

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОШАДЕЙ ТРАКЕНЕНСКОЙ ПОРОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДНК

А. Н. РУДАК, А. И. ГЕРМАН, Ю. И. ГЕРМАН,
М. А. ГОРБУКОВ, В. И. ЧАВЛЫТКО

Введение

Целью исследования является генетическая характеристика лошадей породы Трахененской с использованием данных полиморфизма микросателлитных локусов ДНК.

Материал и методы

Исследование проводилось на 42 лошадей породы Трахененской, выращенных в Беларуси. Для генотипирования были использованы микросателлитные локусы ASB17NR (0,190), HMS3E, LEX3, LEX300, CA425. Анализ проводился с помощью метода ДНК-анализа.

Результаты

В результате исследования было выявлено, что у лошадей породы Трахененской преобладают гомозиготные генотипы по локусам ASB17NR (0,190), HMS3E, LEX300. Наибольшее количество аллелей было выявлено по локусу CA425 (9 аллелей).

Выводы

Лошади породы Трахененской характеризуются низким уровнем генетического разнообразия по микросателлитным локусам ДНК.

Ключевые слова:

Genotyping of horses of the Trakehner breed (n=42), bred in Belarus, was carried out using DNA analysis methods, as a result of data processing, it was found that they have a peculiar genetic profile due to various genotypic combinations of alleles. The ASB17, HMS3, and LEX3 microsatellite loci, which numbered from 18 to 22 genotypic combinations, were distinguished by a high level of polymorphism. The most polymorphic loci were dominated by animals with the ASB17NR (0.190), HMS3IO (0.119) genotypes and homozygous LEX300 (0.214) genotypes. As a result of the research, it was found that horses of the Trakehner breed of domestic selection are characterized by an average level of genetic diversity in microsatellite loci, in whose DNA 108 alleles were typed. Two of them were the most polymorphic: CA425 (9 alleles out of

11 registered) and HMS3 (9 out of 14). A low level of genetic diversity was noted at three loci: HTG4, HTG6, and HTG7 (4 alleles). In the CA425 and HMS2 microsatellite loci, private G and N alleles with different frequencies were found. Of particular interest is the study of polymorphism of the LEX3 locus, which is located on the X chromosome and characterizes the diversity of population along the maternal side. In the course of research, 8 alleles out of 14 registered were identified in this locus. In the horses of Trakehner breed, the alleles H, M, N, O, and P were typed, which indicates the presence of common female ancestors in their pedigree.

The data obtained in the course of conducted research will become a theoretical basis for identifying candidate genes that determine economically useful traits in horses of riding breeds, which will significantly increase the effectiveness of genotypic assessment of animals and the efficiency of breeding work in general.

Key words: Trakehner horse breed, DNA microsatellites, allele, genotype, polymorphism.

Введение. Важной предпосылкой для дальнейшего повышения роста и улучшения репродуктивности животных с учётом особенностей генофонда пород и популяций является обстоятельное описание их генетического разнообразия. Основным инструментом для этих целей являются молекулярно-генетические маркеры, в частности микросателлиты (STR-short tandem repeats), определяющие способность характеризовать генетические вариации и оценивать генетическую структуру популяций. Микросателлитные маркеры (или короткие tandemные повторы, STR) представляют собой наиболее доступный, с относительно несложной методикой определения тип молекулярных маркеров, которые нашли широкое применение в популяционно-генетических исследованиях животных. Эти повторы составляют основу полиморфизма микросателлитов, имеющих определенную локализацию для каждого вида. Высокий полиморфный характер и менделевский тип наследования микросателлитов делает их идеальными ДНК-маркерами в геноме сельскохозяйственных животных [1].

Кроме того, STR анализ остается бесценным генетическим инструментом для установления родства, идентификации и чистопородности животных, а также для картирования и оценки потоков генов между популяциями. Также для оценки генетического потенциала лошадей непосредственно на уровне генотипа и для характеристики различных пород проводятся эксперименты по выявлению информативных SNPs и разработке систем анализа ДНК-маркеров, влияющих на проявление селекционно и экономически значимых признаков [2].

Дополнительная генетическая информация значительно увеличивает точность селекционной ценности молодых неиспытанных лошадей, а также взрослых лошадей, не имеющих оцененного потомства. Поэтому геномная селекция дает возможность проводить отбор в раннем возрасте, сократить интервал смены поколений и ускорить генетический прогресс при совершенствовании верховых пород лошадей [3].

Цель исследований – установить генетическую характеристику лошадей траккененской породы с использованием данных полиморфизма микросателлитных локусов ДНК.

Основная часть. Исследования проводились в ведущих хозяйствах по разведению лошадей траккененской породы – Учреждении «РЦОПКС и К» Минского и РСУП «Совхоз Лидский» Лидского районов.

Для выполнения ДНК-анализа в указанных хозяйствах был проведен отбор проб биоматериала (волосы из гривы в области холки). От одной лошади было отобрано не менее 20 волос с луковицами. Биологический материал, полученный от каждого животного, помещался в бумажный конверт, с присвоением определенного номера.

Исследования образцов осуществлялись в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» согласно методике мультиплексного генотипирования образцов ДНК лошадей по 17 микросателлитным локусам, рекомендованным ISAG: ANТ4, ANТ5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG7, HTG6, HTG10, VHL20, LEX3.

Процедуру генотипирования лошадей проводили в несколько этапов, включающих выделение ДНК из биологического материала, амплификацию необходимых для анализа участков ДНК с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), электрофорез продуктов амплификации и интерпретацию полученного STR-профиля.

Препараты ДНК экстрагировали перхлоратным методом из образцов волосных луковиц животных. Концентрацию и степень чистоты препаратов ДНК оценивали с использованием спектрофотометра Gene Quant 1300 (Healthcare).

Для амплификации ДНК использовали термоциклер Sure Cyclor 8800 (Agilent Technologies), ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, включающей: 100 нг ДНК, праймеры в количестве 1–12 пМ, по 200 мкМ каждого из дНТФ, 1х буфер (10 мМ трис рН 8,6, 50 мМ KCl, 0,1 % tween-20), 2,0 мМ MgCl₂ и 1,3 ед. акт. ArtStart ДНК-полимеразы (ООО «АртБиоТех»). В ПЦР использовали олигонуклеотидные праймеры, модифицированные по 5'-терминальным нуклеотидам четырьмя различными флуоресцентными красителями: FAM, TMR, R6G, ROX. ПЦР амплификации ДНК микросателлитных локусов проводили в следующем режиме: начальная денатурация – 2 мин при 95 °С; 30 циклов: денатурация – 30 сек при 95 °С, отжиг праймеров – 30 сек при 59 °С, элонгация – 60 сек при 72 °С; финальная элонгация – 1 ч при 72 °С. Электрофоретическое фракционирование продуктов ПЦР осуществляли в генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied

Biosystems), в капиллярах длиной 50 см, заполненных полимером POP-7, в режиме фрагментного анализа. Перед загрузкой амплифицированных образцов в генетический анализатор их смешивали с 9 мкл формамида и 0,3 мкл внутреннего стандарта размера GeneScan 600 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) в расчете на 1 мкл образца. Проводили денатурацию полученной смеси в течение 5 мин при 95 °С, смесь охлаждали на льду в течение 3 мин.

Анализ полученных в результате электрофоретического фракционирования фрагментов ДНК данных и определение размеров выявленных аллелей исследуемых локусов и соответствующих генотипов животных проводили с использованием программного обеспечения Gene Mapper 4.1 (Applied Biosystems) [4].

Особенности полиморфизма микросателлитных локусов лошадей тракененской породы определялись по следующим показателям:

– частотам встречаемости генотипов изученных локусов микросателлитов ДНК по формуле (1):

$$P_{AA} = p_{AA}/N, \quad (1)$$

где P – частота в долях единицы определенного генотипа; p_{AA} – количество животных с генотипом AA ; N – общее количество животных.

– частотам аллелей изученных локусов по формуле максимального правдоподобия, формула (2):

$$p_A = \frac{2n_{AA} + n_{Aa} + \dots}{2N} \quad (2)$$

где p – частота определяемого аллеля полиморфного локуса; $2n_{AA}$ – число животных, гомозиготных по определенному аллелю; n_{Aa} – число животных, гетерозиготных по определенному аллелю; N – общее число исследованных животных;

– количеству специфических для популяции аллелей – «приватных».

Статистическая ошибка для частоты аллеля определялась по формуле (3):

$$Mq = \pm \sqrt{\frac{q(1-q)}{2N}}, \quad (3)$$

где Mq – ошибка частоты аллеля; q – частота аллеля; N – количество животных [5].

В результате обработки данных микросателлитного анализа ДНК лошадей тракененской породы, принадлежащих ведущим хозяйствам республики, установлено, что они имеют определенный спектр аллелей и своеобразный генетический профиль, обусловленный их различными сочетаниями.

Анализ частот встречаемости генотипов в локусах микросателлитов ДНК лошадей показал, что наиболее полиморфными из них были локусы ASB17 (19 генотипических сочетаний), HMS3 (22 сочетания) и LEX3 (18). У лошадей траккененской породы в локусе АНТ4 наиболее распространенными были животные с генотипами JK, OO и JO – 0,143. Всего здесь выявлено 12 различных генотипических сочетаний.

Микросателлитный локус ASB17, как указывалось ранее, отмечен высокой полиморфностью. Здесь преобладали животные с генотипами NR (0,190), GR (0,167), а также GN (0,095).

Установлено, что в наиболее полиморфном локусе HMS3 превалировали лошади с гетерозиготным генотипом IO (0,119). Из 42 лошадей только у 6 голов выявлены гомозиготные генотипические сочетания по указанному локусу (PP, JJ и NN) с различной частотой встречаемости.

В исследуемой популяции низким уровнем генетического разнообразия характеризовались локусы микросателлитов НТG4, и НТG7 (от 5 до 7 генотипических сочетаний). 45,2 % исследуемых лошадей по локусу НТG4 имели гетерозиготный генотип KM (0,450). В локусе НТG7 чаще всего встречались лошади с генотипическими сочетаниями NO (0,286), OO (0,286) и KO (0,190).

Общее количество аллелей в изученных локусах микросателлитов ДНК лошадей траккененской породы составило 108, с колебаниями по локусам в интервале от 4 до 9 (данные представлены в таблице).

Генетическая характеристика лошадей траккененской породы отечественной селекции по 17 локусам микросателлитов ДНК

Локус	Кол-во аллелей в локусе	Общее число выявленных аллелей	Типичные аллели породы	Приватные и редкие аллели
АНТ4	11	6	H, J, K, O, P	I
АНТ5	15	6	J, K, M, N, O	I
ASB2	14–16	7	B, K, M, N, Q, R	P
ASB17	12–19	8	G, M, N, R, P, H	Q, F
ASB23	9–16	6	I, J, K, L, S, U	–
CA425	11	9	L, M, N, O	G*, J, H, I, F
HMS1	8	5	I, J, M, N	L
HMS2	13	5	K, L, M	J, N*
HMS3	14	9	I, J, M, N, O, P	Q, R, S
HMS6	14	5	M, O, P	J, K
HMS7	11	6	J, K, L, M, N, O	–
HTG4	12	4	M, K	I, P
HTG6	13	4	G, J, O, R	–
HTG7	8–10	4	K, N, O	I
HTG10	14	8	I, K, L, O, R	M, N, P
LEX3	14	8	H, L, M, N, O, P	I, K
VHL20	13	8	I, L, M, N	H, Q, P, R
Всего:	–	108	–	–

* – приватные аллели.

Исследованиями установлено, что наиболее полиморфными являлись два локуса: CA425 (9 аллелей из 11 зарегистрированных) и HMS3 (9 из 14). Низкий уровень генетического разнообразия отмечен в трех локусах – HTG4, HTG6 и HTG7 (4 аллеля).

В локусе АНТ4, насчитывающем 11 размерных вариантов, число выявленных аллелей составило 6. В указанном локусе достаточно широко распространены аллели J, O и встречались аллели H, K, P. Редким для этого локуса являлся аллель I с частотой встречаемости $0,012 \pm 0,01$.

Аллелофонд в локусе АНТ5 был представлен следующими вариантами: J, K, M, N, O, которые характерны для лошадей других верховых пород. Достаточно редким был аллель I, частота встречаемости которого составила $0,036 \pm 0,02$.

Относительно невысокий уровень генетического разнообразия (7 аллелей) был выявлен в локусе ASB2, в котором идентифицировано 16 аллелей. При этом в генотипах исследуемых лошадей сравнительно часто встречались аллели M ($0,380 \pm 0,05$), K ($0,238 \pm 0,05$), N ($0,143 \pm 0,04$) и Q ($0,131 \pm 0,04$). Выявлен «короткий» аллель B, характерный для лошадей верховых пород, с частотой $0,036 \pm 0,02$.

В локусе ASB17 у протестированных лошадей было зарегистрировано 8 аллелей. Высокой частотой встречаемости характеризовались аллели R ($0,286 \pm 0,05$), N ($0,226 \pm 0,05$), M ($0,119 \pm 0,04$) и G ($0,202 \pm 0,04$). Редкими являлись аллели Q и F ($0,012 \pm 0,01$).

Высоким уровнем полиморфности у лошадей траккененской породы характеризовался локус CA425 (9 аллелей из 11 зарегистрированных), расположенный в 28 хромосоме. Здесь обнаружен приватный аллель G с частотой встречаемости $0,023 \pm 0,023$. Наиболее характерными для данного локуса у лошадей всех исследуемых пород являются аллели I, J, K, S, L.

В локусе HMS2 также выявлен приватный аллель траккененской породы N с частотой встречаемости $0,012 \pm 0,01$.

Микросателлитный локус HMS3 у исследуемых лошадей отличался высоким уровнем генетического полиморфизма. Здесь наиболее распространенными являлись аллели I, J, M, N, O, P среди которых N и P встречались чаще ($0,202 \pm 0,04$).

В популяции лошадей траккененской породы республики локус HTG4 был представлен ограниченным числом аллелей – 4 и оказался наименее полиморфным наряду с локусами HTG6 и HTG7. В локусе HTG4 наиболее распространенным являлся аллель M ($0,524 \pm 0,05$), высокой частотой встречаемости отличался также аллель K ($0,452 \pm 0,05$);

в локусе HTG6 – аллель G ($0,369 \pm 0,05$), в локусе HTG7 – аллель O ($0,536 \pm 0,05$). Редкий аллель I ($0,012 \pm 0,01$) обнаружен в локусе HTG7. Приватных аллельных вариантов в данных локусах по результатам исследований не выявлено.

У исследуемых лошадей в локусе HTG10 был зарегистрирован относительно высокий уровень генетического разнообразия (8 из 14 зарегистрированных аллелей). Установлено, что наиболее часто встречались аллели K ($0,464 \pm 0,05$), I ($0,107 \pm 0,03$), R ($0,143 \pm 0,04$) и O ($0,107 \pm 0,03$). Редкими являлись аллели P и N ($0,012 \pm 0,01$).

Особый интерес представляет изучение полиморфности локуса LEX3, расположенного на X-хромосоме и характеризующего разнообразие популяции по материнской стороне. При тестировании в этом локусе выявлено 8 аллелей из 14 зарегистрированных. У лошадей трактененской породы были протипированы аллели H, M, N, O и P, что свидетельствует о наличии общих женских предков. Полученные данные подтверждаются в материалах ряда авторов, изучавших аллелофонд трактененской породы в России [6, 7]. Редкие аллели K, I, L также были обнаружены в исследуемой популяции, что свидетельствует о наличии общих материнских линий.

В локусе VHL20 было выявлено 8 аллелей, среди которых 4 были распространены наиболее часто – L, N, I, M ($0,095 \pm 0,03$ – $0,357 \pm 0,050$). Редкими в указанном локусе являются аллели – H ($0,12 \pm 0,01$), P ($0,024 \pm 0,02$), R ($0,036 \pm 0,02$) и Q ($0,048 \pm 0,02$).

Заключение. Проведено генотипирование лошадей трактененской породы ($n=42$), разводимых в Беларуси, методом ДНК анализов, в результате обработки данных которого установлено, что они имеют своеобразный генетический профиль, обусловленный различными генотипическими сочетаниями аллелей. Высоким уровнем полиморфизма отличались локусы микросателлитов ASB17, HMS3 и LEX3, которые насчитывали от 18 до 22 генотипических сочетаний. В наиболее полиморфных локусах преобладали животные с генотипами ASB17NR ($0,190$), HMS3IO ($0,119$) и гомозиготным генотипом LEX3OO ($0,214$).

В результате исследований установлено, что лошадям трактененской породы отечественной селекции был присущ средний уровень генетического разнообразия, в генотипах которых было протипировано 108 аллелей. Наиболее полиморфными являлись два локуса: CA425 (9 аллелей из 11 зарегистрированных) и HMS3 (9 из 14). Низкий уровень генетического разнообразия отмечен в трех локусах – HTG4, HTG6 и HTG7 (4 аллеля).

В локусах микросателлитов CA425 и HMS2 обнаружены приватные аллели G и N с различной частотой встречаемости.

Полученные в ходе проведенных исследований данные станут теоретической базой для выявления генов-кандидатов, обуславливающих хозяйственно полезные признаки лошадей верховых пород, что позволит существенно повысить результативность генотипической оценки животных и эффективность племенной работы в целом.

1. Полиморфизм ДНК лошади *Equus caballus* и методы его выявления / Р. Р. Гарафудинов [и др.] // Биомика. – 2020. – Т. 12 (2). – С. 272–299.

2. Храброва, Л. А. Стратегия использования генетических маркеров и геномной селекции в коневодстве / Л. А. Храброва. – Дивово, 2015. – 81 с.

3. Храброва, Л. А. Использование ДНК-технологий в коневодстве / Л. А. Храброва // Эффективное животноводство. – 2015. – № 6 (115). – С. 13–17.

4. Технология генотипирования лошадей по микросателлитным локусам ДНК: мет. Рекомендации / И. П. Шейко [и др.]. – Жодино, 2016. – 18 с.

5. Методы генетической сертификации лошадей по полиморфным системам крови: мет. указания / Л. А. Храброва [и др.]. – Дивово, 2010. – 70 с.

6. Храброва, Л. А. Теоретические и практические аспекты генетического мониторинга в коневодстве: автореф. дис.... д-ра с.-х. наук: 06.02.07 / Л. А. Храброва ; ВНИИК. – Дивово, 2011. – 38 с.

7. Изучение полиморфизма сателлитной ДНК лошадей заводских и местных по род / В. В. Калашников [и др.] // Доклады РАСХН. – 2010. – № 6. – С. 48–50.