

УДК 636.13.082: 591.151

Шкавро Н.М., к.с.г.н. (shkavro@ukr.net)
Ткачик Т.Е., к.б.н. (tim.tkachik@gmail.com)
Россоха В.І., к.с.г.н. ©
Інститут тваринництва НААН, Харків

ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ДНК ДЛЯ ПІДТВЕРДЖЕННЯ ПОХОДЖЕННЯ КОНЕЙ ГУЦУЛЬСЬКОЇ ПОРОДИ

У статті наведені результати тестування коней гуцульської породи за мікросателітними локусами ДНК. Локус ASB2 визначено як найбільш поліморфний (виявлено 5 алельних варіантів локусу та переважно гетерозиготні варіанти генотипів, $H=0,727$, $E=3,66$, $PI=0,700$). На основі порівняльного аналізу електрофоретичних профілей батьків та їх потомків підтверджене походження 12 коней за трьома мікросателітними локусами ДНК.

Ключові слова: ДНК, мікросателітні локуси, поліморфізм, експертиза походження, коні.

Вступ. У вітчизняному конярстві гостро стоїть проблема оцінки та збереження генетичних ресурсів. Згідно з даними експертів Всесвітньої продовольчої організації ООН [1], основною перешкодою для розробки селекційних програм зі збереження локальних і аборигенних порід сільськогосподарських тварин є брак інформації про генетичну структуру популяцій, так як статус ризику, який базується тільки на чисельності поголів'я, не відображає повною мірою картину можливих генетичних втрат. У конярстві України традиційно для вивчення генетичної структури порід, а також при проведенні експертизи походження та ідентифікації коней, починаючи з 70-80 років ХХ століття використовували локуси поліморфних систем крові (еритроцитарні антигени і сироваткові білки) [2]. В даний час, відповідно до рекомендацій ISAG і вимог Міжнародного комітету з племінних книг (ISBC), із застосуванням як генетичних маркерів мікросателітних послідовностей ДНК з'явилася можливість надійної генетичної ідентифікації кожної тварини й досягнення максимальної ефективності контролю походження. Генетична експертиза походження коней за мікросателітними локусами ДНК має ряд переваг, головна з яких - висока ефективність (надійність проведення генетичної експертизи походження та уточнення батьківства сягає 99,9%) у порід. Вивчення генетичної структури місцевих локальних нечисленних порід тварин, що вирощуються в певних географічних і кліматичних умовах, та пошук видо- та породоспецифічних мікросателітних ДНК-маркерів є досить актуальним, за умов подальшого обговорення виявлених закономірностей на міжнародних форумах з метою розширення та доповнення існуючої панелі

мікросателітних локусів для ідентифікації коней. В системі моніторингового тестування коней, відповідно до ISAG/FAO 2004, в якості високоінформативних генетичних маркерів визначено панель з 17 мікросателітних локусів ДНК - АНТ4, АНТ5, ASB2, ASB17, ASB23, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, НТГ4, НТГ6, НТГ7, НТГ10, СА425, LEX3, VHL20. Проте найбільш використовуваним в даний час є застосування явища поліморфізму мікросателітних локусів ДНК саме для підтвердження походження коней.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження виступала ДНК, що виділена з крові коней за методом Кавасакі з модифікаціями (Kawasaki E.S., 1990). Досліди проведені на групі коней гуцульської породи НВА "Племконецентр" Свалявського району Закарпатської обл., що за записами в родоводі характеризуються родинними зв'язками (n=20). Аналіз особливостей генетичної структури порід коней за поліморфними мікросателітними локусами ДНК проводили методом мультиплексної ПЛР за використання наступних праймерів: для локусу НТГ6 5'-CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT-3' та

5'-GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT-3';

для локусу ASB2 5'-CCTTCCTGTAGTTTAAGCTTCTG-3' та

5'-CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG-3';

для локусу HMS2 5'-ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG-3' та

5'-CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAAT-3'. Режим проведення

ампліфікації: денатурація ДНК при 96°C – 2 хв, далі 10 циклів за схемою: денатурація ДНК при 96°C – 40 сек, відпал праймерів при 60°C – 40 сек, синтез ланцюгів ДНК при 71°C – 40 сек; потім 25 циклів за схемою - денатурація ДНК при 90°C – 40 сек, відпал праймерів при 60°C – 40 сек, синтез ланцюгів ДНК при 71°C – 40 сек (в останньому циклі впродовж 3 хв). Детекція продуктів ампліфікації проводилась шляхом електрофоретичного розподілу молекул ДНК у 8 % поліакриламідному гелеві в денатуруючих умовах (у присутності сечовини), напруженість поля 300V. Як барвник ДНК використовувався розчин бромистого етидію в концентрації 1 мг/см³. Як стандарт молекулярної маси використовували DNA markers M50 та pUC ("Fermentas", Литва).

Результати дослідження. Для створення можливості одночасного визначення поліморфізму декількох мікросателітних локусів ДНК коней із панелі, що запропонована ISAG, були проаналізовані нуклеотидні структури та температури відпалу праймерів для забезпечення їх активізації при однаковій температурі в одній реакційній суміші (проведення мультиплексної ПЛР). Було визначено систему локусів (НТГ6, ASB2 та HMS2), ампліфіковані фрагменти яких за своєю довжиною не пересікаються. За формулою 1 розраховано температури плавлення праймерів та визначено оптимальну температуру відпалу праймерів, яка становила 60°C. Були підібрані параметри проведення мультиплексної ПЛР – концентрація та кількість компонентів реакційної суміші, температурні умови проведення ампліфікації.

$$T_{пл}(^{\circ}C) = [(n_G + n_C) \cdot 4] + [(n_A + n_T) \cdot 2] \quad (1),$$

де n_A, n_T, n_G, n_C – кількість відповідних нуклеотидів у праймері.

За результатами проведеного аналізу поліморфізму мікросателітних послідовностей ДНК підконтрольної групи коней гуцульської породи (табл.1) встановлено високий поліморфізм за всіма дослідженими локусами: за локусом HTG6 виявлено 4 алелі та 5 варіантів генотипів, серед яких 11,1% є гомозиготними; за локусом ASB2 - 5 алелей та 6 варіантів генотипів і визначено їх 100% гетерозиготність. За локусом HMS2 виявлено 4 алелі та розподіл гомо- та гетерозиготних генотипів на рівні 0,188 та 0,812, відповідно.

Таблиця 1

Розподіл генотипів підконтрольної групи коней гуцульської породи за мікросателітними локусами ДНК

Локус	хромосома	розмір, п.н.	кількість алелей	кількість варіацій генотипів	гомозиготні генотипи, %	гетерозиготні генотипи, %
HTG6	15	84-106	4	5	11,11	88,89
ASB2	15	154-188	5	6	-	100,0
HMS2	10	216-238	4	7	18,75	81,25

За кількістю ідентифікованих алелів за дослідженими локусами і визначеними частотами алелів, було розраховано ступені гетерозиготності - Н, ефективна кількість алелей в локусі - Е та індекс ступеня поліморфізму - PIC (табл.2).

Таблиця 2

Популяційно-генетичні параметри, що обчислені за мікросателітними локусами ДНК підконтрольної групи коней гуцульської породи

Локус	Алель	Частота алелей	Н	Е	PIC
HTG6	1	0,278±0,075	0,722	3,60	0,669
	2	0,333±0,079			
	3	0,278±0,075			
	4	0,111±0,052			
ASB2	1	0,156±0,062	0,727	3,66	0,700
	2	0,406±0,084			
	3	0,219±0,071			
	4	0,188±0,067			
	5	0,031±0,010			
HMS2	1	0,188±0,067	0,711	3,46	0,667
	2	0,375±0,083			
	3	0,313±0,079			
	4	0,125±0,057			

Так, значення ступеня гетерозиготності (Н) перевищувало 70%. Найвищими показниками оцінюваних параметрів для гуцульської породи характеризувався локус ASB2 (Н=0,727, Е=3,66), який є найбільш поліморфним в дослідженій вибірці коней. На основі виявлених частот алелей проведено аналіз поліморфізму мікросателітних послідовностей ДНК з

визначенням індексу ступеня поліморфізму (PIC), значення якого для кожного локусу було на рівні понад 0,66, таким чином можна стверджувати, що досліджені локуси характеризуються високим рівнем поліморфності.

З метою підтвердження походження коней за мікросателітними локусами ДНК за батьком, матір'ю, або за двома батьками, проведено тестування одночасно за трьома локусами, відповідно до менделівського характеру успадкування. На рис.1 наведено алгоритм визначення походження шляхом порівняння бендів на електрофореграмі (відповідно визначеним алелям мікросателітного локусу) батьків та їх потомків. За трьома мікросателітними локусами ДНК - HTG6, ASB2 та HMS2 було підтверджено походження коней за двома батьками для 7 особин, за матір'ю - для двох особин піддослідного стада, за батьком - для трьох коней.

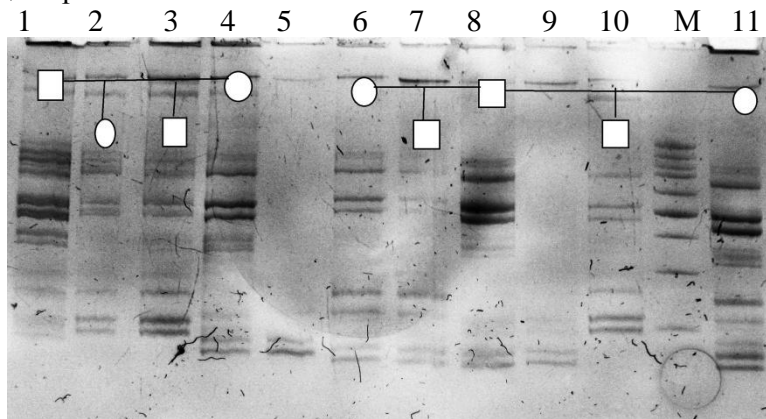


Рис.1 Приклад перевірки походження коней за локусами HTG6, ASB2 та HMS2. Доріжки 1-11 - ДНК коней, включаючи батьків та їх нащадків, М - маркер розмірів фрагментів ДНК M50.

Висновки.

1. Розроблені оптимальні параметри проведення мультиплексної ПЛР за трьома мікросателітними локусами ДНК - HTG6, ASB2 та HMS2 для дослідження генетичної структури популяцій коней.

2. Аналіз розподілу алелей та генотипів мікросателітних локусів ДНК гуцульської породи коней виявив високий поліморфізм локусів HTG6, ASB2 та HMS2, найбільш інформативним є локус ASB2 ($H=0,727$, $E=3,66$, $PIC=0,700$).

3. Використання мультиплексної ПЛР (HTG6+ASB2+HMS2) дозволяє вирішувати спірні питання експертизи походження племінних коней за умов порівняльного аналізу електрофоретичних профілей мікросателітних локусів ДНК батьків та їх потомків.

Література

1. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture/ Commission on genetic resources for food and agriculture food and agriculture organization of the united nations - Rome. - 2007// <http://www.fao.org/docrep/010/a1200e/a1200e00.htm>
2. Bowling, A.T. The genetics of the horse/A.T.Bowling, A.Ruyinsky// Wallington. - 2000. - 203 p.
3. Эрнст, Л.К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке/Л.К. Эрнст, Н.А. Зиновьева// М.: РАСХН. - 2008. - С.228-288.
4. Храброва Л.А. Генетическая дифференциация чистокровных пород лошадей по локусам микросателлитов ДНК / Л.А. Храброва, М.А. Зайцева, Л.В. Калинкова//Сельскохозяйственная биология. – 2008. - №2. – С. 31 – 34.
5. Van De Goor L.P. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci/L.P. van De Goor, H. Panneman, W.A. van Haeringen//Animal Genetics. – N.41. – 2009. – P.122-127.
6. Felicetti M. Genetic diversity in the Maremmano horse and its relationship with other European horse breeds /M. Felicetti, M. Lopes, A.Verini-Supplizi, [et al.] //Anim. Genet. – 2010. – N.41. – Suppl. 2. – P. 53-55.
7. Kwiatkowska J. Powtórzenia sekwencji mikrosatelitarnych w genomie człowieka/J. Kwiatkowska, R. Słomski//Post. Biol. Kom. – 1996. - N 23. – P. 19-29.

Summary

Shkavro N., Tkachik T., Rossoha V.,

Institute of animal science NAAS, Kharkov, Ukraine

MICROSATELLITE DNA LOCI POLYMORPHISM APPLICATION FOR HUTSUL HORSES BREED PARENTAGE CONTROL

The article highlights the results of Hutsul horses breed testing by microsatellite DNA loci. The ASB2 locus defined as the most polymorphic (the five allelic variants and high heterozygosity genotype level were detected, $H = 0,727$, $E = 3,66$, $PIC = 0.700$). The origin of 12 horses by three microsatellite DNA loci was confirmed based on a comparative analysis of electrophoretic profiles of parents and their offspring.

Key words: *microsatellite DNA loci, polymorphism, parentage control, horses.*

Рецензент – д.с.-г.н., професор Щербатий З.С.