

ПОЛИЛОКУСНОЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО УЧАСТКАМ ГОМОЛОГИИ К РЕТРОТРАНСПОЗОНАМ

В.И. ГЛАЗКО^{1, 2}, Г.Ю. КОСОВСКИЙ², С.Н. КОВАЛЬЧУК², Т.Т. ГЛАЗКО^{1, 2}

Задачи интенсификации животноводства привели к необходимости развития генетических методов селекционной оценки животных (genomic breeding values — GBV). В этих целях применяются подходы, основанные на выявлении ассоциаций изменчивости признаков продуктивности животных в связи с полиморфизмом разных геномных элементов, начиная от микросателлитных локусов до миллионов мононуклеотидных полиморфизмов при полногеномном секвенировании. Несмотря на большой объем накопленных данных до сих пор остаются актуальными разработки относительно простых, быстрых и доступных для интерпретации методов полилокусного генотипирования (геномного сканирования) для решения таких традиционных проблем, как выявление «генофондного стандарта» пород, и задач геномной селекции. Одним из таких методов полилокусного генотипирования может быть использование мобильных генетических элементов (наиболее полиморфных геномных участков) в качестве «якорных» последовательностей. В этом отношении особый интерес представляют видоспецифичные ретротранспозоны, которые встречаются в геноме крупного рогатого скота с высокой частотой, такие как L1_BT LINE и эндогенный ретровирус ENV1_BT. В этой связи целью настоящей работы был сравнительный анализ полиморфизма участков геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами нуклеотидных последовательностей, гомологичных фрагментам этих ретротранспозонов, у специализированных молочных пород (айрширский и черно-пестрый голштинизированный скот) и мясной калмыцкой породы. Выявленный нами ранее продукт рекомбинации между ними оказался консервативным у исследованных пород, что, по-видимому, свидетельствует о древности его формирования. Поскольку генетические взаимоотношения, выявленные на основании анализа распределения и полиморфизма длин участков ДНК, фланкированных инвертированными повторами ENV1_BT, демонстрируют существенные различия между специализированными молочными и местной мясной породами, но характеризуются низкой внутривидовой изменчивостью, это позволяет прийти к заключению об относительно низкой транспозиционной активности ENV1_BT. Значения полиморфного информационного содержания (PIC) спектров, полученных с праймером к участку эндогенного ретровируса ERV1_BT, варьировали у разных пород от 0,075 до 0,089. Распределение инвертированных повторов участков гомологии к L1_BT имело другой характер и оказалось неодинаковым у разных пород и внутри пород, значения PIC были существенно выше и варьировали от 0,062 до 0,260. Таким образом, использование мобильных генетических элементов для полилокусного генотипирования оказывается эффективным при решении задач частной генетики и селекции животных, однако зависит от транспозиционной активности этих элементов. Судя по полученным данным, для оценок генетической дифференциации пород и выявления «генофондного стандарта» удобными маркерами представляются инвертированные повторы ENV1_BT, а при изучении индивидуальной внутривидовой изменчивости с этой целью следует использовать более транспозиционно активные элементы L1_BT.

Ключевые слова: полилокусное генотипирование, ретротранспозоны, инвертированные повторы, геномное сканирование, породы крупного рогатого скота.

В последние годы вопросы, связанные с возможностями включения в традиционную селекционную работу геномной селекции у крупного рогатого скота, привлекают все большее внимание (1-4). С целью выявления геномных мишеней искусственного отбора, ассоциированных с желательными проявлениями признаков продуктивности у мясных и молочных пород крупного рогатого скота, созданы геномные карты распределения мононуклеотидных полиморфизмов (single number polymorphisms — SNP), включающие 705 243 таких сайтов, распределенных по всем аутосомам (5-7). Оказалось, однако, что такие связи породоспецифичны и характеризуются высокой внутривидовой изменчивостью.

Для увеличения эффективности маркирования геномных доменов, полиморфизм которых можно было бы использовать для решения задач геномной селекции, к SNP привлекается новое поколение маркеров, ос-

нованное на изучении полиморфизма по копияности коротких (менее 400 пар нуклеотидов — п.н.) участков ДНК (copy number variability — CNV) и их геномного распределения (8-10). Выяснилось, что эти два подхода (SNP и CNV) к полилокусному генотипированию геномов крупного рогатого скота также не приводят к однозначным результатам. Так, у голштинской породы с использованием оценок полиморфизма микросателлитных локусов и SNP ранее выявлены хромосомные домены локализации генов количественных признаков (quantitative trait loci — QTL). Из 82 таких доменов, в которых обнаруживались CNV, только 17 перекрывались с SNP. В 20 хромосомных доменах локализации QTL присутствовали CNV, но не SNP. На основании выполненных исследований авторы делают вывод о необходимости совместного использования SNP и CNV для решения задач включения геномной селекции в традиционные селекционные методы.

В то же время такое полилокусное генотипирование (геномное сканирование) — затратная и достаточно сложная процедура, а ее результаты трудно интерпретировать. Необходимо обратить внимание и на то, что, как правило, структурно-функциональные особенности участков локализации SNP и CNV, потенциальная предрасположенность их к полиморфизму остаются неизвестными. В этой связи особый интерес вызывают геномные элементы с высоким уровнем полиморфизма, к которым относятся, в частности, микросателлитные локусы. На основании оценок полиморфизма той части микросателлитов, которые формируют на коротких участках геномной ДНК инвертированные повторы, разработан метод полилокусного геномного генотипирования ISSR-PCR (inter-simple sequence repeats) (11). Это поколение маркеров в связи с относительной дешевизной получения полилокусных спектров продуктов амплификации и простотой их интерпретации широко использовалось и используется у большого числа видов растений и животных при решении задач популяционной генетики.

Однако и этот тип маркеров имеет ряд недостатков (кроме доминантного характера проявления). Они, в основном, связаны с «анонимностью» участков ДНК, фланкированных инвертированным повтором микросателлита. Это не позволяет различать такие фрагменты, если они имеют одинаковую или близкую по числу нуклеотидов длину, но локализованы в разных областях генома. Очевидно, что такой источник потенциальных ошибок может существенно исказить интерпретацию результатов. Для того чтобы преодолеть эту «анонимность», нами ранее было выполнено секвенирование фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированным повтором последовательности (AGC)₆G. В результате мы получили данные о том, что в этих фрагментах преобладают участки гомологии к таким мобильным генетическим элементам, как L1_2_BT, BovA, ERV1_2_1_BT, LTR Gypsy, а также к продуктам рекомбинации между ними (12).

После полного секвенирования генома крупного рогатого скота в 2009 году (13) на микросателлит AGC обращено особое внимание, поскольку обнаружено несколько фактов: во-первых, он встречается в геноме крупного рогатого скота в 90 и в 142 раза чаще, чем в геномах соответственно человека и собаки; во-вторых, микросателлит AGC в геноме крупного рогатого скота в 39 % случаев ассоциирован с локализацией ретропозона Bov-A2 SINE. Этот элемент имеет AGC в своей хвостовой части и представляет собой более современное производное эволюционно древнего повтора Bov-B (LINE) у крупного рогатого скота. Следует отметить, что последовательности с гомологией к этому длинному диспергированному ядерному элементу (Bov-B) имеются у 65 таксонов и предположительно вовлечены в горизонтальный перенос генетического материала между разными таксонами (14).

В литературе накоплено большое количество экспериментальных

данных, свидетельствующих о том, что распространение микросателлитов (и в частности, их инвертированных повторов) тесно связано с транспозициями ретротранспозонов (7-10). Обнаружено также, что участки локализации таких ретротранспозонов, как LINE, с высокой частотой вовлекаются в рекомбинации и ассоциированы с полиморфизмом по CNV маркерам (15-18). В геноме крупного рогатого скота среди диспергированных повторов наиболее часто встречаются LINE RTE (BovB) и связанные с BovB SINE. Следующими по частоте встречаемости являются L1 LINE. Наиболее часто встречаются представители этого подсемейства — L1_VT. Показано, что L1_VT представляют собой более юные элементы по сравнению с BovB и активно участвуют в геномной реорганизации. В геноме крупного рогатого скота выявлено 811 копий L1, из которых 73 копии находятся в активном состоянии. Обнаружена относительно пониженная скорость нуклеотидных замен в этих копиях по сравнению с BovB (соответственно $0,031 \pm 0,001$ против $0,065 \pm 0,002$). Описаны статистически достоверные корреляции локализации L1 с районами изменчивости по числу копий (CNV маркеры) (19, 20). Накопленные данные позволяют нам полагать, что использование последовательностей L1_VT в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции для полилокусного генотипирования может стать основой для нового поколения методов геномного сканирования у крупного рогатого скота, поскольку потенциально объединяет в себе и SNP, и ассоциации с CNV маркерами.

Для проверки этого предположения у трех пород крупного рогатого скота — двух высокоспециализированных молочных (айрширская и голштинизированная черно-пестрая) и местной (калмыцкая) в настоящей работе впервые проведено сравнение продуктов амплификации при использовании в качестве праймеров последовательностей L1_VT, а также ERV1_2_1_VT, с которым, по результатам нашего секвенирования (12), L1_VT образует рекомбинантный продукт. Представленные данные свидетельствуют о том, что распределение инвертированных повторов фрагмента эндогенного ретровируса ENV1_VT в геномах крупного рогатого скота дифференцирует молочный и мясной скот, а L1_VT — индивидуальных животных внутри пород.

Цель наших исследований — оценить возможности полилокусного генотипирования у разных пород крупного рогатого скота по участкам гомологии к ретротранспозонам для выявления меж- и внутрипородной генетической дифференциации.

Методика. Геномное сканирование выполняли на 45 образцах крови представителей трех пород крупного рогатого скота: калмыцкой (15 животных, Республика Калмыкия), айрширской (Московский конный завод № 1, г. Москва — 15 животных,) и черно-пестрого голштинизированного скота (ЗАО «Можайский», Московская обл. — 5 животных; ОАО «Куйбышево», Московская обл. — 10 животных).

Тотальную ДНК из образцов цельной крови выделяли с помощью набора BioSilica (ООО «Биосилика», Россия). Праймерами ПЦР служили фрагменты ретротранспозона L1-2_VT и эндогенного ретровируса крупного рогатого скота ERV1-2C-LTR. Праймеры рассчитывали с использованием компьютерной программы GeneRunner («Hastings Software, Inc.», Hastings, США; <http://www.generunner.net/>) и PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) на основании последовательностей L1-2_VT и ERV1-2C-LTR, полученных нами ранее (12). Для постановки ПЦР использовали амплификатор Amplitronux A6 («Nux Technik, Inc.», США). ПЦР проводили с HS TaqDNA полимеразой («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. В реакционную смесь добавляли по 2,5 мкл одного из праймеров из исходного раствора с концентрацией 2 мкМ (конечная концентрация праймера — 0,5 мкМ). Количество матричной ДНК в реакцион-

ной смеси составляло 4 нг. Условия амплификации: 2 мин при 95 °С; 40 циклов — 15 с при 94 °С, 15 с при 56 °С, 2 мин при 72 °С; 2 мин при 72 °С.

Продукты амплификации разделяли в агарозном геле (1,5 %), окрашенном бромистым этидием (0,5 мкг/мл), в течение 80 мин при напряженности электрического поля 120 В (источник питания Voltronux Reactor-330, «Nux Technik, Inc.», США). Визуализацию результатов геле-электрофореза проводили с помощью трансиллюминатора ECX-F20.M и системы геле-документации Doc-Print DP-C-P-20.M («Vilber Lourmat», Германия). 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.

Математическую обработку данных выполняли при помощи сервиса DendroUPGMA (21) с применением коэффициента подобия по Дайсу (L.R. Dice), идентичному генетическому расстоянию, рассчитанному по М. Nei и W.-H. Li (22). Полученные в формате Newick генетические деревья использовались для построения дендрограмм в программе TreeView (23). Статистическую обработку проводили в программе GenAlEx v. 6.5 (24).

Результаты. В качестве праймеров использовались фрагменты ретротранспозона L1-2_BT (обозначены как L1dir1 и Rec-rev2) и эндогенного ретровируса ERV1-2C-LTR (обозначен как Rec-dir2) крупного рогатого скота (табл. 1). По результатам секвенирования (12), L1_BT образует рекомбинантный продукт с ERV1_2_1_BT. Праймеры подбирали к продукту рекомбинации между L1_BT и ERV1_BT таким образом, чтобы расстояние между ними составляло не менее 100 п.н.

1. Фрагменты ретротранспозонов, использованные в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции при полилокусном генотипировании геномов крупного рогатого скота

Праймер	Ретротранспозон	Нуклеотидная последовательность праймера
L1dir1	Ретротранспозон L1-2_BT	ACTCCCAGCAGAGAAGTAGC
Rec-rev2	Ретротранспозон L1-2_BT	CATGTACACACTGCTATATTT
Rec-dir2	ERV1-2C-LTR	TCCTCACTCCGGTCTCT

На первом этапе наших исследований выполнялось полилокусное генотипирование геномов животных разных пород, включенных в исследования, с использованием в качестве праймеров участков гомологии к последовательностям L1_BT и EVR1_BT, участвующих в рекомбинациях и выявляемых в соответствующем продукте при секвенировании фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлита (AGC)₆G (12). Оказалось, что полученные спектры консервативны и с их помощью не удастся выявить ни внутри-, ни межпородные различия. Можно ожидать, что этот продукт рекомбинации сформировался достаточно давно, в начале распространения по предковому геному L1 и EVR1, и защищен от перестроек. Защищенность от реорганизации описана для доменов, в которых локализованы древние ретротранспозоны, сохраняющие высокую степень сходства между крупным рогатым скотом, человеком и мышью. К ним, в частности, относятся LINE RTE/SINE ART2A и LINE L2/SINE MIR, некоторые ДНК-транспозоны и tandemные повторы (17, 20, 25-27).

В связи с консервативностью фрагментов ДНК, в которых локализован продукт рекомбинации между L1-ВТ и EVR1_ВТ, мы сопоставили спектры участков геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами последовательностей каждого из участников рекомбинантного продукта. При полилокусном генотипировании с использованием в ПЦР праймера L1dir1 спектры продуктов амплификации фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором выбранной последователь-

ности *L1dir1*, оказались полиморфными. Каждый фрагмент ДНК рассматривали как отдельный локус, и в анализ включали только те фрагменты, которые воспроизводились на ДНК-матрице в 3 повторностях.

Полученные спектры продуктов амплификации иллюстрирует рисунок 1. Как оказалось, у всех трех пород основной внутривидовой полиморфизм наблюдался среди фрагментов длиной от 450 до 650 п.н.

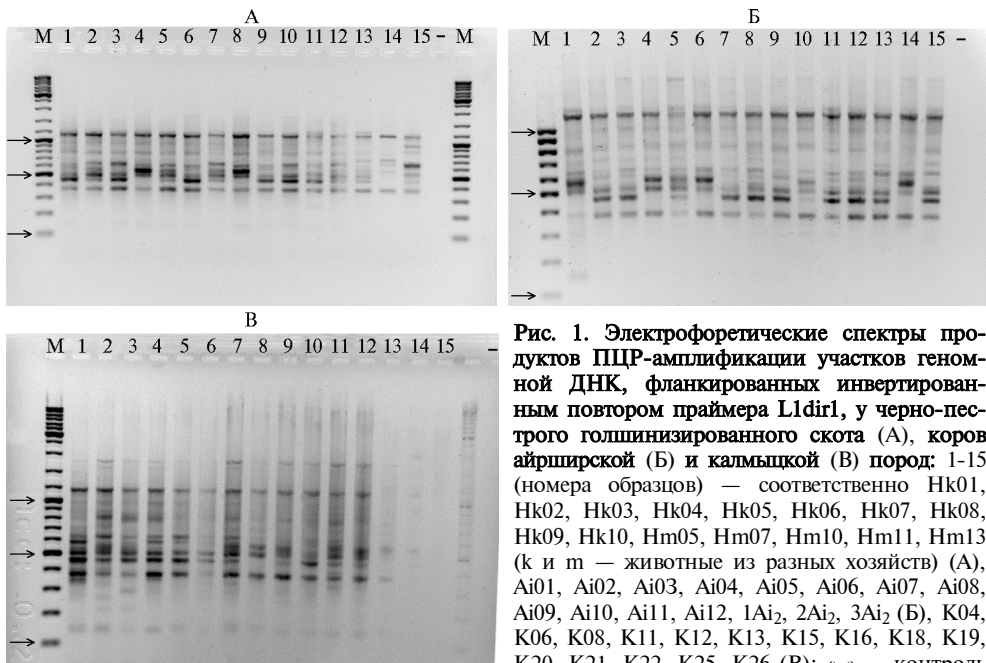


Рис. 1. Электрофоретические спектры продуктов ПЦР-амплификации участков геномной ДНК, фланкированных инвертированным повтором праймера *L1dir1*, у черно-пестрого голштинизированного скота (А), коров айрширской (Б) и калмыцкой (В) пород: 1-15 (номера образцов) — соответственно Нк01, Нк02, Нк03, Нк04, Нк05, Нк06, Нк07, Нк08, Нк09, Нк10, Нм05, Нм07, Нм10, Нм11, Нм13 (к и м — животные из разных хозяйств) (А), Аi01, Аi02, Аi03, Аi04, Аi05, Аi06, Аi07, Аi08, Аi09, Аi10, Аi11, Аi12, 1Аi₂, 2Аi₂, 3Аi₂ (Б), К04, К06, К08, К11, К12, К13, К15, К16, К18, К19, К20, К21, К22, К25, К26 (В); «←» — контроль (без геномной ДНК животных), М — маркер

молекулярных масс O'GeneRuler DNA Ladder mix (100-10000 bp) («Thermo Fisher Scientific», США). Стрелками отмечены фрагменты 1000, 500 и 100 bp. Характеристику спектров продуктов амплификации у исследованных пород см. в таблице 2, описание праймера — в таблице 1.

Судя по значениям PIC (polymorphic information content), наибольшая внутривидовая изменчивость по спектрам ампликонов была свойственна животным айрширской породы, наименьшая — черно-пестрому голштинизированному скоту (табл. 2). Для проверки такого утверждения мы рассчитали генетические расстояния по этим спектрам между индивидуальными животными, на основании чего была построена дендрограмма, отражающая генетические взаимоотношения между ними (рис. 2).

2. Основные характеристики спектров продуктов ПЦР-амплификации фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором праймера *L1dir1*, у животных трех исследованных пород

Показатель	Айрширская порода (n = 15)	Калмыцкая порода (n = 15)	Черно-пестрый голштинизированный скот (n = 15)
П р а й м е р L1dir1			
Общее число ампликонов	6	9	7
Число уникальных ампликонов	0	1	1
PIC	0,260	0,193	0,189
П р а й м е р Rec-rev2			
Общее число ампликонов	6	10	7
Число уникальных ампликонов	1	2	0
PIC	0,159	0,163	0,062
П р а й м е р Rec-dir2			
Общее число ампликонов	8	11	7
Число уникальных ампликонов	1	4	0
PIC	0,089	0,075	0,077

П р и м е ч а н и е. PIC (polymorphic information content) — полиморфное информационное содержание. Описание праймеров см. в таблице 1.

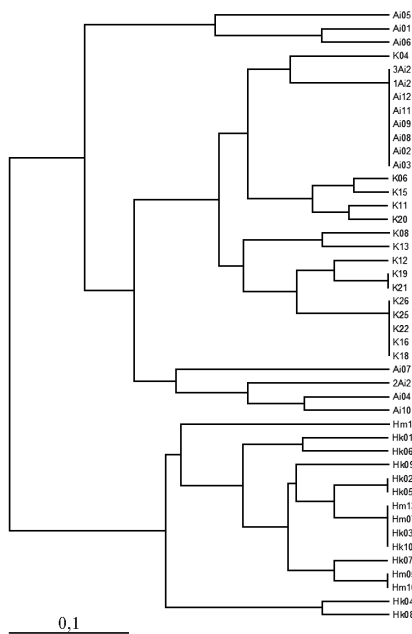


Рис. 2. Дендрограмма, отражающая генетические взаимоотношения между животными айрширской, калмыцкой пород и черно-пестрым голштинизированным скотом (помечены соответственно литерами А, К и Н) по спектрам продуктов ПЦР-амплификации с праймером *L1dir1*. Построена на основании расчета генетических расстояний по методу М. Nei и W.-H. Li (1979). Масштабная линейка отражает долю от единицы генетического расстояния. Описание праймера см. в таблице 1.

На дендрограмме (см. рис. 2) выделяются два крупных кластера: один объединяет всех представителей черно-пестрого голштинизированного скота, другой — группы айрширской и калмыцкой пород, которые, в свою очередь, подразделяются на мелкие подкластеры, при этом в подкластерах (за исключением одного случая — это животное, обозначенное как K04) представители разных пород не смешиваются друг с другом. Полученные данные свидетельствуют о

выраженной гетерогенности по распределению участков гомологии к прямой и инвертированной последовательности *L1dir1* на коротких расстояниях между ними (450-650 п.н.) у айрширской и калмыцкой пород по сравнению с голштинским скотом.

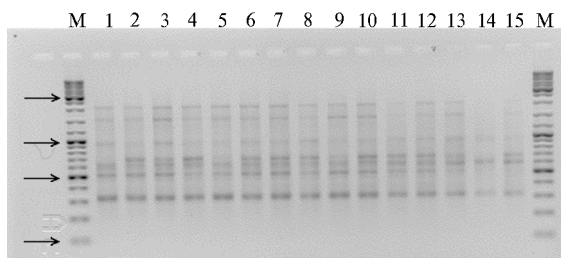


Рис. 3. Электрофоретические спектры продуктов ПЦР-амплификации участков геномной ДНК, фланкированных повтором праймера *Rec-rev2*, у черно-пестрого голштинизированного скота: 1-15 (номера образцов) — соответственно Hk01, Hk02, Hk03, Hk04, Hk05, Hk06, Hk07, Hk08, Hk09, Hk10, Hm05, Hm07, Hm10, Hm11, Hm13 (к и m — животные из разных хозяйств); М — маркер молекулярных масс O'GeneRuler DNA Ladder

mix (100-10000 bp) («Thermo Fisher Scientific», США). Стрелками отмечены фрагменты 3000, 1000, 500 и 100 bp. Характеристику спектров продуктов амплификации см. в таблице 2, описание праймера — в таблице 1.

При использовании в качестве праймера участка *L1_2_VT* альтернативной цепи ДНК (праймер *Rec-rev2*) ПЦР-спектры имели определенное сходство с предыдущими: основной полиморфизм обнаруживался среди ампликонов длиной 450-700 п.н. (рис. 3), однако полиморфное информационное содержание (PIC) оказалось ниже, чем в спектрах с праймером *L1dir1* (см. табл. 2), но, как и в предыдущем случае, наименьшее значение PIC было выявлено у черно-пестрого голштинизированного скота.

Несмотря на общее сходство спектров, дендрограмма, построенная на основании расчета генетических расстояний между индивидуальными животными по спектрам праймера *Rec-rev2* (рис. 4), отличалась от дендрограммы спектра с *L1dir1* (см. рис. 2) тем, что в общий кластер объединялись животные айрширской породы, черно-пестрый голштинизированный скот оказался подразделен на три мелких подкластера, а у калмыцкой породы подразделенность была наибольшей (см. рис. 4). В обоих случаях (праймеры *L1dir1* и *Rec-rev2*, см. рис. 2, рис. 4) наибольшая внутренняя подразделенность на дендрограммах проявилась у

животных калмыцкой породы.

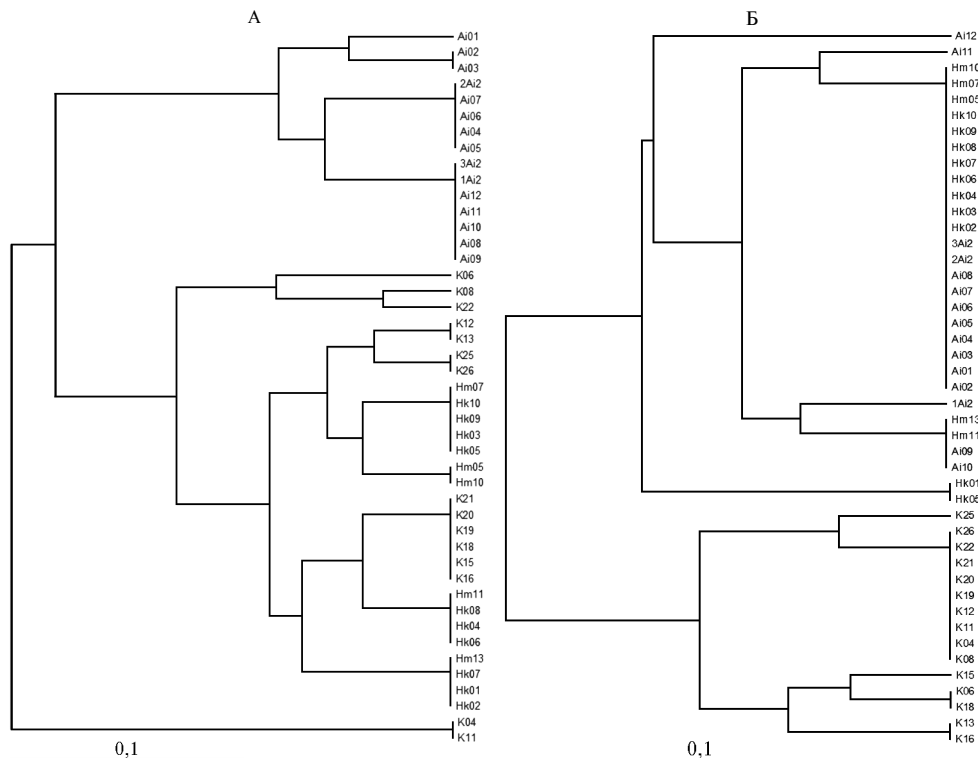


Рис. 4. Дендрограмма, отражающая генетические взаимоотношения между животными айрширской, калмыцкой пород и черно-пестрым голштинизированным скотом (помечены соответственно литерами А, К и Н) по спектрам продуктов ПЦР-амплификации с праймерами *Rec-gev2* (А) и *Rec-dir2* (Б). Построена на основании расчета генетических расстояний по методу М. Nei и W.-Н. Li (1979). Масштабная линейка отражает долю от единицы генетического расстояния. Описание праймеров см. в таблице 1.

Наши данные хорошо соответствуют описанной в литературе высокой транспозиционной активности L1_BT (20). Близкое расположение инвертированных повторов участка гомологии L1_BT в прямой и альтернативной цепях ДНК, а также изменчивость локализации, о чем свидетельствует полиморфизм продуктов амплификации, выявленный с помощью праймеров L1dir1 и *Rec-gev2* в районе фрагментов ДНК длиной 450-700 п.н., по-видимому, отражают наличие предпочтительных участков транспозиций в геноме крупного рогатого скота.

Следующий спектр продуктов амплификации был получен с использованием фрагмента эндогенного ретровируса ENV1, видоспецифичного для *Bos taurus*. Этот ретровирус принадлежит к семейству ретровирусов I класса; по данным литературы, участки гомологии к нему представлены в геноме крупного рогатого скота во множестве копий (25). Как следует из характеристики спектров ампликонов, полученных с праймером *Rec-dir2* (см. табл. 2), в этом случае значение PIC оказалось заметно ниже, чем в спектрах с праймерами L1dir1 и *Rec-gev2*. Это свидетельствует о меньшей вовлеченности *Rec-dir2* в транспозиции по сравнению с L1_BT — по крайней мере, на небольших расстояниях друг от друга (не более 2000 п.н.) в альтернативных цепях ДНК. Полученные данные подтверждают предположение о том, что продукт рекомбинации между L1_BT и ENV1_BT имеет относительно более древнее происхождение в сравнении с полиморфными транспозициями этих ретротранспозонов в альтернативных цепях ДНК в геноме крупного рогатого скота, выявленными в настоящей работе.

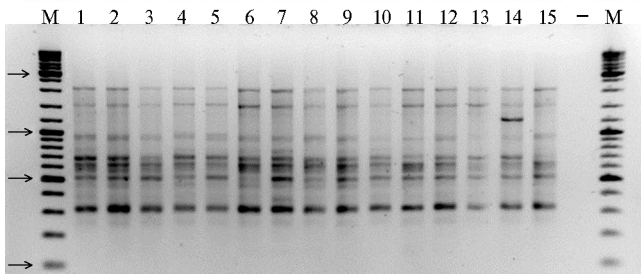


Рис. 5. Электрофоретические спектры продуктов ПЦР-амплификации участков геномной ДНК, фланкированных инвертированным повтором праймера Rec-dir2, у животных калмыцкой породы: 1-15 (номера образцов) — соответственно K04, K06, K08, K11, K12, K13, K15, K16, K18, K19, K20, K21, K22, K25, K26; «-» — контроль (без геномной ДНК животных); М — маркер молекулярных масс O'GeneRuler DNA Ladder mix (100-10000 bp) («Thermo Fisher Scientific», США). Стрелками отмечены фрагменты 3000, 1000, 500 и 100 bp. Характеристику спектров продуктов амплификации см. в таблице 2, описание праймера — в таблице 1.

В случае с праймером Rec-dir2 наиболее сложные спектры с наличием уникальных по длине последовательностей ДНК обнаруживались у калмыцкой породы (рис. 5).

На основании полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором участка ERV1_BT (праймер Rec-dir2), мы рассчитали генетические расстояния между особями и построили дендрограмму (см. рис. 4). На ней выделяются два кластера:

один объединил специализированный молочный айрширский и чернопестрый голштинизированный скот, второй — животных калмыцкой породы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что распределение инвертированных повторов фрагмента эндогенного ретровируса ENV1_BT в геномах крупного рогатого скота дифференцирует молочный и мясной скот. Следует отметить, что само молочное скотоводство зародилось несколько тысяч лет назад (28). Результаты сравнительного анализа распределения инвертированных повторов L1_BT и ENV1_BT позволяют полагать, что транспозиционная активность L1_BT существенно выше, чем у ENV1_BT. Это согласуется с имеющимися сообщениями о широкой представленности L1_BT в геномах крупного рогатого скота и высокой транспозиционной активности этого мобильного элемента (20).

Таким образом, выполненные исследования дают основания для следующих выводов. Обнаруженный нами ранее продукт рекомбинации между видоспецифичными для геномов крупного рогатого скота мобильными генетическими элементами — длинным диспергированным ядерным элементом LINE (long interspersed nuclear element) L1 Bos taurus (L1_BT) и эндогенным ретровирусом ENV1 Bos taurus (ENV1_BT) оказался консервативным у исследованных пород, что, по-видимому, свидетельствует о древности его образования. Генетические взаимоотношения, выявленные на основании анализа распределения и полиморфизма длин участков ДНК, фланкированных инвертированными повторами ENV1_BT, существенно различаются у специализированных молочных пород и местной мясной породы, однако при этом характеризуются низкой внутривидовой изменчивостью. Относительно низкая внутривидовая изменчивость позволяет рекомендовать полилокусное генотипирование с использованием участков ENV1_BT в качестве праймера для оценки генетической дифференциации пород, достаточно давно разошедшихся от общего корня. Распределение инвертированных повторов участков гомологии к L1_BT имеет относительно повышенную внутривидовую изменчивость. Это может быть обусловлено повышенной транспозиционной активностью L1_BT и использоваться при изучении индивидуальной внутривидовой изменчивости в целях геномной селекции.

MULTI-LOCUS GENOTYPING OF CATTLE GENOMES ON THE BASES OF THE REGION HOMOLOGY TO RETROTRANSPOSONS

V.I. Glazko^{1, 2}, G.Yu. Kosovskii², S.N. Koval'chuk², T.T. Glazko^{1, 2}

¹*K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University—Moscow Agrarian Academy, 49, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia;*

²*Center for Experimental Embryology and Reproductive Biotechnology, Federal Agency of Scientific Organizations, 12/4, ul. Kostyakova, Moscow, 127422 Russia, e-mail vglazko@yahoo.com, gkosovsky@mail.ru, s.n.kovalchuk@mail.ru, tglazko@rambler.ru*

Received April 2, 2015

doi: 10.15389/agrobiologia.2015.6.766eng

Abstract

Intensification in livestock has led to necessity of developing methods which allows to estimate animal genomic breeding values (GBV). In this, an approach was based on identifying association of animal production traits' variability to polymorphism in different genome elements, from microsatellite loci to millions of single nucleotide polymorphisms (SNPs), in genome-wide sequencing. Despite numerous accumulated data, the development of relatively simple, fast and affordable to interpretation methods of polyloci genotyping (genome scan) for assessing breed «gene pool standard» or genomic selection is still actual. The mobile genetic elements, being high polymorphic genomic sites, can serve as anchors in a multi-locus genotyping. The species-specific retrotransposons such as LI_BT LINE which present in the bovine genome with high frequency and the endogenous retrovirus ENVI_BT are of particular interest. In this regard, the aim of this work was the comparative analysis of polymorphism in genomic DNA fragments flanked by inverted repeats of nucleotide sequences homologous to fragments of these retrotransposons in genomes of specialized dairy Ayrshire and Black and White Holstein breeds and the Kalmyk beef breed. A recombination between LI_BT LINE and ENVI_BT we reported earlier turned out to be conservative in studied breeds. This apparently indicated it to be old in appearance. Since the genetic relationships identified from distribution patterns and length polymorphisms of DNA flanked by ENVI_BT inverted repeats differed significantly between specialized dairy breeds and local meat breed but were low variable within the breeds, this allowed to conclude about its relatively low transposition activity. The PIC values (polymorphic information content) for spectra produced in PCR with the endogenous retrovirus ERVI_BT fragment as a primer ranged from 0.075 to 0.089 for studied breeds. Distribution of inverted repeats homologous to LI_BT was different in character and varied among breeds and within breeds, the PIC values were substantially higher and ranged from 0.062 to 0.260. Thus, the use of multi-locus genotyping of transposable elements is effective for the purposes of animal genetics and breeding but their application depends on transposition activity. Our data showed that the ENVI_BT inverted repeats seem to be convenient marker in genetic differentiation among breeds and revealing «gene pool standard», whereas more transposable LI_BT elements are more relevant in indicating individual variability within a breed.

Keywords: multi-locus genotyping, retrotransposons, inverted repeats, genomic scanning, breed, cattle.

REFERENCES

1. Daetwyler H.D., Capitan A., Pausch H., Stothard P., van Binsbergen R., Brøndum R.F., Liao X., Djari A., Rodriguez S.C., Grohs C., Esquerré D., Bouchez O., Rossignol M.N., Klopp C., Rocha D., Fritz S., Eggen A., Bowman P.J., Coote D., Chamberlain A.J., Anderson C., VanTassell C.P., Hulsegge I., Goddard M.E., Guldbrandtsen B., Lund M.S., Veerkamp R.F., Boichard D.A., Fries R., Hayes B.J. Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nat. Genet.*, 2014, 46(8): 858-865 (doi: 10.1038/ng.3034).
2. Hozé C., Fritz S., Phocas F., Boichard D., Ducrocq V., Croiseau P. Efficiency of multi-breed genomic selection for dairy cattle breeds with different sizes of reference population. *J. Dairy Sci.*, 2014, 97(6): 3918-3929 (doi: 10.3168/jds.2013-7761).
3. Stothard P., Liao X., Arantes A.S., De Pauw M., Coros C., Plastow G.S., Sargolzaei M., Crowley J.J., Basarab J.A., Schenkel F., Moore S., Miller S.P. A large and diverse collection of bovine genome sequences from the Canadian Cattle Genome Project. *Gigascience*, 2015, 4: 49 (doi: 10.1186/s13742-015-0090-5).

4. Xu L., Bickhart D.M., Cole J.B., Schroeder S.G., Song J., VanTassell C.P., Sonstegard T.S., Liu G.E. Genomic signatures reveal new evidences for selection of important traits in domestic cattle. *Mol. Biol. Evol.*, 2015, 32(3): 711-725 (doi: 10.1093/molbev/msu333).
5. Patry C., Jorjani H., Ducrocq V. Effects of a national genomic preselection on the international genetic evaluations. *J. Dairy Sci.*, 2013, 96(5): 3272-3284 (doi: 10.3168/jds.2011-4987).
6. Zhao F., McParland S., Kearney F., Du L., Berry D.P. Detection of selection signatures in dairy and beef cattle using high-density genomic information. *Genet. Select. Evol.*, 2015, 47: 49 (doi: 10.1186/s12711-015-0127-3).
7. Sempéré G., Moazami-Goudarzi K., Eggen A., Laloë D., Gautier M., Flori L. WIDDE: a Web-Interfaced next generation database for genetic diversity exploration, with a first application in cattle. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 940 (doi: 10.1186/s12864-015-2181-1).
8. Cicconardi F., Chillemi G., Tramontano A., Marchitelli C., Valentini A., Ajmone-Marsan P., Nardone A. Massive screening of copy number population-scale variation in *Bos taurus* genome. *BMC Genomics*, 2013, 14: 124 (doi: 10.1186/1471-2164-14-124).
9. Xu L., Cole J.B., Bickhart D.M., Hou Y., Song J., VanRaden P.M., Sonstegard T.S., VanTassell C.P., Liu G.E. Genome wide CNV analysis reveals additional variants associated with milk production traits in Holsteins. *BMC Genomics*, 2014, 15: 683 (doi: 10.1186/1471-2164-15-683).
10. Bickhart D.M., Liu G.E. The challenges and importance of structural variation detection in livestock. *Front. Genet.*, 2014, 5: 37 (doi: 10.3389/fgene.2014.00037).
11. Kalendar' R.V., Glazko V.I. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii*, 2002, 34(4): 279-296.
12. Glazko V.I., Kosovskii G.Yu., Koval'chuk S.N., Arkhipov A.V., Petrova I.O., Dedovich G.O., Glazko T.T. *Innovatsionnye tekhnologii v meditsine*, 2014, 2(03): 63-79.
13. Elvik C.G., Tellam R.L., Worley K.C. et al. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, 2009, 324: 522-528 (doi: 10.1126/science.1169588).
14. Walsh A.M., Kortschak R.D., Gardner M.G., Bertozzia T., Adelson D.L. Widespread horizontal transfer of retrotransposons. *PNAS USA*, 2013, 110(3): 1012-10160 (doi: 10.1073/PNAS.1205856110).
15. Smyka P., Kalendar R., Ford R., Macas J., Griga M. Evolutionary conserved lineage of *Angela*-family retrotransposons as a genome-wide microsatellite repeat dispersal agent. *Heredity*, 2009, 103: 157-167 (doi: 10.1038/hdy.2009.45).
16. McInerney C.E., Allcock A.L., Johnson M.P., Bailie D.A., Prodoehl P.A. Comparative genomic analysis reveals species dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in mollusks. *Heredity*, 2011, 106: 78-87 (doi: 10.1038/hdy.2010.36).
17. Adelson D.L., Raison J.M., Garber M., Edgar R.C. Interspersed repeats in the horse (*Equus caballus*); spatial correlations highlight conserved chromosomal domains. *Anim. Genet.*, 2010, 41 (Suppl. 2): 91-99 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02115.x).
18. Grandi F.C., An W. Non-LTR retrotransposons and microsatellites. Partners in genomic variation. *Mobile Genetic Elements*, 2013, 3: e25674 (doi: 10.4161/mge.25674).
19. Startek M., Szafranski P., Gambin T., Campbell I.M., Hixson P., Shaw C.A., Stankiewicz P., Gambin A. Genome-wide analyses of LINE-LINE-mediated nonallelic homologous recombination. *Nucl. Acids Res.*, 2015, 43(4): 2188-2198 (doi: 10.1093/nar/gku1394).
20. Adelson D.L., Raison J.M., Edgar R.C. Characterization and distribution of retrotransposons and simple sequence repeats in the bovine genome. *PNAS USA*, 2009, 106(31): 12855-12860 (doi: 10.1073/pnas.0901282106).
21. Garcia-Vallve S., Puigbo P. *DendroUPGMA: A dendrogram construction utility*. 2002 (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>).
22. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS USA*, 1979, 76: 5269-5273.
23. Page R. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *CABIOS applications note*, 1996, 12(4): 357-358.
24. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update. *Bioinformatics*, 2012, 28: 2537-2539 (doi: 10.1093/bioinformatics/bts460).
25. Xiao R., Park K., Oh Y., Kim J., Park C. Structural characterization of the g-genome of BERV γ4, the most abundant endogenous retrovirus family in cattle. *Mol. Cells*, 2008, 26: 404-408.
26. Garcia-Etxebarria K., Jugo B.M. Genome-wide detection and characterization of endogenous retroviruses in *Bos taurus*. *J. Virol.*, 2010 Oct, 84(20): 10852-10862 (doi: 10.1128/JVI.00106-10).
27. Saylor B., Elliott T.A., Linquist S., Kremer S.C., Gregory T.R., Cottenie K. A novel application of ecological analyses to assess transposable element distributions in the genome of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome*, 2013, 56: 521-533 (doi: 10.1139/gen-2012-0162).
28. Beja-Pereira A., Luikart G., Bradley D., Bradley D.G., Jann O.C., Bertorelle G., Chamberlain A.T., Nunes T.P., Metodiev S., Ferrand N., Erhardt G. Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nature Genet.*, 2003, 35(4): 311-313 (doi: 10.1038/ng1263).