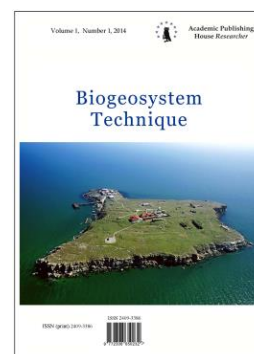


Copyright © 2015 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
Biogeosystem Technique
Has been issued since 2014.
ISSN: 2409-3386
E-ISSN: 2413-7316
Vol. 5, Is. 3, pp. 243-255, 2015

DOI: 10.13187/bgt.2015.5.243
www.ejournal19.com



Articles and Statements

UDC 575.174.015.3+ 636.01 + 636.082.1/2

Multilocus Genotyping of Cattle Using Highly Polymorphic Genomic Elements (Microsatellites, DNA Transposon Helitron)

¹ Anna V. Babii
² Svetlana N. Kovalchuk
³ Tatiana T. Glazko
⁴ Gleb Yu. Kosovskii
⁵ Valery I. Glazko

¹⁻⁵ Federal State Budget Scientific Institution Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies, Moscow, Russian Federation

^{3, 5} Federal State Educational Institution of Higher Education Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation

¹ Junior researcher

E-mail: anna.babii@yahoo.com

² PhD of Biological Sciences, leading researcher

E-mail: s.n.kovalchuk@gmail.com

³ Dr. of Agricultural Sciences, professor senior researcher

E-mail: tglazko@rambler.ru

⁴ Dr. of Biological Sciences, professor, director

E-mail: gkosovky@mail.ru

⁵ Dr. of Agricultural Sciences, professor, senior researcher

E-mail: vglazko@yahoo.com

Abstract

A multi-locus genotyping of one beef cattle breed (the Kalmyk breed) and two factory breeds of dairy cattle (the Ayrshire breed and the holsteinized Black-and-White cattle) was conducted. We used as primers in a polymerase chain reaction the consensus sequence of 3'-flank of *Heligloria* family helitrons, in combination with trinucleotide microsatellites (AGC) ₆G and (GAG) ₆C, respectively. The obtained data shows that the most "rich" spectra of amplification products is specific to the representatives of the local Kalmyk breed and the holsteinized Black-and-White cattle; the least amount of amplicons has been revealed in the representatives of the Ayrshire breed. The nucleotide sequences homologous to helitron regions and (AGC) ₆G microsatellite are found more often in the genome of the holsteinized cattle than the DNA sequences of the transposon helitron that are localized in alternate DNA strands. This indicates at some association between genomic localization of helitrons and the (AGC) ₆G microsatellite in this group of animals. The findings suggest the possibility of using the consensus sequence of the 3' flank of *Heligloria*

helitrons together with the trinucleotide microsatellites (AGC)₆G and (GAG)₆C, respectively, for multi-locus genotyping and detection of genetic differentiation of the three breeds of cattle.

Keywords: genome, genome scanning, cattle, transposons, helitron, microsatellites.

Введение

В последние годы, в связи с известными изменениями глобальных климатических и экологических условий разведения животных сельскохозяйственных видов, увеличивается необходимость разработки новых геномных технологий полилокусного генотипирования животных (геномного сканирования), позволяющих сравнивать и выявлять множественные генотипы и гаплотипы по большому количеству геномных элементов в целях разработки генетически обоснованных программ их сохранения и увеличения эффективности использования [8, 22]. Очевидно, что для решения задач полилокусного генотипирования необходим подбор геномных элементов, представленных в геноме множественными копиями и отличающихся относительно повышенным полиморфизмом.

Особой интерес привлекают маркеры полиморфизма геномных участков, связанных с микросателлитными локусами, но представляющие их определенную часть с известными структурными особенностями – микросателлиты, имеющие в одной цепи инвертированные повторы, расположенные на относительно коротком расстоянии (150-2000 пар нуклеотидов) друг от друга. Этот метод был разработан достаточно давно [24], получил название метода геномных ISSR – PCR маркеров (ISSR – inter-simple sequence repeat) которое на русском языке переводится как межмикросателлитный полиморфизм. Это название не совсем точно отражает особенности маркеров, поскольку особую важность имеет тот факт, что в полимеразной цепной реакции идет амплификация коротких участков ДНК, заключенных между инвертированным повтором того микросателлита, который используется в качестве праймера. Наличие инвертированного повтора на флангах на относительно коротких расстояниях свидетельствует о том, что эти фрагменты предрасположены к формированию таких неканонических структур ДНК, как петли, которые достаточно давно обсуждаются как один из регуляторных элементов, участвующих в регуляции транскрипции, репликации и рекомбинаций [19].

Ранее нами было показано, что такие ISSR – PCR маркеры, полученные с применением в полимеразной цепной реакции (ПЦР или PCR) в качестве праймеров участков микросателлитных локусов, в частности, (AGC)₆G и (GAG)₆C, оказываются эффективными для выявления межпородных различий у местных и заводских пород крупного рогатого скота [5-7].

Другим высоко мобильным генетическим элементом, принимающим участие даже в горизонтальном обмене генетическим материалом, является ДНК транспозон хелитрон. Суперсемейство хелитронов представляет группу ДНК транспозонов, реплицирующихся по механизму «катящегося кольца» похожему на репликацию одноцепочечных ДНК-вирусов [15, 16]. Хелитроны активно участвуют в горизонтальном переносе генов между отдаленными таксонами [9, 11, 21, 23]. Ранее нами была показан достаточно высокий уровень полиморфизма геномных участков, фланкированных инвертированным повтором идентификационной нуклеотидной последовательности хелитронов, перспективность такого подхода для полилокусного генотипирования в популяционно-генетических исследованиях генофондов древних и современных овцебыков [1], а также для оценки консолидированности разных пород крупного рогатого скота [2, 3]. В то же время, применение в ПЦР только одного праймера (в ISSR-PCR – фрагмента микросателлита, хелитрона – его идентификационной последовательности), может увеличивать вероятность ошибок отжига и сложность анализа спектров продуктов амплификации. В этой связи, в настоящей работе выполнен сравнительный анализ результатов полилокусного генотипирования трех пород крупного рогатого скота с применением в ПЦР в качестве праймера консенсусной последовательности 3'-конца хелитронов семейства *Heligloria* [21] в комбинации с тринуклеотидными микросателлитами (AGC)₆G и (GAG)₆C, соответственно, и обсуждена возможность их практического использования в качестве маркеров для описания генетических профилей групп животных исследуемых пород. Выполнен также сравнительный анализ связи частоты встречаемости локализации на коротких расстояниях (100 – 2000 пар нуклеотидов) идентификационной последовательности хелитронов в

альтернативных цепях ДНК и их колокализации с соответствующими фрагментами микросателлитов (AGC)₆G и (GAG)₆C.

Материалы и методы

Выполнено полилокусное генотипирование КРС местной калмыцкой породы мясного направления продуктивности (30 коров, ООО «Агрофирма Уралан», Калмыкия) и двух заводских пород молочного направления продуктивности: айрширской породы (15 коров, ЗАО «Московский конный завод № 1») и черно-пестрого голштинизированного скота (4 коровы, ЗАО «Можайский»; 10 коров, ОАО «Имени Куйбышева»). Средний возраст исследуемых животных составил 5-7 лет.

ДНК выделяли из образцов цельной крови с помощью набора *BioSilica* (Россия). Для приготовления ПЦР-образцов использовалась смесь *qPCRmix-HS (5x)* (Евроген, Россия) и следующий набор праймеров: консенсусная последовательность 3'-конца хелитронов семейства *Heligloria* Hel-1 5'-GCAACGCGTGGCCGG-3' [21], и тринуклеотидные микросателлиты (AGC)₆G 5'-AGCAGCAGCAGCAGCAGCG-3' и (GAG)₆C 5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGC-3', в следующих комбинациях: Hel-1 + (AGC)₆G и Hel-1 + (GAG)₆C. Количество геномной ДНК, взятой для анализа, составило 10 нг. Амплификация проводилась по методике ISSR-PCR в оптимизированных условиях (95 °C, 2 мин.; 94 °C, 15 сек., 56 °C, 15 сек., 72 °C, 2 мин., 40 циклов; 72 °C, 2 мин.).

Разделение продуктов амплификации выполнялось в течение 120 мин. в агарозном геле (1.2%) окрашенным бромистым этидием (0.5 мкг/мл). Длины полученных ампликонов определяли с помощью ДНК-маркера длин *O'GeneRuler DNA Ladder mix* (100 – 10 000 п.о.). Бинарная матрица была составлена на основании оценки присутствия/отсутствия индивидуальных фрагментов ДНК определенной длины у каждого из исследуемых животных. Для математической обработки данных использовался алгоритм метода невзвешенного попарного среднего UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) сервера *DendroUPGMA* [12] и коэффициент подобия по Дайсу (Dice) (Nei & Li, 1979). Далее генетическое древо в формате *Newick* использовалось для построения дендрограммы в программе *TreeView* [17]. Статистическая обработка данных осуществлялась в программе *GenAlEx 6.5*. [18].

Результаты и их обсуждение

Анализ особенностей спектров продуктов амплификации, полученных с использованием в ПЦР в качестве двух праймеров идентификационной последовательности хелитронов и одной из последовательностей (AGC)₆G и (GAG)₆C.

Сравнительный анализ спектров продуктов амплификации (ампликонов), полученных на геномной ДНК трех пород крупного рогатого скота (местной калмыцкой и заводскими молочными породами айрширской и черно-пестрого голштинизированного скота), с использованием в качестве праймеров консенсусной последовательности 3'-фланга хелитронов *Heligloria*, в комбинации с тринуклеотидными микросателлитами (AGC)₆G и (GAG)₆C, позволил выявить определенные межпородные отличия по общим характеристикам спектров. Так, при использовании пары праймеров Hel-1 и (AGC)₆G оказалось, что амплифицируемые фрагменты ДНК, в целом, находятся в пределах 130 – 1650 п.о., но различаются у каждой из пород количеством ампликонов и диапазоном длин фрагментов (Рис. 1 а, в, д; табл. 1).

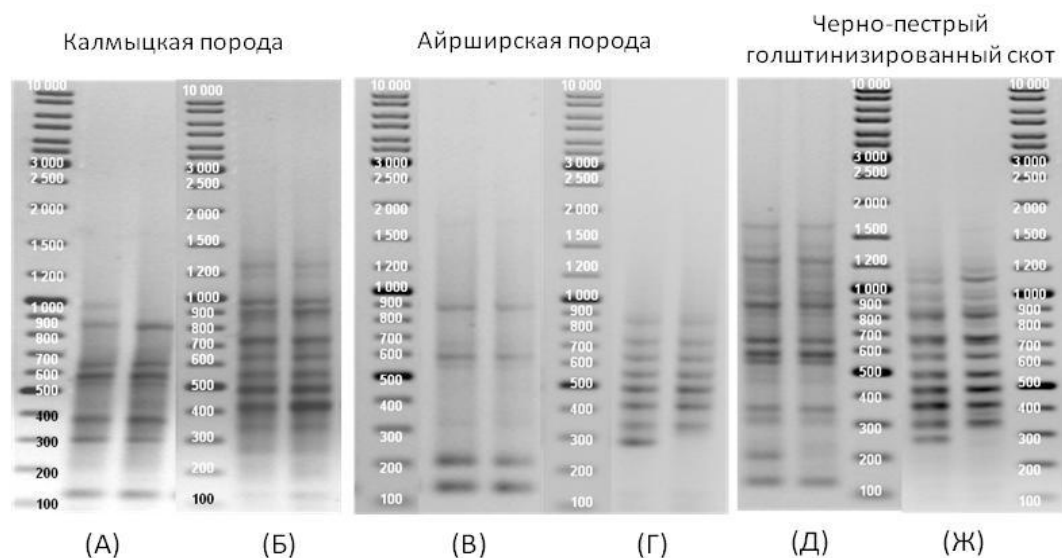


Рис. 1. Пример спектров продуктов амплификации геномной ДНК исследуемых пород КРС, полученных с использованием комбинации фрагмента хелитрона и тринуклеотидного микросателлита в качестве праймеров
А, В, Д - Hel-1 + (AGC)₆G; **Б, Г, Ж** - Hel-1 + (GAG)₆C

У черно-пестрого голштинизированного скота фрагменты ДНК, фланкированные последовательностями хелитрона и повтора (AGC)₆G встречаются в геноме чаще (17 локусов), чем у представителей калмыцкой (11 локусов) и айрширской пород (5 локусов) (Рис. 1, табл. 1). Наблюдается следующая тенденция: минимальное расстояние между хелитроном и данным микросателлитом, указывающее на соседство данных элементов в геноме, близко у всех животных (130 – 150 пар оснований - п.о.), независимо от породной принадлежности. В то же время, максимальная удаленность между 3' флангом хелитрона и повтора (AGC)₆G составляет 870 – 890 п.о. у заводской молочной породы айрширов, 990 – 1000 п.о. у аборигенной калмыцкой породы и 1600 – 1650 п.о. у черно-пестрого голштинизированного скота (Рис. 1 а, в, д; табл. 1).

Таблица 1

Сравнительные показатели полученных амплифицируемых ДНК-фрагментов в исследуемых популяциях КРС

Показатели	Комбинация праймеров	Калмыцкая порода	Айрширская порода	Черно-пестрый голштинизированный скот
Количество амплифицируемых ДНК-фрагментов	Hel-1+(AGC) ₆ G	11	5	17
	Hel-1+(GAG) ₆ C	16	9	11
Диапазон длин амплифицируемых ДНК-фрагментов (п.о.)	Hel-1+(AGC) ₆ G	~130...~1000	~130...~890	~130...~1650
	Hel-1+(GAG) ₆ C	~90...~1300	~290...~890	~290...~1200

Результаты геномного сканирования с использованием в качестве праймеров 3'-фланга хелитронов *Heligloria* и микросателлита (GAG)₆C показали, что амплифицируемые спектры также являются полиморфными и отличаются у исследуемых пород. У калмыцкой породы количество участков ДНК, фланкированных последовательностями фрагментов хелитронов и тринуклеотидного повтора (GAG)₆C с длинами в диапазоне 90 – 1300 п.о. оказалось наивысшим (16 локусов), по сравнению с черно-пестрым голштиinizированным скотом (11 локусов) и айрширской породой (9 локусов) (Рис. 1 б, г, ж; табл. 1). Примечательно, что у молочного скота (айрширского и черно-пестрого голштиinizированного) минимальное расстояние между фрагментами ДНК-транспозона хелитрона и (GAG)₆C сходное (290 – 300 п.о.), а максимальные длины различаются между специализированными молочными породами и калмыцким скотом (Табл. 1).

По результатам секвенирования генома крупного рогатого скота известно, что микросателлит AGC встречается много чаще, чем GAG [20]. Более того, в 39 % случаев этот микросателлит ко-локализован с видоспецифичным для крупного рогатого скота ретротранспозоном Bov-A2 SINE [20]. Тем не менее, судя по полученным нами данным (Табл.1), идентификационная последовательность ДНК-транспозона хелитрона и микросателлитов AGC и GAG встречаются на коротких расстояниях с близкой частотой.

В литературе накоплено большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что распространение микросателлитов и, в частности, их инвертированных повторов, тесно связаны с транспозициями ретротранспозонов [4, 10, 13, 14]. Судя по тому, что у черно-пестрого голштиinizированного скота количество коротких фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором идентификационной последовательности ДНК-транспозона хелитрона заметно меньше, чем количество таких ДНК фрагментов между 3' последовательностью хелитрона и микросателлитами AGC (Рис. 1) [2, 3], можно ожидать, что распространение хелитрона также тесно связано с локализацией в геноме крупного рогатого скота tandemных повторов.

Генетическое разнообразие и генетические профили животных

Сравнительный анализ основных показателей генетического разнообразия в группах животных исследуемых пород, рассчитанных по данным полилокусного генотипирования на основе 3'-участка хелитронов *Heligloria* и микросателлита (AGC)₆G, показал, что наибольшей консолидированностью отличается калмыцкая порода, с наименьшими значениями эффективного числа аллелей (N_e), индекса Шеннона (I) и гетерозиготности (H_e , uH_e) (Табл. 2). У этой породы выявлен один породоспецифический ДНК фрагмент в низкомолекулярной зоне в диапазоне 390 – 400 п.о. (Рис. 2).

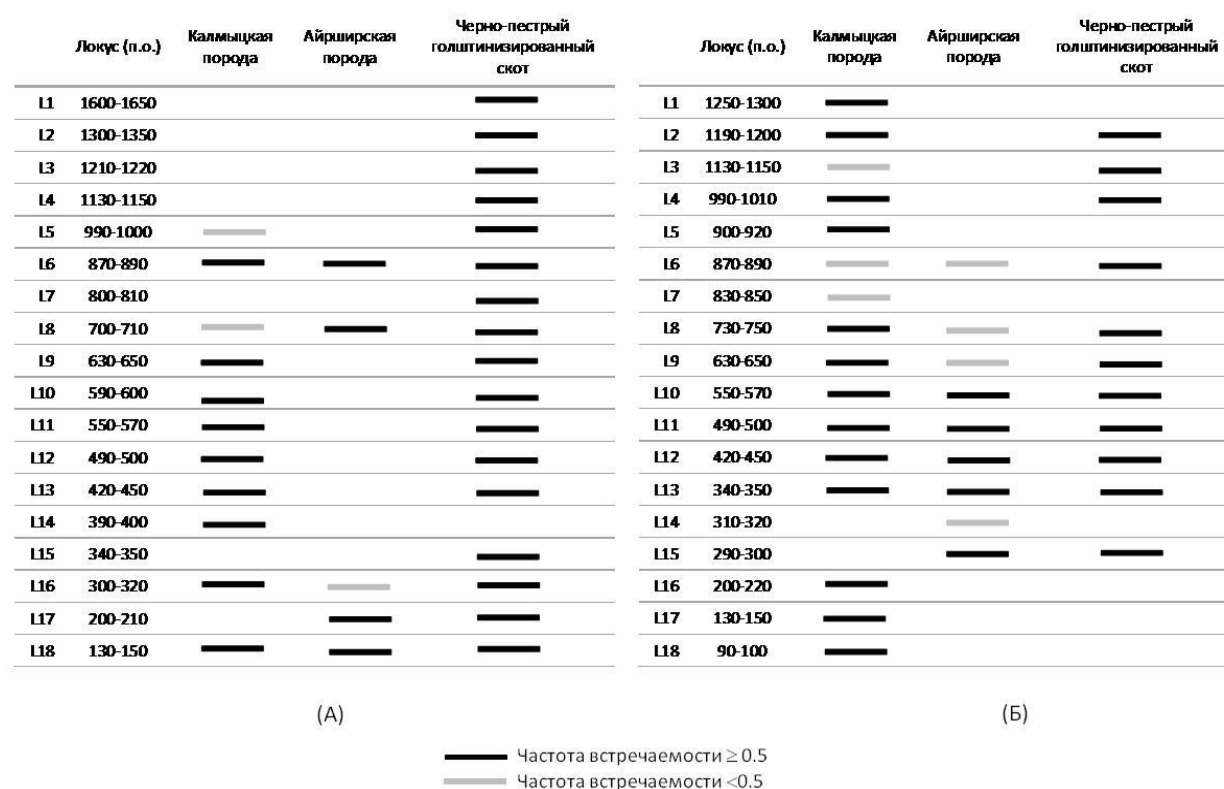


Рис. 2. Генетические профили (совокупность черных и серых бэндов) и породоспецифические паттерны (черные бэнды) исследованных пород крупного рогатого скота, полученные с помощью комбинаций праймеров:

(А) $Hel-1$ и $(AGC)_6G$

(Б) $Hel-1$ и $(GAG)_6C$

Несмотря на одинаковое значение доли полиморфных локусов (P) с калмыцкой породой (11.11 %) (Табл. 2), айрширская порода является менее консолидированной по спектрам ампликонов, полученных с праймерами $Hel-1$ и $(AGC)_6G$ и не характеризуется наличием уникальных ампликонов (Рис. 2а). Исследуемая группа черно-пестрого голштинизированного скота оказалась наиболее гетерогенной по всем статистическим параметрам (Табл. 2). Более того, сравнительный анализ спектров позволил выявить 6 уникальных ампликонов, расположенных в 3 молекулярных зонах (300 – 350 п.о., 800 – 810 п.о., 1130 – 1650 п.о.) (Рис. 2а). При совместном анализе генетических профилей животных трех пород, полученных в результате генотипирования с помощью праймеров $Hel-1$ и $(AGC)_6G$, выделяются группы фрагментов ДНК, объединяющие специализированный молочный айрширский и черно-пестрый голштинизированный скот (200 – 210 п.о.), а также местный калмыцкий и черно-пестрый голштинизированный скот (420 – 650 п.о. и 990 – 1000 п.о.) (Рис. 2а).

Расчет показателей генетического разнообразия исследуемых популяций КРС, основанный на данных генотипирования с помощью праймеров $Hel-1$ и $(GAG)_6C$, показал, что наиболее консолидированной является популяция черно-пестрого голштинизированного скота, так как характеризуется низким значением доли полиморфных локусов ($P = 5.56$ %) и иных параметров генетического разнообразия (Табл. 2), а также не содержит в спектре амплифицируемых фрагментов ДНК уникальных ампликонов (Рис. 2б).

**Особенности показателей генетического разнообразия
в группах коров исследованных пород**

Комбинация праймеров	Порода	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>I</i>	<i>H_e</i>	<i>uH_e</i>	<i>P</i> (%)
Hel-1 + (GAG) ₆ C	Калмыцкая	30	1.222	1.122	0.141	0.087	0.088	33.33
	Айрширская	15	0.889	1.211	0.195	0.129	0.134	38.89
	Черно-пестрый голштинизированный скот	14	0.667	1.051	0.037	0.027	0.028	5.56
Hel-1 + (AGC) ₆ G	Калмыцкая	30	0.722	1.029	0.033	0.020	0.020	11.11
	Айрширская	15	0.389	1.079	0.065	0.044	0.046	11.11
	Черно-пестрый голштинизированный скот	14	1.111	1.154	0.112	0.080	0.083	16.67

N – количество исследованных животных

N_a – количество аллелей на локус

N_e – эффективное число аллелей ($N_e = 1 / ((p^2 + q^2) / 2)$)

I – информационный индекс Шеннона (Shannon's Information Index, $I = -1 / (p \times \ln p + q \times \ln q)$)

H_e – ожидаемая гетерозиготность ($H_e = 2 \times p \times q$)

uH_e – несмещенная ожидаемая гетерозиготность ($uH_e = (2N / (2N - 1)) \times H_e$)

(где для диплоидных бинарных данных и с учетом равновесия Харди-Вайнберга:

$q = \sqrt{1 - \text{частота локуса}}$ и $p = 1 - q$);

P (%) – доля полиморфных локусов.

Достаточно консолидированной в этом случае оказалась калмыцкая порода, которая, несмотря на наличие 6-ти уникальных ампликонов (в диапазонах 90 – 220 п.о., 830 – 850 п.о., 900 – 920 п.о., 1250 – 1300 п.о) (Рис. 2б), уступает популяции айрширской породы. Последняя, хоть и характеризуется наличием всего одного уникального продукта амплификации, по расчетам значений индексов гетерозиготности (*I*, *H_e*, *uH_e*) (Табл. 2), является наиболее разнообразной, с генетической точки зрения. Согласно полученным генетическим профилям выделяется породоспецифический фрагмент ДНК, характерный для представителей специализированного молочного скота (290 – 300 п.о.) (Рис. 2б).

Кластерный анализ

Согласно результатам кластеризации бинарных данных, с учетом генетических расстояний, рассчитанных по частотам встречаемости геномных участков ДНК разной длины, фланкированных последовательностями 3'-фланга хелитрона Hel-1 и микросателлита (AGC)₆G, показано, что подобная комбинация праймеров применима для популяционного анализа в целях выявления межпородной дифференциации КРС, так как на построенной дендрограмме каждая из трех исследуемых пород формирует отдельный кластер (Рис. 3). Примечательно, что представители калмыцкой породы и черно-пестрого голштинизированного скота образуют на дендрограмме общий подкластер (Рис. 3).

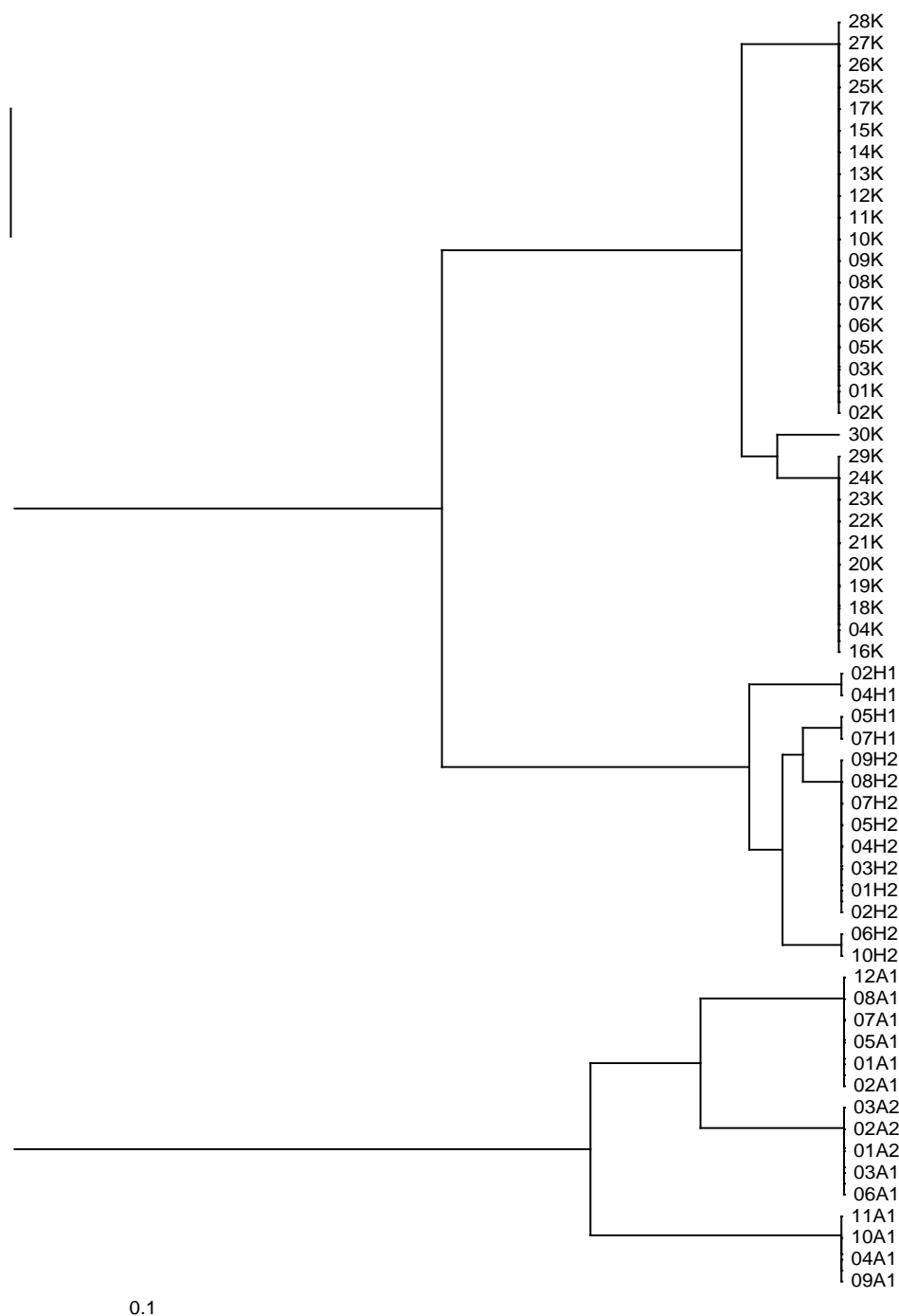


Рис. 3. Дендрограмма, построенная с учетом генетическим расстояний, рассчитанных по частотам встречаемости геномных участков ДНК, фланкированных инвертированными повторами 3'-фланга хелитрона *Hel-1* и микросателлита $(AGC)_6G$.

К - Калмыцкая порода; **A1, A2** - Айрширская порода;
H1, H2 - Черно-пестрый голштинизированный скот

Результаты кластерного анализа по спектрам продуктов амплификации участков геномной ДНК, фланкированных последовательностью 3'-фланга хелитрона *Hel-1* и микросателлита $(GAG)_6C$, показали, что в целом, с помощью данных праймеров также возможно достоверно дифференцировать исследуемые породы (Рис. 4). Исключением являются некоторые представители айрширской породы (01A1, 01A2, 02A2, 03A2), образующие общий кластер и группирующиеся вместе с представителями голштинизированного скота (Рис. 4).

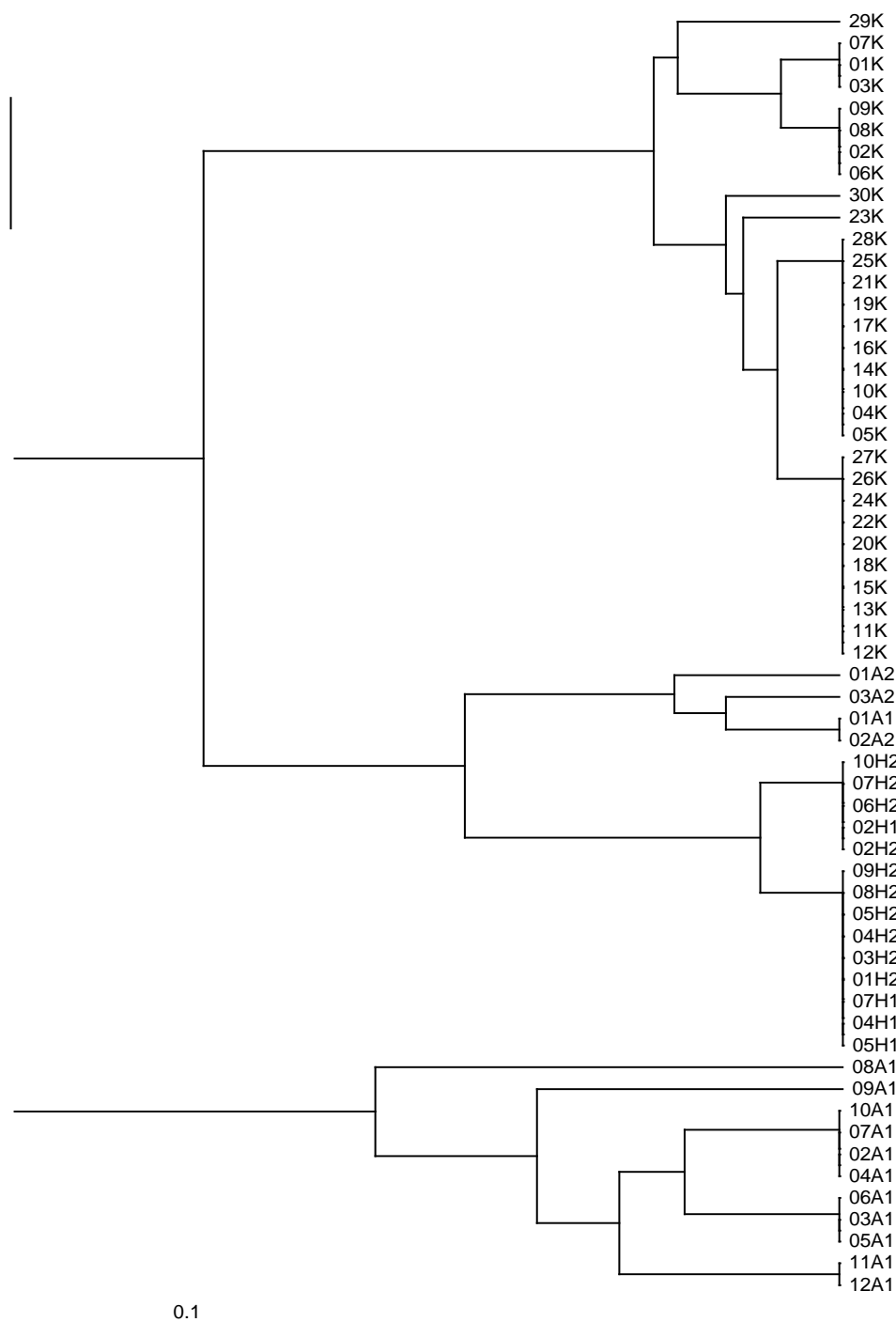


Рис. 4. Дендрограмма, построенная с учетом генетическим расстояний, рассчитанных по частотам встречаемости геномных участков ДНК, фланкированных инвертированными повторами 3'-фланга хелитрона Hel-1 и микросателлита (GAG)₆C.

К – Калмыцкая порода; **A1, A2** – Айрширская порода;

H1, H2 – Черно-пестрый голштинизированный скот.

Подобное распределение, как и в случае калмыцкой породы, можно объяснить широким использованием вводимых скрещиваний с улучшающей молочную продуктивность голштинской породой.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования консенсусной последовательности 3'-фланга хелитронов *Heliglora*, в комбинации с тринуклеотидными

микросателлитами (AGC)₆G и (GAG)₆C, для полилокусного генотипирования и выявления генетической дифференциации трех пород крупного рогатого скота. В целом, наиболее «богатые» спектры продуктов амплификации по количеству ДНК фрагментов разной длины специфичны для представителей местной калмыцкой породы и для черно-пестрого голштинизированного скота; наименьшее количество ампликонов выявлено у заводской породы айрширов. В геноме черно-пестрого голштинизированного скота нуклеотидные последовательности, гомологичные участкам хелитронов и тринуклеотидного микросателлита (AGC)₆G, обнаруживаются чаще, чем идентификационные последовательности ДНК транспозона хелитрона, локализованные в альтернативных цепях ДНК. Это позволяет предполагать определенные ассоциации между геномной локализацией хелитронов и микросателлита (AGC)₆G у данной группы животных. Полилокусное генотипирование с применением в качестве праймеров участков двух наиболее полиморфных геномных элементов (ДНК транспозон хелитрон, микросателлитные локусы) позволяет получать индивидуальные генетические профили животных, выявлять их породоспецифические особенности, необходимые для решения традиционных задач «селекции с помощью маркеров» (Marker Assisted Selection – MAS).

Примечания:

1. Глазко В.И. и др. Геномное сканирование, основанное на последовательностях гомологичных ДНК-транспозонам хелитроном // Интеграл. 2014. № 74. Т. 1. С. 30-32.
2. Бабий А.В. и др. ДНК транспозон хелитрон в выявлении генофондных отличий у пород крупного рогатого скота // Интеграл. 2015. № 1-2. С. 96-97.
3. Бабий А.В. и др. ДНК-транспозон хелитрон в геноме крупного рогатого скота // Ветеринария и кормление. 2015. №3. С. 30-33.
4. Глазко В.И. и др. Инвертированный повтор микросателлита (AGC)₆G фланкирует районы ДНК с участками гомологии к ретротранспозонам в геноме крупного рогатого скота // Инновационные технологии в медицине. 2014. №2. Т. 3. С. 63-79.
5. Косовский Г.Ю. и др. Популяционно-генетическая дифференциация молочного скота по ISSR-PCR маркерам // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2014. № 5. С. 53-56.
6. Косовский Г.Ю. и др. ISSR-PCR маркеры в оценках межпородной дифференциации крупного рогатого скота // Интеграл. 2014. №2, 3 (75). С. 12-15.
7. Глазко В.И. и др. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геномах сельскохозяйственных видов млекопитающих // Сельскохозяйственная биология. 2013. №2. С. 71-76.
8. Legarra A. et al. A comparison of methods for whole-genome QTL mapping using dense markers in four livestock species // Genetics Selection Evolution. 2015. V. 47: 6 (doi: 10.1186/s12711-015-0087-7).
9. Coates B. S. Horizontal transfer of a non-autonomous Helitron among insect and viral genomes // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 137-146.
10. С.Е. McInerney et al. Comparative genomic analysis reveals species dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in mollusks // Heredity. 2011. V. 106. P. 78–87.
11. X. Guo et al. Evidence of horizontal transfer of non-autonomous Lep1 helitrons facilitated by host-parasite interactions // Scientific reports. 2014. V. 4. P. 5119.
12. Garcia-Vallve, S., Puigbo, P. DendroUPGMA: A dendrogram construction utility. 2002. Режим доступа: <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>.
13. Gradi, F. C., Wenfeng, A. Non-LTR retrotransposons and microsatellites // Mobile genetic elements. 2013. V. 3. No 4. e25674.
14. D. L. Adelson et al. Interspersed repeats in the horse (*Equus caballus*); spatial correlations highlight conserved chromosomal domains // Animal Genetics. 2010. V. 41 (Suppl. 2). P. 91-99.
15. Kapitonov, V. V, Jurka, J. Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons // TRENDS in Genetics. 2007. V.23. No 10. P. 521-529.
16. Kapitonov, V.V, Jurka, J. Rolling-circle transposons in eukaryotes // PNAS. 2001. V. 98. No 15. P. 8714–8719.

17. Page, R. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers // CABIOS applications note. 1996. V. 12. No 4. P. 357-358.
18. Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 2537-2539.
19. Tateishi-Karimata H., Isono N., Sugimoto N. New insights into transcription fidelity: thermal stability of non-canonical structures in template DNA regulates transcriptional arrest, pause, and slippage // PLoS One. 2014. 9(3):e90580 (doi: 10.1371/journal.pone.0090580. eCollection 2014)
20. The Bovine genome consortium et al. The genome sequence of taurine cattle: a window to Ruminant biology and evolution // Science. 2009. V. 324. P. 522--532.
21. Thomas J., Schaack S., Pritham E. J. Pervasive horizontal transfer of rolling-circle transposons among animals // Genome Biol. Evol. 2010. V. 2. P. 656-664.
22. Kantanen J. et al. Utilization of farm animal genetic resources in a changing agro-ecological environment in the Nordic countries // Front. Genet. 2015. V.6:52. (doi: 10.3389 / fgene.2015.00052)
23. Yang L., Bennetze J. L. Structure-based discovery and description of plant and animal Helitrons // PNAS. 2009. V. 106, No 31. P. 12832 - 12837.
24. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. No 2. P. 176-183.

References:

1. Glazko VI et al. Genomic scanning, based on the sequences of homologous DNA transposons helitrons // Integral. 2014. №74. V. 1. pp 30-32.
2. Babii AV et al. DNA transposon gene pool helitron in identifying differences among breeds of cattle // Integral. 2015. №1-2. pp 96-97.
3. Babii AV et al. DNA transposon in the genome helitron cattle // Veterinary and feeding. 2015. №3. pp 30-33.
4. Glazko VI et al. The inverted repeat of microsatellite (AGC)₆G flanking regions of DNA regions of homology to the retrotransposon into the genome of cattle / VI eyes and others. // Innovative technologies in medicine. 2014. №2. V. 3. pp 63-79.
5. Kosovsky G. Yu et al. Population-genetic differentiation of dairy cattle for ISSR-PCR markers // Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2014. № 5, pp 53-56.
6. Kosovsky G. Yu et al. ISSR-PCR markers in estimates of interbreed differentiation of cattle // Integral. 2014. №2, 3 (75). pp 12-15.
7. Glazko VI et al. ISSR-PCR markers and mobile genetic elements in the genomes of farm mammals // Agricultural Biology. 2013. №2. pp 71-76.
8. Legarra A. et al. A comparison of methods for whole-genome QTL mapping using dense markers in four livestock species // Genetics Selection Evolution. 2015. V. 47: 6 (doi: 10.1186/s12711-015-0087-7).
9. Coates B. S. Horizontal transfer of a non-autonomous Helitron among insect and viral genomes // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 137-146.
10. C.E. McInerney et al. Comparative genomic analysis reveals species dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in mollusks // Heredity. 2011. V. 106. P. 78-87.
11. X. Guo et al. Evidence of horizontal transfer of non-autonomous Lep1 helitrons facilitated by host-parasite interactions // Scientific reports. 2014. V. 4. P. 5119.
12. Garcia-Vallve, S., Puigbo, P. DendroUPGMA: A dendrogram construction utility. 2002. Режим доступа: <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>.
13. Gradi, F. C., Wenfeng, A. Non-LTR retrotransposons and microsatellites // Mobile genetic elements. 2013. V. 3. No 4. e25674.
14. D. L. Adelson et al. Interspersed repeats in the horse (*Equus caballus*); spatial correlations highlight conserved chromosomal domains // Animal Genetics. 2010. V. 41 (Suppl. 2). P. 91-99.
15. Kapitonov, V. V, Jurka, J. Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons // TRENDS in Genetics. 2007. V.23. No 10. P. 521-529.

16. Kapitonov, V.V, Jurka, J. Rolling-circle transposons in eukaryotes // PNAS. 2001. V. 98. No 15. P. 8714–8719.
17. Page, R. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers // CABIOS applications note. 1996. V. 12. No 4. P. 357-358.
18. Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 2537-2539.
19. Tateishi-Karimata H., Isono N., Sugimoto N. New insights into transcription fidelity: thermal stability of non-canonical structures in template DNA regulates transcriptional arrest, pause, and slippage // PLoS One. 2014. 9(3): e90580 (doi: 10.1371/journal.pone.0090580. eCollection 2014)
20. The Bovine genome consortium et al. The genome sequence of taurine cattle: a window to Ruminant biology and evolution // Science. 2009. V. 324. P. 522-532.
21. Thomas J., Schaack S., Pritham E. J. Pervasive horizontal transfer of rolling-circle transposons among animals // Genome Biol. Evol. 2010. V. 2. P. 656–664.
22. Kantanen J. et al. Utilization of farm animal genetic resources in a changing agro-ecological environment in the Nordic countries // Front. Genet. 2015. V.6:52. (doi: 10.3389 / fgene.2015.00052)
23. Yang L., Bennetze J. L. Structure-based discovery and description of plant and animal Helitrons // PNAS. 2009. V. 106, No 31. P. 12832 – 12837.
24. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. No 2. P. 176-183.

УДК 575.174.015.3+ 636.01 + 636.082.1/2

Полилокусное генотипирование крупно рогатого скота с использованием высокополиморфных геномных элементов (микросателлиты, ДНК транспозон хелитрон)

¹ Анна Владимировна Бабий

² Светлана Николаевна Ковальчук

³ Татьяна Теодоровна Глазко

⁴ Глеб Юрьевич Косовский

⁵ Валерий Иванович Глазко

¹⁻⁵ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий, Москва, Российская Федерация

^{3,5} Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Российская Федерация

¹ младший научный сотрудник

E-mail: anna.babii@yahoo.com

² кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

E-mail: s.n.kovalchuk@gmail.com

³ доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник

E-mail: tglazko@rambler.ru

⁴ доктор биологических наук, директор

E-mail: gkosovsky@mail.ru

⁵ доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник

E-mail: vglazko@yahoo.com

Аннотация. Выполнено полилокусное генотипирование крупного рогатого скота местной калмыцкой породы мясного направления продуктивности и двух заводских пород молочного направления продуктивности: айрширской породы и черно-пестрого голштинизированного скота. В качестве праймеров в полимеразной цепной реакции

использовались консенсусная последовательность 3'-фланга хелитронов семейства *Heligloria* в комбинации с тринуклеотидными микросателлитами (AGC)₆G и (GAG)₆C, соответственно. Выявлено, что наиболее «богатые» спектры продуктов амплификации специфичны для представителей местной калмыцкой породы и для черно-пестрого голштиinizированного скота; наименьшее количество ампликонов выявлено у заводской породы айрширов. В геноме черно-пестрого голштиinizированного скота нуклеотидные последовательности, гомологичные участкам хелитронов и тринуклеотидного микросателлита (AGC)₆G, обнаруживаются чаще, чем идентификационные последовательности ДНК транспозона хелитрона, локализованные в альтернативных цепях ДНК. Это позволяет предполагать определенные ассоциации между геномной локализацией хелитронов и микросателлита (AGC)₆G у данной группы животных. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования консенсусной последовательности 3'-фланга хелитронов *Heligloria*, в комбинации с тринуклеотидными микросателлитами (AGC)₆G и (GAG)₆C, для полилокусного генотипирования и выявления генетической дифференциации трех пород крупного рогатого скота.

Ключевые слова: геном, геномное сканирование, крупный рогатый скот (КРС), транспозоны, хелитрон, микросателлиты.