

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ ЖИВОТНЫХ

Е. Г. Евдокимов^{1,3}, Ю. И. Малина^{1,2}

¹Ярославский НИИЖК – филиал ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса»,

г. Ярославль, Россия, yaniizhk@yandex.ru

²ФГБОУ ВО ЯГСХА, г. Ярославль, Россия

³ФГБОУ ВО ЯрГУ, г. Ярославль, Россия

Описаны три группы методов, используемые в селекции животных. Эти методы позволяют получить важную информацию о первичной последовательности ДНК животных, на основе которой можно прогнозировать продуктивные качества изучаемой популяции и корректировать проведение селекционных мероприятий.

Ключевые слова: *методы, ПЦР-ПДРФ, ISSR, генетическое расстояние, селекция, микросателлиты.*

В настоящее время очень важной является направленная селекция для достижения планируемых результатов. Для получения точной информации о характеристиках животных и популяции в целом необходимо применять достижения, полученные в областях молекулярной биологии и популяционной генетики. Информация о первичной последовательности ДНК, полученная с помощью ДНК-технологий, позволяет разрабатывать маркерные системы и проводить маркер-ассоциированную селекцию.

Эти технологии основаны на знании о центральной догме молекулярной биологии. Информация, закодированная в первичной последовательности ДНК, напрямую оказывает влияние на формируемый фенотип животного. Посредством синтеза мРНК с последовательности ДНК информация передается на рибосомы, где формируются белки. Совокупность белков вызывает формирование признаков и фенотипа в целом [1]. Иными словами, от первичной последовательности будет во многом зависеть продуктивность животных, продолжительность их жизни, а также плодовитость. Поэтому для определения вероятных качеств животных и их потомства необходимо использовать точные методы, позволяющие получать информацию о структуре ДНК и делать проверяемые предположения о вероятных качествах потомства и, самое главное, получать информацию, необходимую для применения впоследствии в селекционных программах.

Известно, что в селекционной работе применяют отбор животных на основе наличия или отсутствия генетических маркеров [5]. При на-

личии данных о генотипе родителей по определенному маркеру у исследователей появляется возможность оценить вероятность получения в потомстве животных с нужным генотипом и соответственно с нужными продуктивными признаками. На рисунке изображен вариант применения вышеуказанных принципов на практике (рис. 1).

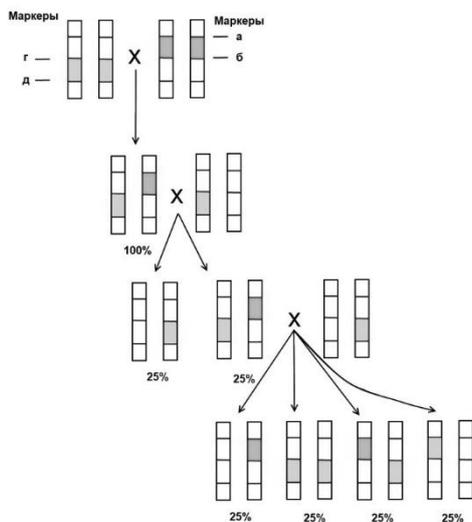


Рис. 1. Применение принципов селекции на основе молекулярных маркеров

На основе этих принципов базируется большинство методов. Известным методом для оценки разнообразия в популяции и сравнения популяций между собой является метод ISSR (межмикросателлитный полиморфизм) [14]. Для анализа используют праймеры, комплементарные микросателлитным повторам с якорным нуклеотидом. Это позволяет амплифицировать фрагменты ДНК, находящиеся между инвертированными микросателлитными последовательностями. Фрагменты разделяются на электрофорезе, в результате получается последовательность полос, специфичная для вида или для породы. Такая уникальная картина для каждого животного используется как «отпечаток пальца».

Большими плюсами этого метода являются быстрота, воспроизводимость и низкие затраты на получение результатов по сравнению с другими методами. При этом для его использования достаточно иметь основной набор оборудования и относительно доступное программное обеспечение, необходимое для анализа. Особенностью ISSR является то, что при его применении анализируются маркеры, рассредоточенные по всему геному [2].

Благодаря этому методу появляется возможность выявления внутри- и межвидовой генетической изменчивости. Это позволяет оценить расхождение особей в популяции, найти особей, несущих редкие аллели и тем самым оценить структуру исследуемой популяции. И, с учетом

этой информации, перенаправить вектор селекционной работы.

Следующей группой методов, важных для оценки селекционной ценности животных, является изучение точечных мутаций в последовательности ДНК конкретных генов. Для большинства сельскохозяйственных животных существуют геномные карты, позволяющие находить локусы количественных признаков (QTL) [12].

Для исследования этих участков применяются различные методы, имеющие в своей основе принцип определения однонуклеотидной замены.

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Этот метод основан на амплификации исследуемого участка гена заданной длины. К месту положения искомой замены ищут подходящий сайт рестрикции. Далее, с использованием специфичных ферментов-рестриктаз, исследуют наличие или отсутствие специфического сайта рестрикции. Наличие сайта рестрикции приводит к разрезанию фрагмента ДНК. В результате на агарозном гель-электрофорезе получается специфичная картина для каждого варианта аллеля [10]. Таким образом можно определять точечные замены для большинства случаев. Единственным ограничением для применения данного метода является необходимость подбора соответствующей рестриктазы под конкретную замену в сайте рестрикции [4].

Аллельспецифичная ПЦР. Позволяет оценить наличие точечной замены посредством точного присоединения праймера ПЦР. В основе метода лежит создание двух прямых праймеров, отличных только по искомой замене. Наличие результатов амплификации на агарозном гель-электрофорезе будет свидетельствовать о наличии той или иной замены [6].

Одноцепочечный конформационный полиморфизм. Позволяет анализировать последовательности в случае, когда не применим ПЦР-ПДРФ метод. В этом случае проводится денатурация (раскручивание и разделение на одноцепочечные молекулы) ДНК. Одноцепочечная ДНК сворачивается определенным образом. Способ скручивания зависит от структуры ДНК, поэтому для каждого аллеля формируется уникальная конформация. Полученные одноцепочечные фрагменты разделяются на гель-электрофорезе в ПААГ, в котором видна специфичная картина, уникальная для каждой комбинации аллелей [11].

Преимуществами метода являются высокая точность и воспроизводимость полученных результатов, что обеспечивается специфичностью работы рестриктаз.

Но при этом такой подход имеет ряд особенностей. С помощью этих методов можно оценить только одну замену только в одном гене. Для изучения большого количества замен тратится значительное коли-

чество времени и ресурсов. Кроме того, для применения этой группы методов необходима информация о первичной последовательности.

Особой задачей при исследовании точечных замен в генах, ответственных за количественные признаки, является подбор специфичных праймеров, которые позволили бы точно амплифицировать нужный фрагмент ДНК [3; 9]. Подробно принцип и способы подбора праймеров были разобраны в статье Р. Р. Гарафутдинова с соавторами [3].

Третьей группой методов является использование коротких высокополиморфных tandemных повторов для анализа генетического разнообразия внутри популяции, родства особей в популяции и достоверного установления отцовства.

Микросателлиты — это локусы, содержащие короткие tandemные повторы (STR), известные также как микросателлитные локусы (рис. 2).

```
5'- ggacttccat ttaataagac cccactccc tggaaagaaa tatgtgtgtg tgtgtgtgtg  
tgtgtgtgtg tgtgtgtacg tattcatccc acacatggtg agacacccag antnctctag-3'
```

Рис. 2. Пример микросателлитной последовательности

Такие локусы могут попадать в структуру генов или частично находиться в регуляторных областях, определяющих работу генов, и тем самым влиять на первичную структуру белка и, следовательно, на проявление признака [8; 13].

Зачастую для анализа на родственные отношения отбираются локусы, имеющие высокую полиморфность. Такое свойство дает возможность определить наличие аллелей у родителей и детей и оценить достоверность происхождения.

К минусам такого подхода можно отнести высокие затраты на реактивы, а также потребность в дорогостоящем оборудовании. Неоспоримым плюсом данного метода являются высокая воспроизводимость и точность полученных результатов. Исследование большого количества локусов позволяет оценить принадлежность животного к определенной породной группе или линии, наследование ключевых характеристик, что повышает его ценность для дальнейшей селекции.

На основе этих данных можно оценить структуру популяции и определить наличие отдельных кластеров животных [7], впоследствии выявить ключевые характеристики каждого кластера и оценить возможность и ценность применения особей этого кластера для селекции, поскольку при сравнении выявляются наиболее перспективные в отношении интересующего признака животные (рис. 3).

Здесь приведена кластеризация (нетелей) по нашим данным. По вертикали откладывается вероятность попадания особи в тот или иной

кластер. Такое распределение позволяет оценить структуру популяции и выявить отличающихся особей.

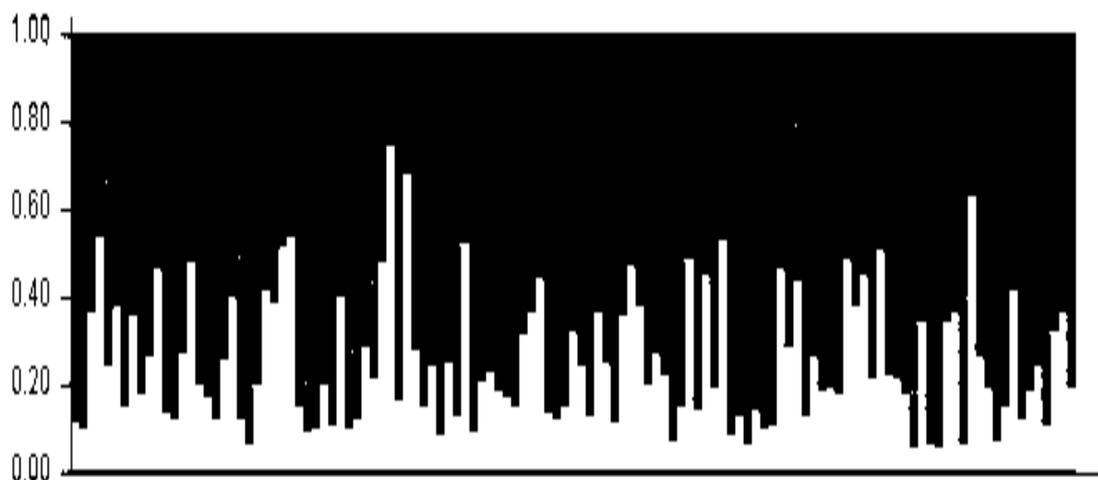


Рис. 3. Пример визуализации вероятностей отнесения особей к различным кластерам

Информация, полученная таким образом, может быть обработана математически. На основе полученных данных рассчитываются:

- генетическое расстояние по Нью;
- коэффициент генетической оригинальности;
- индекс информации Шеннона I;
- F-статистики;
- равновесие популяции по закону Харди-Вайнберга.

Данные показатели позволяют оценить внутреннюю структуру популяции и сравнить популяции между собой, что дает возможность точнее направить селекционное воздействие. В связи с этим метод ISSR анализа, изучение точечных замен и полиморфизма микросателлитов можно применять во всех хозяйствах для улучшения показателей продуктивности и поддержания оптимальной генетической структуры популяций.

Литература

1. Бородин П. Е., Бородин Е. А., Войцеховский В. В. От молекулярной биологии к молекулярной и персонифицированной медицине — медицине XXI века // Амурский медицинский журнал. – 2017. – № 1 (17). – С. 68–73.
2. Воронкова В. Н., Цэндсурэн Ц., Сулимова Г. Е. Сравнительный анализ информативности ISSR-маркеров для оценки генетического разнообразия пород лошадей // Генетика. – 2011. – Т. 47. – №. 8. – С. 1131–1134.
3. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора / Р. Р. Гарафутдинов [и др.] // Биомика. – 2019. – № 11 (1). – С. 23–70.

4. Колосов Ю. А., Гетманцева Л. В., Широкова Н. В. Полиморфизм гена (GDF9) у овец сальской породы // Ветеринарная патология. – 2014. – № 3. – С. 1–7.
5. Биотехнологические методы изучения полиморфизма гена гормона роста / Ю. А. Колосов [и др.] // Дальневосточный аграрный вестник. – 2017. – № 2 (42). – С. 82–86.
6. Нестерук Л. В. Генетический полиморфизм романовской породы овец : дис. ... канд. биол. наук / Ин-т общ. генетики им. Н.И. Вавилова РАН. – М., 2016. – 119 с.
7. Селионова М. И., Луцихина Е. М., Чижова Л. Н. Особенности микросателлитного профиля овец, разводимых в условиях Кыргызстана // Сельскохозяйственный журнал. – 2018. – № 1 (11). – С. 84–90.
8. Аллелофонд башкирской популяции черно-пестрого скота по микросателлитам в связи с показателями молочной продуктивности коров / А. А. Траспов [и др.] // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2011. – № 1. – С. 65–68.
9. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных) / Д. А. Чемерис [и др.] // Биомика. – 2016. – № 8 (3). – С. 215–238.
10. Оптимизация техники проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования овец / Н. В. Широкова [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 113. – С. 1473–1481.
11. Юрова Е. А., Жижин Н. А., Фильчакова С. А. Применение молекулярно-генетических методов анализа для идентификации видовой принадлежности сырьевого состава пищевой продукции // Вестник Мурманского государственного технического университета. – 2020. – Вып. 3. Т. 23. – С. 214–223.
12. Cohen-Zinder M., Seroussi E., Larkin D., Looor J., Wind A. E., Lee J., Drackley J., Band M., Hernandez A. G., Shani M., Lewin H., Weller J., Ron, M. Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle // Genome research, 15 7, 2005, P. 936–944.
13. DeAtley KL, Rincon G, Farber CR, Medrano JF, Luna-Nevarez P, Enns RM, et al. Genetic analyses involving microsatellite ETH10 genotypes on bovine chromosome 5 and performance trait measures in Angus- and Brahmaninfluenced cattle // Journal of Animal Science. 2011; 89(7). – P. 2031–2041.
14. Nesteruk L. V., Makarova N. N., Evsyukov A. N., Svishcheva G. R., Lhasaranov B. B., Stolpovsky Ya. Comparative Estimate of the Sheep Breed Gene Pools using ISSR Analysis // Genetika, 2016, 52(3), P. 346–56.

MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS IN ANIMAL BREEDING

E. G. Evdokimov, Yu. I. Malina

The article describes three groups of methods used in animal breeding. These methods allow us to obtain important information about the primary DNA sequence of animals, on the basis of which it is possible to predict the productive qualities of the studied population and adjust the conduct of breeding activities.

Keywords: *methods, PCR-RFLP, ISSR, genetic distance, breeding, microsatellites.*