Генетика сільськогосподарських тварин

УДК 636.13.082: 591.151

ТИПУВАННЯ ЖЕРЕБЦІВ-ПЛІДНИКІВ УКРАЇНСЬКОЇ ВЕРХОВОЇ ПОРОДИ ЗА ПОЛІМОРФНИМИ ДНК-МАРКЕРАМИ

Рецензенти: канд. с.-г. наук Косова Н.О.; канд. с.-г. наук Ткачова І.В.

В.І. Россоха, Н.М. Шкавро, О.А. Бойко, Г.М. Тур, Т.М. Ковальова, Л.В. Россоха

Інститут тваринництва УААН

У статті наведено результати дослідження геному жеребців-плідників української верхової породи за 15 поліморфними мікросателітними локусами ДНК, розраховані частоти виявлених алелів у специфічних локусах. Виявлено високий рівень поліморфізму досліджуваних ДНК-маркерів із найвищим (за локусом HTG10) значенням індексу ступеня поліморфізму (PIC) - 0,785; ступеня гетерозиготності (Н) – 81 % та кількості активно діючих алелів у локусі (Е) – 5,33. Найбільша кількість алелів встановлена за локусом ASB2 – 8 алелів. Проведено оцінку генетичної структури досліджуваних представників породи за наявністю гомо- та гетерозиготних генотипів та встановлена наявність значної переваги останніх.

Ключові слова: **мікросателітні локуси ДНК, поліморфізм, геном, праймери, полімеразна ланцюгова реакція, коні.**

Українська верхова порода коней (як порода верхових коней спортивного призначення офіційно затверджена в 1990 році) виведена в кінних заводах і господарствах України схрещуванням кобил угорських порід із жеребцями тракененської, ганноверської, чистокровної верхової і російської верхової порід, є носієм унікального генетичного матеріалу, вивчення якого викликає значний інтерес як із теоретичної, так і з практичної точки зору. У 2008 році вісім жеребців-плідників української верхової породи (табл. 1) пройшли атестацію та отримали дозвіл на використання їх у програмах відтворення.

1. Жеребці-плідники української верхової породи, що допущені до відтворення у 2008 році

Кличка, (номер за ДКПК)	Рік народження	Масть	Порода	Номер за ДКПК та кличка батька (дата народження)	Номер за ДКПК та кличка матері (дата народження)
ПАРИЖ	2004	гн	УВП	Рубін	Позиція
ГАВР	2004	руд	УВП	Грохот	1305 Ганка
ФЛАГМАН	2004	т-гн	УВП	Мохок	Фахта
ХМЕЛЬНИК	2000	т-гн	УВП	227 Клівер	1422 Хорта
ХОЛДИНГ	2003	руд	УВП	-	-
МОРФЕОЗ	1999	гн	УВП	Halling	Vilani
КОСМОДРОМ	2005	т-гн	УВП	Дуплет	802 Куранта
АЛМАЗ	2005	руд	УВП	Зефір	Аорта

Тому, при проведенні генетичної оцінки цих тварин, окрім визначення імуногенетичних маркерів груп крові, необхідним є також і виявлення поліморфних мікросателітних послідовностей ДНК. Для цих цілей була використана панель з 15 мікросателітних локусів ДНК, що включає дев’ять

основних локусів, що рекомендовані ISAG (Міжнародне суспільство по генетиці тварин) та додатково шість локусів, які найчастіше використовуються для контролю походження та ідентифікації коней – AHT4, ASB2, ASB17, ASB23, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, CA425, LEX3, VHL20 [1-4].

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом дослідження були зразки волосся з волосяними цибулинками із гриви коней. ДНК видаляли методом неорганічної екстракції з використанням хелатуючого реагенту Chelex-100 [5]. Мікросателітні локуси були ампліфіковані за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за допомогою термоциклера БіоКом (Росія). Використовували стандартні реагенти «Набір для генотипування коней» («Equine Genotypes 1.1 Kit»), фірми Finnzymes Diagnostics, Фінляндія (табл. 2). Реакційна суміш для проведення ПЛР містила: 10x PCR Buffer, dNTPmix (суміш 4 дезоксирибонуклеотидів, по 1,25 mM кожний), Phusion Hot Start DNA полімеразу (0,09 U/μL) та суміш праймерів. Загальний об'єм суміші – 20 мкл. Реакцію проводили в наступному температурному режимі: початкова денатурація ДНК – 98 °С – 3 хв; далі 30 циклів за схемою: денатурація ДНК– 98 °С – 15 с; відпал праймерів – 60 °С – 75 с; синтез ланцюгів ДНК – 72 °С – 30 с; потім заключний синтез ДНК – 72 °С – 5 хв. Аналіз продуктів ампліфікації проводили за допомогою капілярного електрофорезу на ДНК-секвенаторі ABI PRISM 3110, фірми Applied Biosystems – ця техніка високоефективна при ідентифікації індивідуальних варіантів аналізованих локусів та гарантує високе відтворення результатів. Як стандарт розмірів фрагментів ДНК використовували маркер LIZ-500 [6]. Розмір ідентифікованих фрагментів ДНК (алелів) визначали за допомогою комп'ютерної програми GeneScan 2.1.

Результати досліджень. Загалом було ідентифіковано 71 алель за 15 досліджуваними локусами (див. табл. 2). Найбільшу кількість алелів мав локус ASB2 (8 алелів), а найменшу – локуси HMS6 та HTG4, за якими ідентифіковано по 3 алелі. За іншими алелями встановлено достатньо рівномірний розподіл за визначеними локусами від 4 у локусах HMS2 та ASB2 до 6 у локусах HMS3 та HTG10. За кількістю ідентифікованих алелів по кожному з локусів були визначені частоти алелів та розраховані ступені гомо- та гетерозиготності (H), кількість активно діючих алелів у локусі (E) та індекс ступеня поліморфізму (PIC). Отримані дані розрахунків представлені в табл. 3. За всіма дослідженими локусами визначено кількість гомо- та гетерозиготних генотипів, причому, за локусом LEX3 визначено наявність тільки гомозиготних генотипів, а за локусами HMS3, HTG10, VHL20 та ASB23 – тільки гетерозиготних форм; за локусом HTG6 зафіксовано рівновагу між гомо- та гетерозиготними генотипами.

Максимальна кількість алелів та генотипів була виявлена за локусами ASB2 (8 алелів та 7 генотипів), HMS3 та HTG10 (відповідно по 6 та 7), а також зафіксовано за локусами HMS7 та ASB23 – 5 алелів та 6 генотипів (див. табл. 3).

2. Частоти алелів мікросателітних локусів, що ідентифіковані за 15 досліджуваними мікросателітними локусами ДНК (M±m)

Локус	Алель (п.н.)	Частота алелів	Локус	Алель (п.н.)	Частота алелів
AHT4	143	0,125±0,083	**HTG4**	126	0,375±0,121
	147	0,125±0,083		128	0,125±0,083
	149	0,125±0,083		130	0,500±0,125
	157	0,563±0,124	**HTG6**	78	0,438±0,124
	159	0,063±0,061		84	0,313±0,116
ASB2	222	0,063±0,061		90	0,063±0,061
	237	0,438±0,124		94	0,188±0,098
	241	0,063±0,061	**HTG7**	116	0,188±0,098
	243	0,125±0,083		122	0,250±0,108
	245	0,063±0,061		124	0,563±0,124
	247	0,063±0,061	**VHL20**	85	0,250±0,108
	249	0,063±0,061		91	0,250±0,108
	251	0,125±0,083		93	0,250±0,108
HMS2	214	0,125±0,083		95	0,188±0,098
	220	0,313±0,116		99	0,063±0,061
	222	0,438±0,124	**ASB17**	97	0,313±0,116
	224	0,125±0,083		109	0,063±0,061
HMS3	148	0,250±0,108		111	0,500±0,125
	156	0,188±0,098		119	0,125±0,083
	158	0,063±0,061	**ASB23**	187	0,250±0,108
	160	0,063±0,061		189	0,250±0,108
	162	0,250±0,108		191	0,063±0,061
	166	0,188±0,098		205	0,250±0,108
HMS6	156	0,250±0,108		209	0,125±0,083
	160	0,438±0,124	**CA425**	228	0,125±0,083
	166	0,438±0,124		230	0,125±0,083
HMS7	171	0,063±0,061		236	0,063±0,061
	173	0,188±0,098		238	0,625±0,121
	175	0,250±0,108		240	0,063±0,061
	177	0,250±0,108	**LEX3**	140	0,125±0,083
	179	0,250±0,108		144	0,250±0,108
HTG10	85	0,125±0,083		152	0,125±0,083
	89	0,188±0,098		158	0,250±0,108
	91	0,063±0,061		160	0,250±0,108
	93	0,188±0,098			
	97	0,250±0,108			
	103	0,188±0,098			

Параметри, що обчислені в цьому дослідженні, показали, що всі мікросателітні локуси ДНК у досліджених жеребців української верхової мають високий ступінь поліморфізму. Так, значення ступеня гетерозиготності (Н) для кожного з маркерів перевищив 50 %, а в деяких випадках навіть більше 80 відсотків.

3. Фактична кількість алелів та генотипів, кількість активно діючих алелів (Е), ступені гетерозиготності (Н) та індекс ступеня поліморфізму (PIC), що обчислені за 15 мікросателітними локусами ДНК

Локус	n алелів	n генотипів	H	E	PIC
AHT4	5	5	0,633	2,72	0,599
ASB2	**8**	**7**	0,758	4,13	0,735
HMS2	4	5	0,680	3,12	0,624
HMS3	6	**7**	0,797	4,92	0,766
HMS6	3	5	0,555	2,25	0,457
HMS7	5	6	0,773	4,41	0,735
HTG10	6	**7**	**0,813**	**5,33**	**0,785**
HTG4	3	4	0,594	2,46	0,511
HTG6	4	6	0,672	3,05	0,612
HTG7	3	4	0,586	2,42	0,468
VHL20	5	5	0,773	4,41	0,765
ASB17	4	5	0,570	2,33	0,462
ASB23	5	6	0,793	4,83	0,762
LEX3	5	5	0,781	4,57	0,746
CA425	5	5	0,570	2,33	0,539

Рівень поліморфності є важливим інтегральним покажчиком, який характеризує кількість активно діючих алелів у популяції (Е). Найвищими показниками оцінюваних параметрів характеризувався локус HTG10 (H=0,813, E=5,33) (див. табл. 3). Також локуси ASB2, HMS3, HMS7, VHL20, ASB23 та LEX3 є найбільш поліморфними у досліджених представників української верхової породи коней (значення Н у межах від 0,758 до 0,797; Е у межах від 4,13 до 4,92). В інших локусах кількість активно діючих алелів коливалася в межах від 2,25 (локус HMS7) до 3,12 (локус HMS2), показник рівня гетерозиготності від 0,555 до 0,680, відповідно.

Визначені на основі частот алелів параметри PIC (індекс ступеня поліморфізму) (див. табл. 3) були на рівні понад 0,45, а максимальні значення PIC (понад 7,30) встановлені за шістьма з досліджуваних п’ятнадцяти локусів.

Отже, можна стверджувати, що досліджувані мікросателітні локуси ДНК характеризуються високим рівнем поліморфності. Тому, генетичний ДНК-профіль, що отриманий у результаті проведених досліджень для восьми жеребців-плідників, які допущені до системи відтворення та від яких у подальшому буде одержано потомство, є ідеальним високоінформативним матеріалом. Це може бути використано не тільки для вирішення питань контролю походження тварин і для вивчення особливостей генетичної структури породи, а й для пошуку різних ділянок ДНК структурних генів, зчеплених із генами окремих ознак у коней.

Таким чином, дослідження молекулярно-генетичних маркерів безпосередньо пов'язані з практичною селекцією і дають змогу їх використовувати при розробленні в подальшому перспективних моделей розведення.



Висновки:

1. Досліджені мікросателітні маркери характеризуються високим рівнем поліморфізму (PIC - від 0,462 до 0,785; H – від 55 % до 81 %), завдяки чому можуть бути використані при дослідженні генетичного різноманіття та контролі походження коней.

2. За аналізом виявлених генотипів за локусом LEX3, усі визначені генотипи представлені гомозиготними формами. Отримані дані за чотирнадцятьма з п’ятнадцяти досліджених мікросателітних локусів ДНК свідчать про наявність значної переваги гетерозиготних генотипів над гомозиготними, у зв’язку з чим є оптимальними з точки зору експертизи походження коней, а також це може бути використано в подальших програмах перспективного розвитку породи.

Бібліографічний список

1. Marklund S. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites / S. Marklund, H. Ellegren, S. Eriksson [et al.] //Anim. Genetics. – 1994. – №25. – P.19-23.

2. Сателлитные ДНК / В. Хемлебен, Т.Г. Беридзе, Л. Бахман [и др.]// Успехи биологической химии. – 2003. – Т.43. – С. 267-306.

3. Applicability of nine microsatellite DNA sequences eleven polymorphic blood protein and enzyme systems for the parentage control in Polish Arabian and Thoroughbred horse / B. Gralak, J. Kuril, M. Lukaszewicz [et al.] // Anim. Sci. Papers and Reports. – 1998. – V. 16, №4. – P. 209-218.

4. Храброва Л.А. Генетическая дифференциация чистокровных пород лошадей по локусам микросателлитов ДНК / Л.А. Храброва, М.А. Зайцева, Л.В. Калинкова // Сельскохозяйственная биология, №2. – 2008. – С. 31- 34.

5. GenePrint™ STR Systems (Silver Stain Detection) Technical Manual // Promega Corp. – 1998. – P. 1-4.

6. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci / J.S. Ziegle, Su. Ying, K.P Corcoran [et al.] // Genomics. – 1992. – 14. – P.1026-1031.

ТИПИРОВАНИЕ ЖЕРЕБЦОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ УКРАИНСКОЙ ВЕРХОВОЙ ПОРОДЫ ПО ПОЛИМОРФНЫМ МАРКЕРАМ ДНК

Россоха В.И., Шкавро Н.Н., Бойко Е.А., Тур Г.Н., Ковалева Т.Н., Россоха Л.В., Институт животноводства УААН

В статье приведены результаты изучения генома жеребцов-производителей украинской верховой породы по 15 полиморфным микросателлитным локусам ДНК, рассчитаны частоты выявленных аллелей в специфических локусах. Выявлен высокий уровень полиморфизма исследованных маркеров ДНК с наивысшим (по локусу HTG10) значением индекса степени полиморфизма (PIC) - 0,785; степени гетерозиготности (Н) – 81 % и количества активно действующих аллелей в локусе (Е) – 5,33. Наибольшее количество аллелей установлено по локусу ASB2 – 8 аллелей. Проведена оценка генетической структуры исследованных представителей породы по наличию гомо- и гетерозиготных генотипов и установлено наличие значительного преобладания последних.

Ключевые слова: микросателлитные локусы ДНК, полиморфизм, геном, праймеры, полимеразная цепная реакция, лошади.

UKRAINIAN TROTTING BREED STALLIONS TYPING ACCORDING TO POLYMORPHOUS DNA-MARKERS

Rossokha V., Shkavro N., Boyko E., Tur G., Kovaleva T., Rossokha L. Institute of animal science, UAAS.

This article highlights the experimental research results on Ukrainian trotting breed stallion genome investigation. The research was fulfilled by fifteen polymorphous micro-satellite DNA locus use. Allele frequencies were identified in the specified locus. The tested polymorphous DNA marker level observed to be the top. 0,785 PIC proved to be the top for HTG10-locus. HJ percentage forms 81%. 5,33 active alleles were defined in E locus. The top eight- allele number was computed in ASB2 locus. Genetic structure was investigated in the tested horses of the above-mentioned breed. Genetic structure was researched by homozygous and heterozygous genotypes. Heterozygous genotypes observed to advantage homozygous ones.

Key words: micro-satellite DNA locus, polymorphism, genome, primers, polymeric chain reaction (PCR), horses.