$

где H_o – наблюдаемая гетерозиготность по одному локусу; h_j – количество гетерозиготных генотипов в локусе; n – общее количество генотипов в локусе.

$$H_e = 1 - \sum p_i^2, \quad (4)$$

где H_e – ожидаемая гетерозиготность по одному локусу; p_i – частота встречаемости i -го аллеля.

$$F_{is} = (H_e - H_o)/H_e, \quad (5)$$

где F_{is} – индекс фиксации Райта, H_e – ожидаемая гетерозиготность, H_o – наблюдаемая гетерозиготность.

$$PIC_i = 1 - \sum p_{ij}^2, \quad (6)$$

где PIC_i – полиморфное информационное содержание i -го локуса; p – частота j аллеля для локуса i и суммирование распространяется на n аллелей.

Генетическое расстояние (D) пород овец было рассчитано по формуле 7:

$$D = -\ln I, \quad (7)$$

где I – генетическое сходство изучаемых популяций пород овец.

В результате проведенных исследований нами изучена генетическая дифференциация пород овец по STR-локусам. Характеристика генетической дифференциации овец породы Дорпер по STR-локусам представлена в таб. 1.

Таблица 1. Характеристика генетической дифференциации овец породы Дорпер по STR-локусам

STR-локус	Число аллелей (Na)	Уровень полиморфности (Ae)	Наблюдаемая гетерозиготность (Ho)	Ожидаемая гетерозиготность (He)	Индекс фиксации (Fis)	Величина информативной ценности (PIC)
McM042	8	6,5896	1,0000	0,9810	-0,0196	0,8482
INRA006	6	2,9227	0,3276	0,9430	0,6479	0,6578
McM527	4	2,9916	0,6724	0,9164	0,2586	0,6657
ETH152	3	1,6519	0,3818	0,7982	0,4339	0,3946
CSRD247	4	2,1393	0,6724	0,8831	0,1983	0,5326
OarFCB20	3	2,3986	0,5000	0,8610	0,4067	0,5831
INRA172	1	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
INRA063	5	3,4292	0,4310	0,9417	0,5404	0,7084
MAF065	2	2,0204	0,4561	0,7525	0,3876	0,5051
MAF214	4	1,9076	0,5345	0,8689	0,3334	0,4758
INRA005	7	5,5374	0,7241	0,9742	0,2561	0,8194
INRA023	4	3,5523	0,0000	0,9296	1,0000	0,7185
Среднее значение	4,25	3,0117	0,4750	0,8208	0,3703	0,5758

При изучении генетической дифференциации STR-локусов овец породы Дорпер число идентифицированных аллелей (Na) варьировало от 1 до 8, причем минимальное количество наблюдалось в локусе INRA172, а максимальное в локусе McM042.

В исследуемой группе овец наблюдаемая гетерозиготность (Ho) варьировала от 0 (локусы INRA172 и INRA023) до 100 % (локус McM042), а ожидаемая (He) – от 0 (локус INRA172) до 98 % (локус McM042). В локусе McM042 наблюдаемая гетерозиготность превышала ожидаемую на 0,019. В остальных локусах ожидаемая гетерозиготность превышала наблюдаемую.

Анализ показателя индекса фиксации Fis показал, что практически все локусы отличаются смещением равновесия в сторону недостатка гетерозигот (минимальное значение Fis=-0,0196 в локусе McM042 и максимальное Fis=1,0000 в локусе INRA023). В группе исследованных животных локус INRA172 имел значение (PIC<0,5), что указывает на низкую информативность в данной группе животных. Остальные STR-локусы имели PIC>0,5, что указывает на их высокую информативность.

Результаты генетической дифференциации овец породы Иль-де-Франс по STR-локусам представлены в табл. 2.

Таблица 2. Характеристика генетической дифференциации овец породы Иль-де-Франс по STR-локусам

STR-локус	Число аллелей (Na)	Уровень полиморфности (Ae)	Наблюдаемая гетерозиготность (Ho)	Ожидаемая гетерозиготность (He)	Индекс фиксации (Fis)	Величина информативной ценности (PIC)
McM042	4	3,3758	0,7500	0,9259	0,1871	0,7038
INRA006	5	2,8627	0,6389	0,9301	0,3008	0,6507
McM527	4	3,7460	0,7292	0,9333	0,2176	0,7330
ETH152	4	2,4151	0,5417	0,8965	0,3753	0,5859
CSRD247	4	2,1869	0,2986	0,8857	0,6558	0,5427
OarFCB20	6	3,4422	0,7847	0,9238	0,1440	0,7095
INRA172	3	1,0800	0,0764	0,0749	0,0749	0,0740
INRA063	7	3,2246	0,8958	0,9557	0,0572	0,6899
MAF065	4	1,6023	0,4375	0,8440	0,3929	0,3759
MAF214	4	2,1225	0,7917	0,8822	0,0859	0,5289
INRA005	7	3,5301	0,7083	0,9595	0,2591	0,7167
INRA023	5	2,7018	0,8056	0,9260	0,1130	0,6299
Среднее значение	4,75	2,6908	0,6215	0,8448	0,2386	0,5784

В исследуемой популяции овец число идентифицированных аллелей (Na) варьировало от 3 до 7, причем минимальное количество в локусе INRA172, а максимальное в локусе INRA005.

В исследуемой группе животных наблюдаемая гетерозиготность (Ho) варьировала от 7 % (локус INRA172) до 89 % (локус INRA063), а ожидаемая (He) – от 7 % (локус INRA172) до 96 % (локус INRA005). В локусе INRA172 наблюдаемая гетерозиготность превышала ожидаемую на 0,0015. В остальных локусах ожидаемая гетерозиготность превышала наблюдаемую.

Анализ показателя индекса фиксации Fis показал, что практически все локусы отличаются смещением равновесия в сторону недостатка гетерозигот (минимальное значение Fis=0,0572 в локусе INRA063 и максимальное Fis=0,6558 в локусе CSRD247). В группе исследованных животных локусы INRA172 и MAF065 имели значение (PIC<0,5), что указывает на низкую информативность локусов в

данной группе животных. Остальные STR-локусы имели $PI_C > 0,5$, что указывает на их высокую информативность.

Результаты генетической дифференциации овец породы Тексель по STR-локусам представлены в табл. 3.

Таблица 3. Характеристика генетической дифференциации овец породы Тексель по STR-локусам

STR-локус	Число аллелей (Na)	Уровень полиморфности (Ae)	Наблюдаемая гетерозиготность (Ho)	Ожидаемая гетерозиготность (He)	Индекс фиксации (Fis)	Величина информативной ценности (PIC)
McM042	8	5,3581	0,7297	0,9767	0,2524	0,8134
INRA006	10	5,5538	0,6757	0,9820	0,3115	0,8199
McM527	7	4,6407	0,7297	0,9692	0,2463	0,7845
ETH152	8	4,6684	0,5946	0,9732	0,3883	0,7858
CSRD247	12	4,0383	0,6486	0,9794	0,3349	0,7524
OarFCB20	11	2,3263	0,8649	0,9609	0,0943	0,5701
INRA172	9	3,4571	0,8378	0,9679	0,1274	0,7107
INRA063	12	4,4666	0,7027	0,9813	0,2824	0,7761
MAF065	6	3,8455	0,8378	0,9567	0,1221	0,7400
MAF214	6	3,9396	0,8649	0,9577	0,0953	0,7462
INRA005	10	6,1806	0,8649	0,9838	0,1205	0,8382
INRA023	9	6,7605	0,9459	0,9836	0,0380	0,8521
Среднее значение	9	4,6029	0,7748	0,9727	0,2011	0,7658

В исследуемой популяции овец число идентифицированных аллелей (Na) варьировало от 6 до 12, причем минимальное количество в локусах MAF065 и MAF214, а максимальное в локусах CSRD247 и INRA063.

В исследуемой группе животных наблюдаемая гетерозиготность (Ho) варьировала от 59 % (локус ETH152) до 94 % (локус INRA023), а ожидаемая (He) – от 95 % (локус MAF065) до 98 % (локус INRA005). Во всех исследуемых локусах ожидаемая гетерозиготность превышала наблюдаемую.

Анализ показателя индекса фиксации Fis показал, что практически все локусы отличаются смещением равновесия в сторону недостатка гетерозигот (минимальное значение $Fis = 0,0380$ в локусе INRA023 и максимальное $Fis = 0,3883$ в локусе ETH152). В группе исследованных животных все STR-локусы имели $PI_C > 0,5$, что указывает на их высокую информативность.

Результаты генетической дифференциации овец породы Суффолк по STR-локусам представлены в табл. 4.

Таблица 4. Характеристика генетической дифференциации овец породы Суффолк по STR-локусам

STR-локус	Число аллелей (Na)	Уровень полиморфности (Ae)	Наблюдаемая гетерозиготность (Ho)	Ожидаемая гетерозиготность (He)	Индекс фиксации (Fis)	Величина информативной ценности (PIC)
McM042	11	5,5556	0,7923	0,9836	0,1940	0,8200
INRA006	11	6,2281	0,7462	0,9854	0,2425	0,8394
McM527	7	4,5930	0,7077	0,9689	0,2688	0,7823
ETH152	8	3,6541	0,6308	0,9658	0,3439	0,7263
CSRD247	15	4,2610	0,7077	0,9844	0,2788	0,7653
OarFCB20	12	5,8498	0,8846	0,9858	0,1018	0,8291
INRA172	9	3,2657	0,8385	0,9660	0,1234	0,6938
INRA063	13	6,0041	0,8154	0,9872	0,1736	0,8334
MAF065	6	4,0291	0,8538	0,9586	0,1075	0,7518
MAF214	9	4,1692	0,7846	0,9733	0,1922	0,7601
INRA005	12	7,2269	0,8538	0,9885	0,1360	0,8616
INRA023	10	7,7808	0,8923	0,9871	0,0959	0,8715
Среднее значение	10,25	5,2181	0,7923	0,9779	0,1882	0,7946

В исследуемой популяции овец число идентифицированных аллелей (Na) варьировало от 6 до 15, причем минимальное количество в локусе MAF065, а максимальное в локусе CSRD247.

В исследуемой группе животных наблюдаемая гетерозиготность (Ho) варьировала от 63 % (локус ETH152) до 89 % (локус INRA023), а ожидаемая (He) – от 96 % (локус ETH152) до 98 % (локус INRA063). Во всех исследуемых локусах ожидаемая гетерозиготность превышала наблюдаемую.

Анализ показателя индекса фиксации Fis показал, что практически все локусы отличаются смещением равновесия в сторону недостатка гетерозигот (минимальное значение $Fis = 0,0959$ в локусе

INRA023 и максимальное $F_{is}=0,3439$ в локусе ETH152). В группе исследованных животных все STR-локусы имели $PI_C > 0,5$, что указывает на их высокую информативность.

После изучения генетической дифференциации овец различных пород по STR локусам нами был проведен кластерный анализ генетических расстояний между изучаемыми породами овец, который позволяет нам определить генетическое сходство между породами.

Для изучения генетического расстояния между породами овец мы использовали рассчитанные частоты встречаемости аллелей 12 STR-локусов (табл. 5).

Таблица 5. Генетические расстояния овец различных пород, разводимых в Республике Беларусь по STR-локусам

Породы	Дорпер	Иль-де-Франс	Тексель	Суффолк
Дорпер	–			
Иль-де-Франс	0,1300	–		
Тексель	0,2130	0,0333	–	
Суффолк	0,1814	0,0345	0,0137	–

В результате проведенных исследований видно, что наименьшее генетическое расстояние наблюдалась между породами Тексель и Суффолк и составило 0,0137, а самое высокое генетическое расстояние было выявлено между породами овец Дорпер и Тексель 0,2130 что свидетельствует о их меньшем генетическом сходстве.

Заключение

В результате изучения межпородной дифференциации пород овец по STR-локусам, было установлено небольшое содержание гетерозиготных генотипов во всех изучаемых группах животных, об этом свидетельствует значения индекса фиксации Райта (F_{is}) который колебался в зависимости от породы от 0,1882 в породе Суффолк до 0,3703 в породе Дорпер. Небольшое генетическое расстояние, между изучаемыми породами овец варьирующее от 0,0137 до 0,2130 свидетельствует о возможном сокращении генетического разнообразия овец, разводимых на территории Республики Беларусь, и требует обязательного расширения генетического разнообразия за счет прилития крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Постановление Совета Министров Республики Беларусь 30.04.2019 № 268 «Об утверждении комплекса мер по развитию овцеводства в Республике Беларусь на 2019–2025 годы».
2. Kusza S., Dimov D., Nagy I., Bősze Z., Jávorand A., Kukovics S. Microsatellite analysis to estimate genetic relationships among five bulgarian sheep breeds. *Gen. Molec. Biol.* 2010; 33:51–56.
3. Ferrando, Ainhoa et al. Genetic relationships between six eastern Pyrenean sheep breeds assessed using microsatellites. *Spanish Journal of Agricultural Research*, [S.l.], v. 12, n. 4, p. 1029-1037, nov. 2014.
4. Ameer Ameer Abdelkader, Nezih Ata, Mohammed Tahar Benyoucef, Amel Djaout, Noureddine Azzi, Onur Yilmaz, İbrahim Cemal & Semir Bechir Suheil Gaouar (2018) New genetic identification and characterisation of 12 Algerian sheep breeds by microsatellite markers, *Italian Journal of Animal Science*, 17:1, 38–48.