

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ТРЕХПОРОДНОГО КРОССА ПО СРАВНЕНИЮ С ИСХОДНЫМИ ПОРОДАМИ КРОЛИКА

ЕГОРОВА Ксения Ивановна, Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева

ГЛАЗКО Валерий Иванович, Российский государственный аграрный университет-МСХА им. К.А. Тимирязева

ШУМИЛИНА Анна Рудольфовна, Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева

КОСОВСКИЙ Глеб Юрьевич, Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева

Выполнен сравнительный анализ полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов (ISSR-PCR-маркеров) у трехпородного кросса кроликов и трех пород, являющихся исходными для данного кросса. По трем тринуклеотидным ISSR-маркерам ((GAG)₆C, (ACC)₆G и (CTC)₆C) было выявлено суммарно 26 локусов, 20 из которых оказались полиморфными. Наиболее изменчивыми оказались спектры ампликонов праймера (CTC)₆C. Выявлена относительно повышенная консолидированность трехпородных кроссов по сравнению с такими исходными породами, как белый великан и советская шиншилла, а также даны уникальные характеристики их генетической структуры по сравнению с исходными породами.

Введение. Одной из существенных проблем кролиководства, как и в целом животноводства, является жизнеспособность потомства, определяющая не только продуктивность отрасли, но и возможности селекционной работы. В этой связи важным направлением является получение межпородных помесей, потенциально имеющих повышенную воспроизводимость.

В Научно-исследовательском институте пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева в результате длительного селекционного процесса путем трехпородных скрещиваний кроликов пород калифорнийская, белый великан и советская шиншилла получены помесные животные. Для оценки особенностей генетической структуры этих трехпородных помесей был выполнен сравнительный анализ результатов полилокусного генотипирования помесных животных и исходных пород. Для данного исследования в качестве маркеров полиморфизма участков генома животных были выбраны ISSR-маркеры (Inter-Simple Sequence Repeat), позволяющие получать спектры геномных фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов [3, 5]. Этот метод позволяет получать одновременно у одного животного более десятка фрагментов ДНК, выделять из них полиморфные и консервативные и, таким образом, выполнять полилокусное генотипирование с использованием в полимеразной цепной реакции в качестве праймера фрагмента одного микросателлитного локуса.

Подбор в качестве праймеров фрагментов нескольких микросателлитов приводит к возможностям оценок генетических структур, как правило, по около 30 локусам (фрагментам геномной ДНК).

Такая полилокусная оценка соответствует геномному сканированию, которое может варьировать от использования нескольких десятков или сотен маркеров до истинного геномного сканирования путем полного секвенирования геномов [1, 4]. В качестве «якорных» последовательностей для получения полилокусных спектров геномной ДНК кроликов, фланкированных инвертированными участками микросателлитных локусов, в настоящей работе использовали последовательности тринуклеотидных микросателлитов – ACC, CTC и GAG.

Методика исследований. В анализ включены образцы крови 40 животных трехмесячного возраста (10 помесных кроликов и по 10 кроликов исходных пород – калифорнийская, советская шиншилла и белый великан), отобранные из ушной краевой вены в количестве 3–5 мл. Все животные находились в условиях шедовой системы содержания (в отделе экспериментального кролиководства Научно-исследовательского института пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева), микроклимат в которой зависит от погоды. Для разведения животных пород калифорнийская, советская шиншилла и белый великан используют чистопородный метод разведения, а помесные животные получены по пятиэтапной схеме скрещивания трех исходных пород.

Из всех образцов цельной крови набором «М-сорб» («Синтол», Россия) была экстрагирована геномная ДНК. Концентрация ДНК была оценена визуально по маркеру (GeneRuler DNA Ladder 100bp, ThermoScientific) после электрофоретического разделения в 1%-м агарозном геле в 1x-трис-ацетатном (ТАЕ) буфере (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM CH₃COOH) после ок-



рашивания бромистым этидием (10 мг/мл) при постоянном напряжении 135 В 40 мин. Гель фотографировали и анализировали под ультрафиолетовыми лучами в системе фотогельдокументации Quantum-ST4 (Vilber Lourmat, Франция).

С данными образцами на амплификаторах «Терцик» (ДНК-технология) и Swift Maxi (Esco, Сингапур) были проведены ПЦР с применением наборов HS-Taq Polymerase dNTP («Евроген», Россия) и ПЦР-РВ («Синтол», Россия), соответственно, по протоколам производителей, в качестве праймеров были использованы разные тринуклеотидные ISSR-маркеры: (ACC)₆G, (GAG)₆C и (CTC)₆C. Условия реакции для амплификатора «Терцик»: 2 мин при 94 °С; 35 циклов – 30 с при 94 °С, 30 с при 55 °С, 1 мин 45 с при 72 °С; 10 мин при 72 °С. Условия реакции для амплификатора Swift Maxi: 2 мин при 95 °С; 40 циклов – 20 с при 94 °С, 20 с при 55 °С, 2 мин при 72 °С; 2 мин при 72 °С.

Реакционная смесь для амплификации на приборе Swift Maxi объемом 10 мкл содержала 5 нг/мкл ДНК-матрицы, смесь dNTP (содержащую 1мМ каждого нуклеотида), 0,5 ед. активности HS-Taq-полимеразы в соответствующем 10х-буфере и 10 мкМ праймера.

Реакционная смесь для амплификации на приборе «Терцик» объемом 25 мкл содержала 5 нг/мкл ДНК-матрицы, смесь dNTP (содержащую 2,5мМ каждого нуклеотида) 0,5 ед. активности SynTaq ДНК-полимеразы в соответствующем 10хПЦР буфере Б и 10 мкМ праймера.

Фракционирование продуктов амплификации проводили в 1,5%-м агарозном геле при постоянном напряжении 135 В 100–120 мин. Длину фрагментов устанавливали, используя ДНК-маркер O'GeneRuler DNA Ladder mix (100-10000 bp) (Thermo Fisher Scientific, США). На основании присутствия либо отсутствия фрагментов ДНК определенной длины были построены бинарные матрицы. В качестве характеристик генетических структур исследованных групп кроликов использовали такие показатели, как доля полиморфных локусов (%) и полиморфное информационное содержание (Polymorphic Information Content – PIC) полученных спектров продуктов амплификации фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами участков микросателлитов ACC, CTC и GAG.

Математическую обработку результатов осуществляли с использованием программ Microsoft Office Excel 2007 и TFPGA. Расчет индекса

PIC выполняли по формуле, используемой для диаллельных локусов,

$$PIC = 2f(1 - f),$$

где f – частота одного из двух аллелей [3], рассчитанная как $f = \sqrt{R}$, R – частота вариантов, у которых отсутствовал фрагмент ДНК соответствующей длины (гомозиготы по «рецессивному» аллелю).

Результаты исследований. В спектрах продуктов амплификации фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами последовательностей (GAG)₆C, (ACC)₆G и (CTC)₆C, суммарно выявлено соответственно 7, 12 и 7 фрагментов ДНК. Наиболее сложные спектры у кроликов наблюдались при использовании в полимеразной цепной реакции в качестве праймера последовательности (ACC)₆G. Полиморфное информационное содержание и доля полиморфных локусов в спектрах продуктов амплификации (ампликонов) у исследованных групп кроликов представлены в таблице.

Полученные данные свидетельствуют о том, что характеристики полиморфизма отличаются в зависимости от используемого праймера. Наиболее полиморфные спектры ампликонов по доле полиморфных локусов и PIC получены при использовании в качестве праймера последовательности (CTC)₆C.

Характеристики спектров двух других праймеров имели выраженные особенности для разных групп исследованных кроликов. Так, в спектрах (ACC)₆G по доле полиморфных локусов наиболее полиморфными были кролики породы белый великан, наименее – калифорнийской породы и советская шиншилла; в спектрах (GAG)₆C – наименее полиморфными были кролики трехпородного кросса (см. таблицу). В целом среди исследованных групп кроликов наименее полиморфными оказались в большинстве случаев кролики калифорнийской породы и трехпородного кросса, наиболее – пород белый великан и советская шиншилла.

На основании частот встречаемости фрагментов ДНК разной длины в спектрах ампликонов, полученных с использованием в качестве праймеров фрагментов микросателлитов (GAG)₆C, (ACC)₆G и (CTC)₆C, рассчитаны генетические расстояния между группами исследованных кроликов и построены соответствующие дендрограммы, позволяющие оценить генетические взаимоотношения между ними. Полученные дендрограммы представлены на рис. 1–4.

Полиморфное информационное содержание (PIC) и доля полиморфных локусов, %, у трехпородного кросса и исходных пород

Порода	(ACC) ₆ G		(CTC) ₆ C		(GAG) ₆ C	
	доля полиморфных локусов, %	PIC _{cp}	доля полиморфных локусов, %	PIC _{cp}	доля полиморфных локусов, %	PIC _{cp}
Трехпородный кросс	41,7	0,134	57,1	0,210	28,6	0,113
Калифорнийская	33,3	0,122	42,9	0,172	42,9	0,125
Белый великан	50,0	0,134	71,4	0,278	57,1	0,223
Советская шиншилла	33,3	0,148	85,7	0,347	42,9	0,155



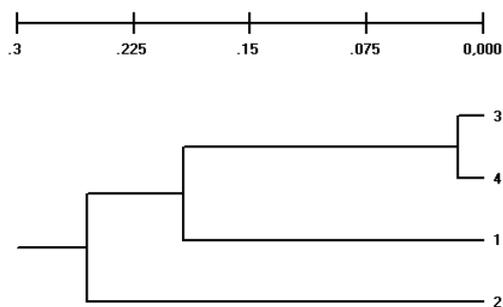


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основании генетических расстояний, рассчитанных по ампликонам спектра праймера $(ACC)_6G$: 1 – трехпородный кросс; 2 – калифорнийская порода; 3 – белый великан; 4 – советская шиншилла

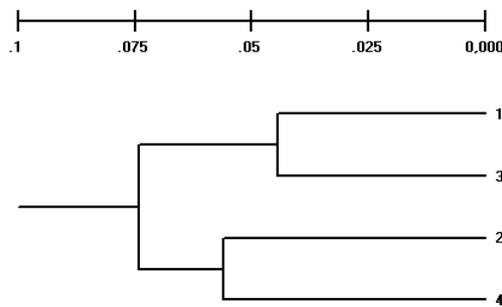


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основании генетических расстояний, рассчитанных по ампликонам спектра праймера $(CTC)_6C$: 1 – трехпородный кросс; 2 – советская шиншилла; 3 – калифорнийская порода; 4 – белый великан

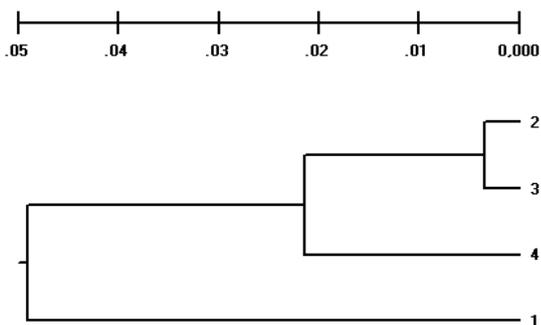


Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основании генетических расстояний, рассчитанных по ампликонам спектра праймера $(GAG)_6C$: 1 – белый великан; 2 – советская шиншилла; 3 – калифорнийская порода; 4 – трехпородный кросс

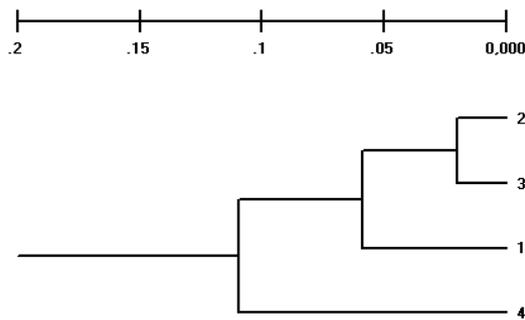


Рис. 4. Дендрограмма, построенная на основании генетических расстояний, рассчитанных по ампликонам спектров праймеров $(GAG)_6C$, $(ACC)_6G$ и $(CTC)_6C$: 1 – белый великан; 2 – советская шиншилла; 3 – калифорнийская порода; 4 – трехпородный кросс

Дендрограмма, построенная на основании ампликонов спектра $(ACC)_6G$, характеризуется наличием кластера, объединяющего группы кроликов пород белый великан и советская шиншилла (см. рис. 1, номера 3 и 4).

На дендрограмме праймера $(CTC)_6C$ в отдельный кластер объединяются кролики также пород белый великан и советская шиншилла (см. рис. 2, номера 2 и 4), а трехпородный кросс и кролики калифорнийской породы образуют второй кластер (номера 1 и 3). На дендрограмме праймера $(GAG)_6C$ отдельный кластер образуют кролики пород калифорнийская и советская шиншилла (см. рис. 3, номера 2 и 3), а трехпородный кросс занимает уникальное положение, отличное от всех остальных групп кроликов.

Суммарная дендрограмма, построенная на основании расчета генетических расстояний по 26 локусам (ампликонам) спектров праймеров $(GAG)_6C$, $(ACC)_6G$ и $(CTC)_6C$, позволила получить сходные данные: отдельный кластер образуют кролики пород калифорнийская и советская шиншилла (см. рис. 4, номера 2 и 3); трехпородный кросс на дендрограмме локализуется отдельно от всех остальных групп.

Заключение. Оценки полиморфизма генетических структур исследованных групп кроликов с использованными ISSR-PCR-маркерами зависят от выбранного фрагмента микросателлита в качестве праймера в полимеразной цепной реакции: наиболее полиморфные спектры получены

при использовании в качестве праймера последовательности $(CTC)_6C$. Это может быть учтено при описании кроликов другого происхождения для получения информации об их генетической структуре с высоким разрешением.

Наиболее консолидированными группами кроликов среди исследованных, судя по доле полиморфных локусов и PIC, оказались представители трехпородных кроссов и калифорнийской породы, что в общем противоречит исходным предположениям о повышенной генетической гетерогенности потомков трехпородных скрещиваний.

Можно ожидать, что относительно повышенная консолидированность трехпородных кроссов по сравнению с такими исходными породами, как белый великан и советская шиншилла, так же как и уникальные характеристики их генетической структуры по сравнению с исходными породами, выявленная на дендрограмме, построенной на основании генетических расстояний по 26 локусам, обусловлена повышенной интенсивностью искусственного отбора, проводимого с этой синтетической по происхождению группой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геномное сканирование, основанное на последовательностях гомологичных ДНК-транспозонам хелитронам / В.И. Глазко [и др.] // Интеграл. – 2014. – № 74. – Т. 1. – С. 30–32.
2. Елькина М.А., Глазко В.И. IRAP-PCR-маркеры у некоторых пород сельскохозяйственных видов мле-



копитающих // Известия ТСХА. – 2012. – Вып. 2. – С. 58–65.

3. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34. – № 4. – С. 279–296.

4. Полилокусное генотипирование крупного рогатого скота по участкам гомологии к ретротранспозонам / В.И. Глазко [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 6. – С. 766–775.

5. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, Vol. 20, P. 176–183.

Егорова Ксения Ивановна, аспирант, Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева. Россия.

140143, Московская обл., Раменский р-н, п.г.т. Родники, ул. Трудовая, 6.
Тел.: (495) 744-26-42.

Глазко Валерий Иванович, д-р с.-х. наук, проф. кафедры «Зоология», Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева. Россия.

127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49.

Тел.: (499) 977-14-55.

Шумилина Анна Рудольфовна, канд. биол. наук, Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева. Россия.

Косовский Глеб Юрьевич, д-р биол. наук, проф. РАН, Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева. Россия.

140143, Московская обл., Раменский р-н, п.г.т. Родники, ул. Трудовая, 6.

Тел.: (495) 744-26-42.

Ключевые слова: ISSR-маркеры; доля полиморфных локусов; полиморфное информационное содержание; кролик; трехпородный кросс.

GENETIC STRUCTURE OF THREE-WAY CROSS OF RABBITS IN COMPARISON WITH PARENTAL BREEDS

Egorova Ksenia Ivanovna, Post-graduate Student, Scientific Research Institute of Fur Farming and Rabbit Breeding Industries. Russia.

Glazko Valeriy Ivanovich, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy (RSAU – MTAA or RSAU – MAA named after K.A. Timiryazev), Russia.

Shumilina Anna Rudolfovna, Candidate of Biological Sciences, Scientific Research Institute of Fur Farming and Rabbit Breeding Industries, Russia.

Kosovkiy Gleb Yurevich, Doctor of Biological Sciences, Professor of RAS, Scientific Research Institute of Fur Farming and Rabbit Breeding Industries, Russia.

Keywords: ISSR-markers; the share of polymorphic loci; polymorphic information content; rabbit; three-way cross.

The comparative analysis of polymorphism of DNA fragments, flanking by the inverted repeats of microsatellites (ISSR-PCR markers) in three-way cross of rabbits and three parental breeds of rabbits was carried out. 26 loci are revealed by using three trinucleotide ISSR-markers ((GAG)₆C, (ACC)₆G u (CTC)₆C), 20 of them being polymorphous. The most changeable there were the spectra of amplification products of primer (CTC)₆C. Relative increased consolidation of three-way cross of rabbits in comparison with parental breeds such as White Giant, Soviet Chinchilla and Californian rabbits as also unique characteristics of their genetic structure in comparisons with parental breeds have been found.

УДК 633.31:551.577.38

ВИРИНЕЯ – НОВЫЙ АДАПТИВНЫЙ СОРТ ЛЮЦЕРНЫ В ПОВОЛЖЬЕ

ПОПОВА Татьяна Николаевна, ФГБНУ «Ершовская ОСОЗ НИИСХ Юго-Востока»

НАЙДОВИЧ Владимир Александрович, ФГБНУ «Ершовская ОСОЗ НИИСХ Юго-Востока»

КУЗНЕЦОВ Павел Александрович, ФГБНУ «Ершовская ОСОЗ НИИСХ Юго-Востока»

На Ершовской опытной станции работа по селекции ведется с 1976 г., создано 8 новых сортов люцерны. Последний из них под названием Вирина передан на Государственное сортоиспытание в 2016 г. Основные достоинства сорта: адаптивность, высокая продуктивность, устойчивость к болезням. В среднем за пять лет урожайность зеленой массы составила 13,6 т/га, семян – 387,7 кг/га, у сорта-стандарта Узень соответственно 10,5 т/га и 309,4 кг/га. Уровень рентабельности сорта Вирина по этим показателям выше на 21,4 и 77 % соответственно по сравнению со стандартом.

Введение. Люцерна (лат. Medicago) относится к семейству Бобовые (Fabaceae) [1, 4]. Это не только ценнейшее кормовое растение, люцерна применяется в медицине, а в ряде стран используется также в пищу [8]. В России наибольшее распространение она получила в XX веке [3]. В Саратовской облас-

ти, в основном в правобережных районах, ее стали выращивать с конца XIX века [5].

Люцерна – ценный предшественник, так как не только обогащает почву органической массой и азотом, но и улучшает ее структуру. Способность к высокой кормовой урожайнос-