

УДК: 575.1:630.222.2.3

ДНК-фінгерпринтинг и генетическая дифференциация нескольких пород домашней курицы (*Gallus gallus* L.)**А.Л.Филенко¹, В.А.Васильев¹, В.В.Миделашвили¹, И.Г.Моисеева², А.А.Севастьянова³, С.К.Семенова¹**¹ Институт биологии гена РАН (Москва, Россия)² Институт общей генетики имени Н.И.Вавилова РАН (Москва, Россия)³ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства (Сергиев Посад, Россия)
mpc2001@i.com.ua

С помощью мультилокусного геномного ДНК-фінгерпринтинга (M13/Нае III) проведена генетическая дифференциация 7 пород кур, разводимых на территории России и Украины (N=24). На основании наблюдаемой изменчивости минисателлитных маркеров с помощью парно-группового метода для невзвешенных средних (UPGMA) была построена дендрограмма генетического сходства. Показано, что все исследованные образцы формируют с высокой достоверностью два надежных кластера, в один из которых объединяются малайские, орловские ситцевые и юрловские голосистые куры. Вторую группу составляют все оставшиеся породы, а именно полтавская глинистая, бурый леггорн, аппенцеллер и белохохлая голландская. Обсуждаются эффективность использования ДНК-маркеров разного типа для дифференциации пород кур, а также история происхождения изученных пород и возможные причины изменения их генетического разнообразия.

Ключевые слова: минисателлиты, ДНК-фінгерпринтинг, породы кур, генетическая дифференциация.

DNA fingerprinting and genetic differentiation of some chicken breeds (*Gallus gallus* L.)**A.L.Filenko, V.A.Vasilyev, B.V.Midelashvili, I.G.Moiseeva, A.A.Sevastyanova, S.K.Semyenova**

Multilocus genome DNA fingerprinting was used for genetic differentiation of seven Russian and Ukrainian chicken breeds (N=24). Dendrogram of genetic similarity was constructed (UPGMA method) on the base of minisatellite variability. It was shown that studied breeds formed two distinguished clusters. One of them contained the Malay Game, Orlov Mille Flear and Yurlov Crower breeds. The second cluster included Poltava Clay, Leghorn Brawn, Appentseller and Holland White Crested breeds. The chicken breed genetic differentiation, the life history of breeds and efficiency of different genetic markers were discussed.

Key words: minisatellites, DNA fingerprinting, chicken breeds, genetic differentiation.

Введение

Изучение генетического полиморфизма и поиск геномных маркеров у различных пород остается одной из актуальных проблем генетики домашних животных, и в том числе генетики домашней курицы. В настоящее время для изучения генетического разнообразия и паспортизации кур наряду с иммунологическими маркерами используют высокополиморфные ДНК (VNTR), а именно мини- и микросателлиты (Kuhnlein et al., 1989; Romanov, Weigend, 2001). С их помощью проведено генотипирование большого числа пород, разводимых в основном в разных странах Центральной и Западной Европы (Hillel et al., 1989, 2003; Rosenberg et al., 2001; Granevitze et al., 2009). Однако породы и породные разновидности кур России и Украины все еще слабо изучены. Имеется всего лишь несколько публикаций, в которых проведена геномная паспортизация с помощью ДНК-фінгерпринтинга небольшого числа пород (Семенова и др., 1996; 2002). Единичные породы отечественной селекции генотипированы недавно и по микросателлитным маркерам (Hillel et al., 2003).

В настоящем сообщении мы приводим данные сравнительного анализа генетической изменчивости нескольких пород кур, выведенных селекционерами России и Украины. Для генотипирования пород мы применили классический мультилокусный ДНК-фінгерпринтинг с использованием в качестве зонда ДНК фага M13. Известно, что M13 минисателлиты широко представлены во всех эукариотических геномах. Они организованы в виде тандемных повторов и распределены по всем хромосомам с преимущественной локализацией в прицентромерных областях. Этот метод эффективен для решения многочисленных задач, связанных с оценкой

генетического разнообразия, рационального использования и консервации генетических ресурсов, а также для выработки научно-обоснованных рекомендаций по сохранению и воспроизводству редких и исчезающих видов животных (Рысков, 1999). Он издавна является незаменимым инструментом для оценки генетической изменчивости, установления степени родства и широко используется для генетической паспортизации пород и линий домашних животных и птицы, и, в том числе, кур (Weigend, Romanov, 2001). Целью данной работы было обсудить эффективность использования ДНК-маркеров разного типа для дифференциации пород кур, а также историю происхождения изученных пород и возможные причины изменения их генетического разнообразия.

Объекты и методы исследования

Материал в виде образцов венозной крови собран у кур и петухов в двух экспериментальных хозяйствах – во ВНИИТИПе (Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, г. Сергиев Посад, Московская область) и ВНИИРГЖе (Всероссийский научно-исследовательский институт разведения и генетики животных, г. Пушкин, Ленинградская область).

Методы выделения ДНК, а также проведение классического фингерпринтинга с использованием в качестве зонда ДНК фага M13 и рестриктазы *NotI* III детально описаны нами ранее (Семенова и др., 1996). Для описания внутрипородной изменчивости исследовали по 3–4 образца крови каждой из 7 следующих пород: бойцовая малайская (БЦ), юрловская голосистая (Ю), орловская ситцевая (ОРЛ), полтавская глинистая (П), бурый леггорн (БЛ), белохохлая голландская (БХГ), аппенцеллер (АПЦ). Воспроизводимость результатов и калибровка гибридных фрагментов, выявляемых у 24 образцов ДНК, подтверждена в двух повторных экспериментах.

На основании электрофореграмм составляли бинарные матрицы, где «1» или «0» обозначали присутствие или отсутствие фрагмента определенной длины. Для каждой пары особей рассчитывали коэффициент сходства $S = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$, где N_A и N_B – число фрагментов, выявляемых у особей A и B соответственно, и N_{AB} – число общих фрагментов (Nei, Li, 1979). При построении дендрограмм использовали парно-групповой метод для невзвешенных средних (UPGMA) из пакета прикладных программ TREECON (Van der Peer, De Wachter, 1994).

Результаты

ДНК-фингерпринты пород кур, полученные с пробой ДНК фага M13, представляют собой спектры дискретных полос с интенсивной гибридизацией и характеризуются различным числом, расположением и интенсивностью выявленных фрагментов. Размер детектируемых фрагментов находится в пределах 1,7–23,0 т.п.н. Число индивидуальных фрагментов с размером 2,3–18,6 варьирует на первом фильтре от 38 до 48, на втором фильтре – от 40 до 46, что составляет в среднем 41,1 и 40,6 соответственно. Высокая индивидуальная вариабельность по числу фрагментов не позволяет выявить ни различия между отдельными особями, ни различия между отдельными породами. Однако при построении дендрограммы (рис. 1) все исследованные образцы формируют с высокой достоверностью две надежные группы. В одну из них объединены по три представителя юрловских и бойцовых кур, а также две особи орловских кур. Юрловские куры формируют обособленный подкластер, отличный от смешанной группы из трех бойцовых и двух орловских кур. Одна из орловских и все оставшиеся куры, а именно полтавские, бурые леггорны, аппенцеллеры и белохохлые, составляют второй большой кластер. Внутри этой группы не обнаружено четкой принадлежности образцов к отдельным породным подгруппам. Вариация индексов сходства S в первой группе, содержащей две породы бойцовых (БЦ, ОРЛ) кур и одну мясо-яичную породу (Ю), составляет 0,28–0,57. Несколько меньший размах изменчивости показателя S (0,32–0,55) наблюдается во второй группе пород, состоящей из мясо-яичных (П, БХГ, АПЦ) и яичных (БЛ) кур.

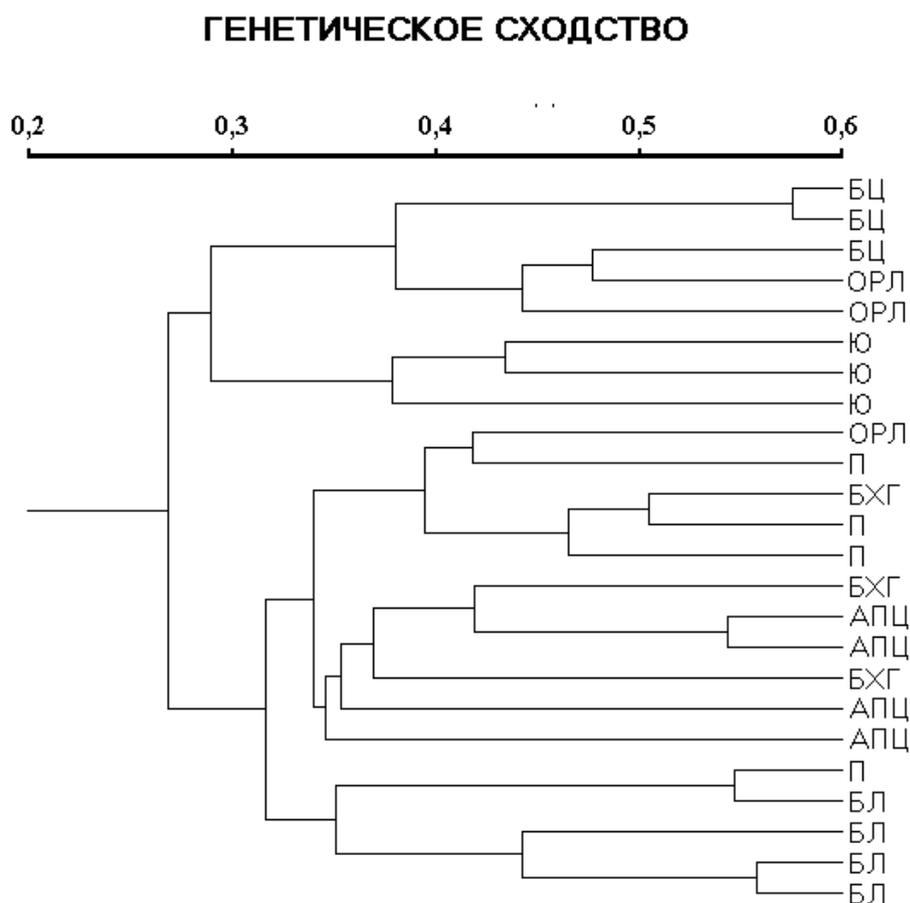


Рис. 1. Дендрограмма генетического сходства между представителями 7 пород кур

Обозначения: АПЦ – аппенцеллер, БЛ – бурый леггорн, БХГ – белохохлая голландская, БЦ – бойцовая малайская, ОРЛ – орловская, П – полтавская глинистая, Ю – юрловская.

Обсуждение

Снижение генетической изменчивости в группах яичных кур по сравнению с бойцовыми и мясными породами обнаружено ранее при использовании в качестве генетических маркеров изоферментного и белкового полиморфизма (Моисеева и др., 1984; Моисеева, 2006), а также при использовании RAPDs (Семенова и др., 2002) и микросателлитов (Hillel et al., 2003). В этих работах показано, что снижение полиморфизма наблюдается в длительно селектируемых человеком популяциях по сравнению с нативными популяциями кур из разных регионов. Это связано, в первую очередь, с интенсивностью и направлением отбора, приводящего к повышению уровня инбридинга в длительно селектируемых породах, и почти не зависит от используемого типа маркеров. Впервые к такому выводу пришли в одной из первых работ по калибровке уровня инбридинга по минисателлитам M13 у шести яичных пород с известной историей (Kuhnlein et al., 1990). В дальнейшем доминирующая роль искусственного отбора в сохранении генетического разнообразия кур продемонстрирована при сравнении изменчивости минисателлитов в стандартизированных линиях кур с высоким уровнем инбридинга (Plotsky et al., 1995). Относительно недавно к аналогичному выводу пришли при генотипировании по микросателлитам большого числа пород и популяций разного типа из Европы и Азии (Hillel et al., 2003).

Следует заметить, что генетическое разнообразие современных пород во многом определяется также их географическим происхождением и системой скрещиваний, лежащих в основе предковых популяций. Известно, что исторические корни мясных и бойцовых кур находятся в Азии, тогда как яичный тип пород формировался в Средиземноморье (Моисеева, 1992; 2006). Европейские мясо-яичные куры составляют, в основном, смешанную группу, полученную преимущественно на основе скрещиваний местных пород яичного типа с последующей селекцией

по массе тела (Моисеева, 2006). Этот вывод касается не только пород европейской селекции, но и полтавской глинистой (Moiseeva et al., 2007). Именно этим и объясняется наблюдаемое нами на дендрограмме отсутствие породоспецифичных групп в большом кластере мясо-яичных и яичных кур. Что же касается юрловских мясо-яичных кур, то их кластеризация исключительно с бойцовыми малайскими и орловскими подтверждает азиатское происхождение основателей этой породы. К сожалению, мы не можем оценить на основании представленных данных вклад, долю крови в формирование этой породы бойцовых и мясных азиатских кур. Участие этих кур в формировании юрловской породы показано ранее при изучении морфологических признаков (Моисеева, 2006; Никифоров и др., 1998). Интересно, что в одном из исследований, проводившихся в рамках Международного проекта AVIANDIV (1999–2000), юрловская голосистая была представлена двумя выборками: из экспериментального хозяйства ИП УААН (Украина) и ВНИТИП (Российская Федерация). От каждой страны были протестированы образцы крови от 50 особей данной породы по 25 микросателлитным локусам. Из отечественных пород, наряду с юрловскими курами, обследованы орловские, полтавские глинистые и украинская бородатая. Показано, что среди всех изученных популяций именно юрловская порода характеризуется наиболее высокими индексами гетерозиготности (H) и средней частотой полиморфных локусов (P). Это разнообразие несколько выше в российской популяции юрловских кур (H=0,66, P=1) по сравнению с курами Украины (H=0,58, P=1). В другой более поздней работе, выполненной участниками проекта (Hillel et al., 2003) на том же материале с использованием 22 динуклеотидных микросателлитных локусов, значение H у юрловских кур из России составил 0,62, из Украины – 0,58 (среднее значение по всей совокупности популяций – 0,47).

Происхождение старой русской породы орловских кур, которых относят к мясо-яичным курам с морфотипом бойцовых кур, окончательно не установлено. На основании изучения полиморфизма белков яиц и крови, дискретных морфологических признаков продемонстрирована генетическая уникальность этой породы и выявлено ее родство с английскими бойцовыми старого типа, гиланскими и малайскими бойцовыми курами (Моисеева и др., 1994; Моисеева, 2006). При анализе микросателлитного полиморфизма подтверждено сходство орловских и бойцовых кур (Hillel et al., 2003). Дифференциация образцов этой породы в нашем исследовании также свидетельствует о высоком сходстве орловских кур с малайскими курами. Однако на основании дендрограммы нельзя исключить у исследованной нами птицы примесь крови европейских пород.

Выводы

Показана эффективность использования мультилокусного геномного ДНК-фингерпринтинга (M13/Naе III) в качестве ДНК-маркера для дифференциации пород кур украинской и российской селекции. История происхождения изученных пород и возможные причины изменения их генетического разнообразия требуют дальнейшего исследования с привлечением более широкого набора маркеров на более многочисленной выборке пород и породных групп кур.

Список литературы

- Моисеева И.Г. Отечественные породы кур // Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных: редкие и исчезающие отечественные породы / Под ред. И.А.Захарова. – М.: Наука, 1992. – С. 11–112. /Moiseeva I.G. Otechestvennyye porody kur // Geneticheskiye resursy sel'skokhozyaystvennykh zhyvotnykh: redkiye i ischezayushchiye otechestvennyye porody / Pod red. I.A.Zaharova. – M.: Nauka, 1992. – S. 11–112/
- Моисеева И.Г. Породы кур и их генофонды // Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / Отв. ред. И.А.Захаров. – М.: Наука, 2006. – С. 229–388. /Moiseeva I.G. Porody kur i ikh genofondy // Genofondy sel'skokhozyaystvennykh zhyvotnykh: geneticheskiye resursy zhyvotnovodstva Rossii / Otv. red. I.A.Zaharov. – M.: Nauka, 2006. – S. 229–388/
- Моисеева И.Г., Волохович В.А., Толоконникова Е.В. и др. Дифференциация пород кур по биохимическим маркерам генов // Генетика. – 1984. – Т.20, №4. – С. 672–681. /Moiseeva I.G., Volohovich V.A., Tolokonnikova Ye.V. i dr. Differentsiatsiya porod kur po biokhimicheskim markeram genov // Genetika. – 1984. – T.20, №4. – S. 672–681/
- Моисеева И.Г., Семёнова С.К., Банникова Л.В., Филиппова Н.Д. Генетическая структура и происхождение старой русской орловской породы кур // Генетика. – 1994. – Т.30, №5. – С. 681–694. /Moiseeva I.G., Semenova S.K., Bannikova L.V., Filippova N.D. Geneticheskaya struktura i proiskhozhdeniye staroy russkoy orlovskoy porody kur // Genetika. – 1994. – T.30, №5. – S. 681–694/
- Никифоров А.А., Моисеева И.Г., Захаров И.А. Место русских пород кур в разнообразии пород Евразии // Генетика. – 1998. – Т.34, №6. – С. 850–851. /Nikiforov A.A., Moiseeva I.G., Zaharov I.A. Mesto russkikh porod kur v raznobrazii porod Yevrazii // Genetika. – 1998. – T.34, №6. – S. 850–851/

- Рысков А.П. Мультилокусный ДНК-фингерпринтинг в генетико-популяционных исследованиях биоразнообразия // Молекулярная биология. – 1999. – Т.33, №6. – С. 997–1011. /Ryskov A.P. Multilokusnyy DNK-fingerprinting v genetiko-populjatsionnykh issledovaniyakh bioraznoobraziya // Molekulyarnaya biologiya. – 1999. – Т.33, №6. – С. 997–1011/
- Семёнова С.К., Филенко А.Л., Васильев В.А. и др. Использование полиморфных маркеров для дифференциации пород кур различного происхождения // Генетика. – 1996. – Т.32. – С. 795–803. /Semenova S.K., Filenko A.L., Vasilyev V.A. i dr. Ispol'zovaniye polimorfnykh markerov dlya differentsiatsii porod kur razlichnogo proiskhozhdeniya // Genetika. – 1996. – Т.32. – С. 795–803/
- Семенова С.К., Моисеева И.Г., Васильев В.А. и др. Генетический полиморфизм русских, европейских и азиатских пород кур, выявляемый с помощью ДНК и белковых маркеров // Генетика. – 2002. – Т.38, №9. – С. 1304–1308. /Semenova S.K., Moiseeva I.G., Vasilyev V.A. i dr. Geneticheskiy polimorfizm russkikh, evropeyskikh i aziatskikh porod kur, vyyavlyayemyy s pomoshchyu DNK i belkovykh markerov // Genetika. – 2002. – Т.38, №9. – С. 1304–1308/
- Granevitze Z., Hillel J., Feldman M. et al. Genetic structure of a wide-spectrum chicken gene pool // Animal Genetics. – 2009. – Vol.40, №5. – P. 686–693.
- Hillel J., Groenen M.A.M., Tixier-Boichard M. et al. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools // Genet. Sel. Evol. – 2003. – №35. – P. 533–557.
- Hillel J., Plotzy Y., Haberfeld A. et al. DNA fingerprints of poultry // Anim. Genetics. – 1989. – Vol.20. – P. 145–155.
- Kuhnlein U., Dawe Y., Zadworny D., Gavora J. DNA fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry // Theor. Appl. Genet. – 1989. – Vol.77. – P. 669–672.
- Kuhnlein U., Zadworny D., Dawe Y. et al. Assessment of inbreeding by DNA fingerprinting: development of a calibration curve using defined strains of chickens // Genetics. – 1990. – Vol.125. – P. 161–165.
- Moiseyeva I.G., Romanov M.N., Kovalenko A.T. et al. Poltava chicken breed of Ukraine: history, characterization and conservation // Animal Genetic Resources Information. – 2007. – №40. – P. 71–78.
- Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1979. – №76. – P. 5269–5273.
- Plotsky Y., Kaiser M.G., Lamont S.J. Genetic characterization of highly inbred chicken lines by two DNA methods: DNA fingerprinting and polymerase chain reaction using arbitrary primers // Animal Genetics. – 1995. – Vol.26. – P. 163–170.
- Romanov M.N., Weigend S. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers // Poultry Science. – 2001. – Vol.80. – P. 1057–1063.
- Rosenberg N.A., Burke T., Elo K. et al. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds // Genetics. – 2001. – Vol.159. – P. 699–713.
- Van der Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Applic. Biosci. – 1994. – Vol.10. – P. 569–570.
- Weigend S., Romanov M.N. Current strategies for the assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources // World's Poultry Science Journal. – 2001. – Vol.57, №3. – P. 275–288.

Представлено: Т.Е.Ткачиком / Presented by: T.E.Tkachik

Рекомендовано до друку: В.Ю.Страшнюком / Recommended for publishing by: V.Yu.Strashnyuk

Подано до редакції / Received: 12.10.2010.