

В. И. Тыщенко, В. П. Терлецкий, Н. В. Дементьева

## Особенности генетической структуры популяций индеек 4-х пород

**Аннотация.** Молекулярно-генетический анализ 4-х пород индеек позволил выяснить особенности организации генома в соответствующих популяциях. Использовали олигонуклеотидный зонд (ГТГ)5, меченый дезоксигенином. Места специфического связывания зонда с геномной ДНК индеек выявлялись в виде полос (фрагментов ДНК) на фильтре. Расчет популяционно-генетических параметров проводили с помощью компьютерной программы Gelstats™. Определены коэффициенты сходства и генетические расстояния между индейками этих пород.

**Ключевые слова:** популяция, индейки, генетическое расстояние, олигонуклеотидный зонд, гетерозиготность, ДНК.

**Авторы:**

**Тыщенко Валентина Ивановна** — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных», г. Санкт-Петербург, Пушкин, Московское ш. 55-а, 196601, Россия; тел. (сл.): +7 (812) 465-80-12; тел. (дом.): +7 (812) 451-92-74; факс: +7 (812) 465-99-89, e-mail: tvi-57@mail.ru;

**Терлецкий Валерий Павлович** — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных», г. Санкт-Петербург, Пушкин, Московское ш. 55-а, 196601, Россия; тел. (сл.): +7 (812) 465-80-12; тел. (дом.): +7 (812) 451-92-74; факс: +7 (812) 465-99-89, e-mail: valeriter@mail.ru;

**Дементьева Наталия Викторовна** — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных», г. Санкт-Петербург, Пушкин, Московское ш. 55-а, 196601, Россия; тел. (сл.): +7 (812) 465-80-12; тел. (дом.): +7 (812) 695-05-20; факс +7 (812) 465-99-89, e-mail: dementevan@mail.ru.

**Введение.** ДНК-фингерпринтинг позволяет выявлять гибридационные полосы (фрагменты геномной ДНК), распределение которых различно в каждом образце ДНК. Анализ общих полос и частот встречаемости полос дает информацию о межпородном и межлинейном генетическом разнообразии, а также о внутривидовой гетерогенности (гетерозиготности). Интенсивная селекция в породах, приводящая к повышению продуктивных качеств животных, одновременно сопровождается потерей генетического разнообразия популяций [1]. Самыми надежными методами изучения генетического разнообразия являются ДНК фингерпринтинг с микро- и минисателлитной ДНК кур, а также RAPD-анализ [2]. Показатель «генетические расстояния» используется при оценке родства в линиях и породах, а также при прогнозировании у кур [3, 4]. Олигонуклеотидные зонды нашли свое применение в реакции молекулярной гибридизации, когда зонды специфически связываются с определенными участками

геномной ДНК. Одним из таких зондов является меченый дезоксигенином олигонуклеотид (ГТГ)5, который ранее был нами успешно использован при изучении популяций животных [5, 6]. Этот зонд эффективен в процессе комплементарного связывания с ДНК, а метка дезоксигенин позволяет выявить места связывания на фильтре в виде полос (фрагментов ДНК). Анализ распределения полос на фильтре между отдельными особями дает возможность рассчитать популяционно-генетические параметры, характеризующие популяцию индеек [7, 8].

Помимо популяционных вопросов, методы молекулярной генетики успешно используются в изучении полиморфизма отдельных генов (SNP), которые имеют важное значение в формировании продуктивных качеств животных, а также определяют жизнеспособность особей (вредные рецессивные аллели). Своевременная выбраковка животных-носителей этих вредных вариантов генов позволяет осуществлять эффективный контроль

над соотношением нормальный/мутантный аллель в популяции.

**Материалы и методы исследований.** Кровь индеек четырех пород в количестве 42 головы из ФГУП ППЗ «СКЗОСП», Ставропольский край (Черная тихорецкая, Палевая узбекская, Белая московская и Бронзовая северокавказская) отбирали в гепаринизированные пробирки в количестве 0,5 мл. После взятия кровь хранили при 20°C. ДНК выделяли стандартным фенольно-детергентным методом. В реакции расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции используют 5 мкл фермента, что соответствует 50 единицам активности (при удельной активности рестриктазы 10000 ед/мл). После инкубации реакционной смеси в термостате в течение 3 часов, фрагменты ДНК осаждали в 96% спирте и промывали 70% спиртом. Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 0,8% агарозном геле в трис-боратном буфере примерно 66 часов при напряжении 45 В. Перенос одноцепочечной ДНК с геля на нейлоновый фильтр осуществляли под вакуумом 50 мбар в течение 1 часа. Предварительно ДНК в геле денатурировали в щелочном растворе, содержащем 0,5 М NaOH и нейтрализовали в буфере 0,5 М трис – 1,5 М NaCl.

Прегибридизацию проводили в течение 1–2 часов при 45°C. После смены буфера вносили меченый олигонуклеотид (ГТГ) 5 до конечной концентрации 5рМ/мл и инкубировали 15 минут. После трех отмывок фильтры, содержащие фрагменты геномной ДНК и связанную в виде мече-

ного олигонуклеотида метку, использовали для иммунохимической детекции сигнала, основанной на взаимодействии конъюгата антитело-щелочная фосфатаза. Цветная реакция заключалась в активации растворов субстратов: 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфата и нитро голубой тетразолия хлорида. Наиболее интенсивные полосы начинают проявляться уже через 1–2 минуты. В целом, проявление заканчивается через 6 часов действия щелочной фосфатазы. Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Gelstats™.

Определение генетической близости сравниваемых групп животных основывается на вычислении коэффициента сходства, являющегося средним показателем при сравнении всех возможных парных комбинаций животных в группах. Коэффициент генетического сходства рассчитывается 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.

Анализ внутривидовой генетической вариативности проводили на основании расчетов средней гетерозиготности с использованием трех подходов [9].

**Таблица 1. Популяционно-генетические параметры 4-х пород индеек Северо-Кавказской зональной опытной станции по птицеводству (ФГУП ППЗ «СКЗОСП») — Черная тихорецкая, Палевая узбекская, Белая московская и Бронзовая северокавказская, рассчитанные методом ДНК-фингерпринтинга**

Породы индеек	n	Полос на дорожку $X \pm m$	P	BS <sup>1</sup>	BS <sup>2</sup>	D
Черная тихорецкая	11	27,5±0,7	4,90 x 10 <sup>-5</sup>	0,70		
Палевая узбекская	9	25,2±1,6	2,62 x 10 <sup>-5</sup>	0,66	0,58	0,10
Черная тихорецкая	11	27,5±0,7	4,90 x 10 <sup>-5</sup>	0,70		
Белая московская	11	23,2±2,9	1,54 x 10 <sup>-5</sup>	0,62	0,59	0,07
Черная тихорецкая	11	27,5±0,7	4,90 x 10 <sup>-5</sup>	0,70		
Бронзовая северокавказская	11	23,0±1,4	5,50 x 10 <sup>-6</sup>	0,59	0,57	0,08
Палевая узбекская	9	25,2±1,6	2,62 x 10 <sup>-5</sup>	0,66		
Белая московская	11	23,2±2,9	1,54 x 10 <sup>-5</sup>	0,62	0,58	0,06
Палевая узбекская	9	25,2±1,6	2,62 x 10 <sup>-5</sup>	0,66		
Бронзовая северокавказская	11	23,0±1,4	5,50 x 10 <sup>-6</sup>	0,59	0,59	0,04
Белая московская	11	23,2±2,9	1,54 x 10 <sup>-5</sup>	0,62		
Бронзовая северокавказская	11	23,0±1,4	5,50 x 10 <sup>-6</sup>	0,59	0,58	0,025

P — вероятность встречаемости двух особей с идентичным набором фрагментов ДНК;

BS1 — коэффициент сходства внутри групп;

BS2 — коэффициент сходства между группами;

D — генетическое расстояние.

**Результаты и обсуждение.** Анализ фильтров показал, что число фрагментов ДНК у разных особей варьирует от 30 до 40, а их размер — от 500 до 23000 пар оснований ДНК. Данные таблицы 1 показывают, что наименьшим значением коэффициента сходства внутри популяции обладали индейки Бронзовой северокавказской ( $BS = 0,59$ ), что свидетельствует об определенной гетерогенности в этой популяции.

Наибольшим значением характеризовались индейки Черной тихорецкой породы ( $BS = 0,70$ ). Это говорит о генетическом сходстве в этой группе птиц. По данным расчета генетических расстояний наиболее удаленными оказались Черная тихорецкая и Палевая узбекская породы ( $D = 0,100$ ), Черная тихорецкая и Бронзовая северокавказская ( $D = 0,08$ ). Эти данные указывают на генетическую удаленность Черной тихорецкой индейки от остальных пород.

Поиск специфических (маркерных) фрагментов ДНК привел к выявлению 7-ми таких фрагментов (таблица 2).

Специфические фрагменты позволяют идентифицировать группы индеек на принадлежность

к определенной породе. Например, фрагмент № 25 встречается у всех особей Черной тихорецкой индейки и только у 33% индеек Палевой узбекской.

Анализ внутривидовой генетической вариативности по критерию средней гетерозиготности показал на относительное разнообразие индеек Бронзовой северокавказской породы ( $H^1 = 0,56$ ), в то же время индейки Черной тихорецкой породы не отличались разнообразием ( $H^1 = 0,36$ ). Такое наблюдение может быть связано с меньшим распространением индеек Черной тихорецкой породы, что приводит к сужению генетического разнообразия.

**Выводы.** В результате исследований установлено, что Черная тихорецкая порода индеек генетически удалена от Палевой узбекской ( $D = 0,100$ ) и других пород. Эта порода также характеризуется низкой генетической вариативностью в сравнении с остальными изученными породами. Наиболее генетически близкими породами были Белая московская и Бронзовая северокавказская ( $D = 0,025$ ). Выявлен ряд специфических фрагментов ДНК, характерных для отдельных пород индеек.

Таблица 2. Специфические фрагменты ДНК и аллели, имеющие разную частоту встречаемости в 4-х породах индеек — Черная тихорецкая, Палевая узбекская, Белая московская и Бронзовая северокавказская, рассчитанные методом ДНК-фингерпринтинга

Фрагмент ДНК, №	Частота фрагментов ДНК				Частота встречаемости аллелей $q=1-\sqrt{1-p}$			
	Черная тихорецкая	Палевая узбекская	Белая моск.	Бронзовая северокав.	Черная тихорецкая	Палевая узбекская	Белая моск.	Бронзовая северокав.
14	0,36	1,00	0,09	0,45	0,20	1,00	0,05	0,26
17	0,91	0,56	0,36	0,55	0,70	0,34	0,20	0,33
22	0,27	1,00	0,27	0,73	0,15	1,00	0,15	0,48
25	1,00	0,33	0,36	0,09	1,00	0,18	0,20	0,05
30	1,00	0,11	0,55	0,45	1,00	0,06	0,33	0,26
46	0,91	0,00	0,82	0,73	0,70	0,00	0,58	0,48
49	0,91	0,33	0,27	0,27	0,70	0,18	0,15	0,15

Таблица 3. Гетерозиготность в 4-х породах индеек — Черная тихорецкая, Палевая узбекская, Белая московская, Бронзовая северокавказская

Породы индеек	n	Число локусов	Число аллелей	Число полиморф. локусов	$H^1$	$H^2$	$H^3$
Черная тихорецкая	11	20,13	2,33	0,65	0,36	0,42	0,40
Палевая узбекская	9	18,13	2,48	0,67	0,39	0,47	0,43
Белая московская	11	15,58	3,02	0,84	0,50	0,58	0,54
Бронзовая северокав.	11	13,30	3,45	0,91	0,56	0,65	0,61

## Литература

1. Grunder A. Estimates of relatedness and inbreeding in goose strains from DNA fingerprints / Grunder A., Sabour M., Gavora J. // Anim. Genet. — 1994. — Vol. 25. — P. 81–88.
2. Weigend S. Current strategies for the assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources / Weigend S., Romanov M.N. // World's Poultry Science. — 2001. — Vol. 3. — P. 2752–2788.

3. Haberfeld A. Heterosis and DNA fingerprinting in chickens / Haberfeld A., Dunnington E.A., Siegel P.B., Hillel J. // Poultry Science. — 1996. — Vol. 75. — P. 951–953.
4. Meng A. DNA fingerprint variability within and among parental lines and its correlation with performance of F-1 laying hens / Meng A., Gong G., Chen D., Zhang H., Qi S., Tang H., Gao Z. // Theor. Appl. Genetics. — 1996. — Vol. 92. — P. 769–776.
5. Дементьева Н. В. Использование метода фингерпринтинга ДНК для изучения генетической дивергенции в популяциях сельскохозяйственных животных / Дементьева Н. В., Терлецкий В. П., Тыщенко В. И., Яковлев А. Ф. // Вестник РАСХН. — 2003. — № 1. — С. 79–80.
6. Тыщенко В. И. Оценка генетического разнообразия в популяциях кур на основе геномной дактилоскопии / Тыщенко В. И., Дементьева Н. В., Терлецкий В. П., Яковлев А. Ф. // Сельскохозяйственная биология. — 2002. — № 6. — С. 43–46.
7. Ye X. Genetic diversity of commercial turkey primary breeding lines as estimated by DNA fingerprinting / Ye X., Zhu J., Velleman S.G., Nestor K.E. // Poult. Sci. — 1998. — Vol. 77. — P. 802–807.
8. Zhu J. Relationship between band sharing levels of DNA fingerprints and inbreeding coefficients and estimation of true inbreeding in turkey lines / Zhu J., Nestor K.E., Moritsu Y. // Poult. Sci. — 1996. — Vol. 75. — P. 25–28.
9. Stephens J. C. Estimation of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints / Stephens J. C., Gilbert D. A., Yuhki N., O'Brien S. J. // Mol. Biol. Evol. — 1992. — Vol. 9. — P. 729–743.

Terletskiy V. P., Tyshchenko V. I., Dementeva N. V.

## Specific features of genetic structure in populations of 4 turkey breeds

**Abstract.** *Molecular genetic analysis of 4 turkey breeds allowed for understanding specific features of genome organization in the corresponding populations. Oligonucleotide probe (GTG) 5 labeled by deoxygenin has been used. Loci of specific binding of the probe with turkey genomic DNA appeared as bands (DNA fragments) on the filter. Calculation of population and genetic parameters was conducted by the computer program Gelstats™. Coefficients of similarity and genetic distances between turkey breeds have been determined.*

**Key words:** population, turkey, genetic distance, oligonucleotide probe, heterozygosity, DNA.

*Authors:*

**Terletskiy Valery Pavlovich** — D.Sc., Professor, Senior Research Scientist of Laboratory of Molecular Cytogenetics for RRIFAGB; Moscovskoye sh. 55a, St. Petersburg, Pushkin, Russia 196601; +7 (921) 558-79-57, e-mail: valeriter@mail.ru

**Tyshchenko Valentine Ivanovna** — Cand. Sci., Senior Research Scientist of Laboratory of Molecular Cytogenetics for RRIFAGB; Moscovskoye sh. 55a, St. Petersburg, Pushkin, Russia 196601; mob.+7 (921) 558-78-24, e-mail: tvi-57@mail.ru

**Dementeva Natalia Victorovna** — Cand. Sci., Senior Research Scientist of Laboratory of Molecular Cytogenetics for RRIFAGB; Moscovskoye sh. 55a, St. Petersburg, Pushkin, Russia 196601; mob.+7 (921) 743-07-43, e-mail: dementevan@mail.ru