

В. И. Тыщенко

Генетическая изменчивость в 3-х популяциях межпородных гибридов генофондных кур биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ

Аннотация. Генофондные породы кур во всем мире рассматриваются как источник ценных генов, которые могут оказаться востребованными в программах селекции при изменении рыночной конъюнктуры и, соответственно, требований к качеству птицеводческой продукции. Выявление генетических изменений, происходящих при скрещивании таких пород, является предметом исследований, так как эти данные могут решить некоторые аспекты наследования ценных генотипов в поколениях птицы. В лаборатории молекулярной генетики с применением ряда современных методик на протяжении многих лет изучается генофондная птица. Данное исследование является продолжением таких работ. В качестве объекта исследований были выбраны двухпородные гибриды нескольких генофондных пород кур биоресурсной коллекции в количестве 45 голов, кровь из подкрыльцовой вены отбирали в вакуумные пробирки для последующего выделения ДНК. Высокомолекулярная геномная ДНК затем анализировалась методом ДНК-фингерпринтинга с меченым олигонуклеотидным зондом для выявления гипервариабельных участков в геноме кур. Распределение фрагментов ДНК на нейлоновых фильтрах изучали путем попарного сравнения во всех образцах с расчетом числа общих и различающихся фрагментов. Данные заносили в таблицу и дальнейшие расчеты производили по компьютерной программе Gelstats™. Зная генеалогию исходных генофондных пород кур, было интересно проследить наследование гипервариабельных участков генома при скрещивании этих пород в следующем гибридном поколении. В работе представлены также данные по маркерным фрагментам ДНК, которые являются характерными для отдельных популяций. Кроме того, изложены результаты по внутрипопуляционной генетической вариабельности, выраженные в виде средней гетерозиготности. Вероятность встречаемости идентичных генотипов у особей в популяции по всем выявляемым фрагментам ДНК была крайне низкой, что говорит о высокой разрешающей способности использованного метода.

Ключевые слова: генофондные породы кур, олигонуклеотидный зонд, ДНК-фингерпринтинг, генетическая вариабельность, гетерозиготность.

Автор:

Тыщенко Валентина Ивановна — кандидат биологических наук, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 196601, Россия, Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское ш. 55а; e-mail: Tinatvi@mail.ru.

Введение. Многие исследователи в последнее время отмечают, что генетическое разнообразие современных промышленных пород кур значительно ниже, чем у диких предшественников и аналогов. Происходит быстрое сокращение не только числа видов животных, но и снижение биоразнообразия видов и пород животных. Все это подчеркивает необходимость сохранения существующих пород, которые могут оказаться носителями ценных генотипов для их вовлечения в селекционный процесс в будущем [1, 2]. Приспособленность местных пород кур к окружающей среде формировалась на протяжении тысячелетий, в результате чего образовались комплексы взаимодействующих между собой генов, обеспечивающих уникальные свойства их носителям. К таким

свойствам можно отнести генетически детерминированную устойчивость к определенным штаммам патогенных микроорганизмов [3], приспособленность к суровому климату, низкокалорийному или несбалансированному с современной точки зрения питанию и т.д. Во многих случаях генофондные породы являются малочисленными, что создает угрозу чрезмерного повышения гомозиготности и нарастанию инбредной депрессии. Последняя выражается в виде снижения жизнеспособности, продуктивности и воспроизводительных качеств. Аллельное разнообразие снижается, популяция утрачивает свое биоразнообразие и способность противостоять изменению окружающей среды. Генетический дрейф может еще больше усугубить положение, приводя к взрывообразному

накоплению вредных и летальных генетических аномалий [4].

Материалы и методы.

А) Объект исследования. Объектом исследования были двухпородные гибриды кур: Брама х Суссекс, Узбекская х Амрокс, Суссекс х Амрокс по 15 голов в каждой группе (табл. 1), от которых отбирали кровь в пробирки с ЭДТА в количестве 0,5 мл. и хранили при -20°C до использования. Гибриды Узбекская бойцовая х Амрокс создаются для сочетания крупности Узбекской бойцовой и крупной породы комбинированного направления продуктивности, имеющей хорошую яйценоскость — Амрокс. Аутосексность потомства обеспечивается наличием сцепленного с полом гена полосатости оперения *Barring*. Петухи породы Узбекская бойцовая *b/b* спариваются с полосатыми курицами породы Амрокс *B/-*. В суточном возрасте петушки от такого скрещивания имеют генотип *B/b* и отличаются наличием белого пятна на голове, а курочки генотипа *b/-* такого пятна не имеют. Гибриды Суссекс х Амрокс создают для получения аутосексного потомства с высокой жизнеспособностью и хорошей яичной продуктивностью. Курицы от этого скрещивания могут быть материнской формой для следующего этапа скрещивания. Аутосексность молодняка достигается скрещиванием петухов породы Суссекс *b/b* с полосатыми курицами породы Амрокс *B/-*. В суточном возрасте петушки от такого скрещивания имеют генотип *B/b* и отличаются наличием белого пятна на голове, а курочки генотипа *b/-* такого пятна не имеют. Гибриды Суссекс х Брама создаются для сочетания тяжелой породы Брама и крупной породы комбинированного направления продуктивности, имеющей хорошую яйценоскость — Суссекс. Последняя более яйценоская, поэтому чаще используется в качестве материнской формы.

Б) Выделение ДНК и расщепление эндонуклеазой рестрикции. ДНК выделяли стандартным фенольным методом с использованием протеиназы *K* для расщепления белков в препаратах. Ферментативное расщепление ДНК в количестве 10 мкг проводили ферментом *BsuRI* (Thermo Scientific). В пробирку помещали 90 мкл раствора ДНК, затем прибавляли 10 мкл 10-кратного буфера для рестриктазы *BsuRI*. Готовую реакционную смесь инкубировали при 37°C 3 часа.

В) Электрофорез, перенос на нейлоновую мембрану. После расщепления фрагменты ДНК разделяли по размеру в электрофорезе с 0,8% агарозным гелем в течение 45 часов при напряжении 50 В. Гель затем денатурировали 40 минут в щелочном растворе, содержащем 0,5 М NaOH и 1,5 М

NaCl и нейтрализовали в растворе 0,5 М Трис и 1,5 М NaCl . Перенос одноцепочечной ДНК с геля на нейлоновый фильтр осуществляли под вакуумом 50 мбар в течение 1 часа в приборе для вакуумного переноса (GE Healthcare).

Г) Молекулярная гибридизация. Прегибридизация проводилась в течение не менее 2-х часов в буфере, содержащем блокирующий агент фирмы Roche® при температуре 45°C . Такая же температура используется в реакции гибридизации, когда геномная ДНК на фильтре связывается с меченым дезоксигенином зондом (ГТГ)5. Время гибридизации составляло 30 минут. Отмывание от невключившейся метки проводили на шейкере 3 раза по 5 минут при температуре 45°C в буфере SSC (0,15 М NaCl — 0,015 М цитрат натрия).

Д) Детекция сигнала. Отмытые от невключившейся метки фильтры инкубировали с легким покачиванием на шейкере 1 минуту в буфере следующего состава: 0,1 М малеиновая кислота pH 7,5—0,15 М NaCl (буфер 1). После этого фильтр обрабатывали блокирующим буфером, аналогичным предыдущему, но с включением в состав 1% блокирующего агента (Blocking Agent, фирма RocheT). Инкубацию на шейкере продолжали в течение 30 минут. Фильтр переносили на чистую ровную поверхность (стекло), наносили 5 мл блокирующего буфера, содержащего конъюгированные антитела к дезоксигенину/щелочной фосфатазе (1:1000). Взаимодействие с антителами происходило в течение 30 минут. После инкубации с антителами фильтр отмывали в буфере 1 на шейкере 2 раза по 10 минут каждый. При этом удаляются все несвязанные с фильтром антитела. Фермент проявляет активность при наличии в растворе двух субстратов: 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфата (BCIP) и нитро голубой тетразолия хлорида (NBT). Рабочие концентрации субстратов составляют 0,075 мг/мл в щелочном буфере состава: 0,1 М Трис-HCL pH 9,5 — 0,1 М NaCl . Фильтр помещали в ванночку, туда вносили щелочной буфер с субстратами. Наиболее интенсивные полосы начинали проявляться уже через несколько минут. В целом, проявление заканчивается через 12 часов действия щелочной фосфатазы. При этом формируются полосы картин фингерпринтинга, число и распределение которых характерно для каждой особи.

Е) Расчеты популяционно-генетических параметров. Определение генетической близости сравниваемых групп животных проводили на основе вычисления коэффициента сходства (BS), являющегося средним показателем при сравнении всех возможных парных комбинаций животных в группах. BS рассчитывали по формуле:

$$BS = \frac{2B_{xy}}{B_x + B_y},$$

где BS — коэффициент сходства,

B_{xy} — количество идентичных полос у сравниваемых двух животных,

B_x и B_y — общее число полос у животного x и y , соответственно.

Популяционная частота (q) рассчитывается исходя из распределения аллелей в популяции:

$$q = 1 - \sqrt{1 - S_k},$$

где S_k — частота встречаемости k -ой полосы на фильтре у исследованных животных.

Анализ внутрипопуляционной генетической вариабельности проводили на основании расчетов средней гетерозиготности по формуле:

$$H = \frac{2n}{2n-1} \times \left[\frac{\sum_{k=1}^A S_k}{A - \sum_{k=1}^A \sqrt{1 - S_k}} - 1 \right],$$

где H — средняя гетерозиготность,

S_k — частота встречаемости k -ой полосы у исследованных животных,

A — наблюдаемое число различных полос на фильтре,

n — количество исследованных животных.

Результаты исследований.

Расчет коэффициентов сходства (BS) внутри популяций гибридов показывает, что наибольшую близость по числу общих фрагментов ДНК продемонстрировал гибрид Узбекская х Амрокс ($BS = 0,56$), а наименьшую — гибрид Суссекс х Амрокс ($BS = 0,48$). Ярко выраженной генетической

разницы по критерию генетического расстояния (D) между двухпородными гибридами выявлено не было. Несколько удаленными друг от друга были гибриды Брама х Суссекс и Узбекская х Амрокс ($D = 0,070$), в то же время относительно близкими оказались гибриды Узбекская х Амрокс и Суссекс х Амрокс ($D = 0,040$). Наблюдается обратно пропорциональная связь между уровнем межпопуляционным коэффициентом сходства (BS^2) и генетической удаленностью, что соответствует ожиданиям (табл. 2).

Использование программы Gelstats™ позволило рассчитать также внутрипопуляционное разнообразие по критерию средней гетерозиготности (H). В целом, отмечается высокое разнообразие, что не удивительно, принимая во внимание гибридную природу изучаемой птицы. Установлено, что максимальная гетерозиготность была в группе Суссекс х Амрокс ($H = 0,65$), а минимальная — Узбекская х Амрокс ($H = 0,54$). Интересно, что больших различий по разнообразию, которое мы наблюдали ранее в группах чистопородной птицы, выявлено не было.

В отдельных случаях удалось выявить маркерные фрагменты ДНК, характерные для отдельных групп птицы. Например, гибриды Брама х Суссекс имеют фрагмент на фильтре №10 с частотой 0,87, этот же фрагмент встречался в гибридах Узбекская х Амрокс с частотой 0,27, с такой же частотой фрагмент наблюдали в гибридах Суссекс х Амрокс.

Таким образом, мультилокусный анализ геномной ДНК является эффективным инструментом выявления генетических особенностей не только в чистопородной птице, но и в двухпородных гибридах. Полученные данные могут быть использованы при планировании скрещивания разных пород кур с целью получения и закрепления в потомстве новых желательных признаков.

Таблица 1. Исходные породы кур и их основные характеристики при получении анализируемых гибридов

Породы кур	Метод выведения	Породы, участвовавшие (или предположительно участвовавшие) в выведении птицы	Тип	Яйценоскость, шт. яиц в год	Живая масса, кг	Масса яйца, г
Суссекс светлый	Скрещивание	Доркинг, Корниш, Кохинхин, Орпингтон, Брама	Мясо-яичный	155–170	♂3,0–4,0 ♀2,5–3,1	59–61
Узбекская бойцовая	Скрещивание	Аборигенная порода, разведена в Средней Азии	Мясо-яичный	100–120	♂4,0–6,0 ♀2,8–3,5	59–61
Брама светлая	Скрещивание	Малайские куры и Кохинхины	Мясо-яичный	130–150	3,5–5,0 3,0–4,5	57–59
Амрокс	Скрещивание	Доминиканские и Явайские куры, Кохинхины	Мясо-яичный	160–180	3,0–4,5 2,5–3,0	59–60

Таблица 2. Внутри- и межпопуляционные генетические параметры в двухпородных гибридах кур, выявляемые методом ДНК-фингерпринтинга

Двух породные гибриды кур	n	Полос на дорожку $x \pm m$	P	BS ¹	BS ²	D
Брама х Суссекс	15	32,00 ± 2,57	1,07×10 ⁻⁹	0,52		
Узбекская х Амрокс	15	35,47 ± 2,10	1,44×10 ⁻⁹	0,56	0,47	0,070
Брама х Суссекс	15	32,00 ± 2,57	1,07×10 ⁻⁹	0,52		
Суссекс х Амрокс	15	33,53 ± 2,77	1,49×10 ⁻¹¹	0,48	0,44	0,060
Узбекская х Амрокс	15	35,47 ± 2,10	1,44×10 ⁻⁹	0,56		
Суссекс х Амрокс	15	33,53 ± 2,77	1,49×10 ⁻¹¹	0,48	0,48	0,040

P — вероятность встречаемости двух особей с идентичным набором фрагментов ДНК

BS¹ — коэффициент сходства внутри групп

BS² — коэффициент сходства между группами

D — генетическое расстояние

Таблица 3. Внутрипопуляционная генетическая вариабельность (средняя гетерозиготность) в двухпородных гибридах кур выявляемая методом ДНК-фингерпринтинга

Двух-породные гибриды кур	n	Число локусов	Число аллелей	Число полиморфных локусов	H
Брама х Суссекс	15	20,24	3,66	0,95	0,58
Узбекская х Амрокс	15	23,00	3,26	0,91	0,54
Суссекс х Амрокс	15	20,31	3,74	1,00	0,65

Настоящая работа была проведена в рамках выполнения задания Федерального агентства научных организаций (ФАНО) № ГЗ АААА-А18-118021590138-1 в 2018 году

Литература

1. Тыщенко В. И. Популяционно-генетическая изменчивость в линиях индеек Белой широкогрудой породы / В. И. Тыщенко, В. П. Терлецкий, Т. Э. Позднякова // Известия СПбГАУ. — 2016. — № 43. — С. 144–148.
2. Karp A. Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges / A. Karp, K. Edwards, M. Bruford, S. Funk, B. Vosman, M. Morgante, O. Seberg, A. Kremer, P. Boursot, P. Arcander, D. Tautz, G.M. Hewitt // Nature Biotechnology. — 1997. — V. 15. — P. 625–628.
3. Терлецкий В. П. Эффективный молекулярно-генетический метод идентификации штаммов сальмонелл и протей / В. П. Терлецкий, В. И. Тыщенко, О. Б. Новикова, А. Н. Борисенкова, Д. Э. Белаш, А. Ф. Яковлев // Доклады РАСХН. — 2013. — № 5. — С. 60–63.
4. Weigend S. Current strategies for the assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources / S. Weigend, M.N. Romanov // World's Poultry Science. — 2001. — Vol. 3. — P. 2752–2788.

Tyshchenko V. I.

Genetic variability in 3 populations of interbreed hybrids of gene pool chicken of Bioresource collection of RRIFAGB

Abstract. Gene pool breeds of chickens around the world are considered as a source of valuable genes, which may be in demand in breeding programs when market conditions change and, accordingly, the requirements

for the quality of poultry products will appear. Identification of genetic changes occurring when crossing such breeds is the subject of research, since these data can solve some aspects of the inheritance of valuable genotypes in poultry generations. In the laboratory of molecular genetics, using a number of modern techniques for many years, a gene pool poultry has been studied. This study is a continuation of such research. As a research object, two-breed hybrids of several gene pool breeds of the bioresource collection chicken were selected in the number of 45 heads, blood from under the porch vein was taken to vacuum tubes for subsequent DNA isolation. High-molecular genomic DNA was then analyzed by DNA fingerprinting with a labeled oligonucleotide probe to identify hypervariable regions in the chicken genome. The distribution of DNA fragments on nylon filters was studied by pairwise comparison in all samples with calculation of the number of common and different fragments. The data was recorded in a table and further calculations were made using the Gelstats™ computer program. Knowing the genealogy of the original gene pool of hens, it was interesting to trace the inheritance of hypervariable regions of the genome when crossing these breeds in the next hybrid generation. Data on marker DNA fragments that are characteristic of individual populations are also presented. In addition, the results of intrapopulation genetic variability, expressed as the average heterozygosity, are presented. The probability of occurrence of identical genotypes in individuals in the population for all detected DNA fragments was extremely low, which indicates on high resolution of the method used.

Key words: gene pool chicken breeds; oligonucleotide probe; DNA-fingerprinting; genetic variability; heterozygosity.

Author:

Tyshchenko V. I. — PhD (Biol. Sci), senior researcher of the Laboratory of Molecular Genetics; e-mail: Tinatvi@mail.ru; Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry. St. Petersburg, Russia, 196601, Moscow highway, 55a, (812) 465-80-12.

References

1. Tyshchenko V. I. Populyacionno-geneticheskaya izmenchivost' v liniyah indek Beloj shirokogrudoj porody (Population and genetic variability in lines of White widebreast turkey breed) / V. I. Tyshchenko, V. P. Terleckij, T. E.H. Pozdnyakova // Izvestiya SPbGAU. — 2016. — № 43. — S.144-148.
2. Karp A. Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges / A. Karp, K. Edwards, M. Bruford, S. Funk, B. Vosman, M. Morgante, O. Seberg, A. Kremer, P. Boursot, P. Arctander, D.Tautz, G.M. Hewitt // Nature Biotechnology. — 1997. — V. 15. — P. 625–628.
3. Terleckij V. P. Effektivnyj molekulyarno-geneticheskij metod identifikacii shtamov sal'monell i proteya (Effective molecular genetic method of strain identification of Salmonella and Proteus / V. P. Terleckij, V. I. Tyshchenko, O. B. Novikova, A. N. Borisenkova, D. E. Belash, A. F. YAkovlev // Doklady RASKHN. — 2013. — № 5. — S. 60-63.
4. Weigend S. Current strategies for the assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources / S. Weigend, M.N. Romanov // World's Poultry Science. — 2001. — Vol. 3. — P. 2752 — 2788.