

ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТІВ ДНК У КОНЯРСТВІ

О. В. Мельник, В. В. Дзіцюк, В. Г. Спиридонов, А. В. Шельов

Національний університет біоресурсів і природокористування України

У статті наведено основні напрямки використання мікросателітних маркерів у конярстві. Доведено ефективність застосування мікросателітів ДНК при підтвердженні достовірності походження, індивідуальній ідентифікації, збереженні генетичного різноманіття коней. Запропоновано подальші перспективи використання цього виду генетичного маркеру в конярстві.

Ключові слова: МІКРОСАТЕЛІТИ ДНК, ПОРОДА КОНЕЙ, ДОСТОВІРНІСТЬ ПОХОДЖЕННЯ, ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ, ПОЛІМОРФІЗМ

Використання молекулярно-генетичних технологій у конярстві є невід'ємною складовою успішної племінної роботи. З цією метою можна застосовувати різні методи, включаючи цитогенетичні, біохімічні і молекулярні. Особливої популярності набули ДНК-технології. Їх впровадження у практику українського конярства зумовлене широким використанням ДНК-типування за кордоном і необхідністю інтеграції вітчизняного конярства у світове співтовариство.

Молекулярно-генетичні маркери включають RFLP (restriction fragment length polymorphisms — поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів), RAPD (random amplified polymorphic DNA — поліморфізм випадково ампліфікованої ДНК) і мікросателіти, або SSR (simple sequence repeats). З-поміж них найбільш широко використовуються мікросателіти, оскільки вони мають високу варіабельність, кодомінантний характер успадкування, високий ступінь поліморфізму, відому локалізацію в геномі. Порівняльний аналіз міжпородної диференціації коней, проведений із використанням різних типів генетичних маркерів показав, що в усіх досліджуваних порід коней рівень поліморфізму мікросателітних локусів більш ніж у 1,5 раза вищий, ніж поліморфних систем крові [1]. У ряді країн мікросателітні маркери використовують для індивідуальної ідентифікації, вирішення проблеми сумнівного материнства чи батьківства, збереження генетичного різноманіття коней, визначення походження порід, створення селекційних програм для удосконалення існуючих і виведення нових порід.

Вперше мікросателіти коней описав Ellegren і Marklund, які ізолювали серію (CA)_n повторів і показали, що вони є високополіморфними [2]. На сьогодні відомо понад 400 мікросателітів коней, проте Комітетом з генетики коней Міжнародного товариства генетики тварин (ISAG) визначено 9 мікросателітних маркерів (AHT04, AHT05, ASB02, HMS03, HMS06, HMS07, HTG04, HTG10 та VHL20) як міжнародну мінімальну стандартну систему мікросателітних маркерів та ще 5 додаткових (ASB17, ASB23, CA425, HMS01, LEX03).

Генетична експертиза походження є обов'язковим елементом ідентифікації для племінних коней. Вона проводиться згідно з Положенням про порядок проведення генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин, затвердженим наказом Мінагрополітики України від 1 червня 2004 року № 197 (з0738-04), зареєстрованим у Мін'юсті 16 червня 2004 року за № 738/9337. Зоотехнічні родоводи коней часто містять неправдиві дані, тому тестування тварин на рівні ДНК є найточнішим методом підтвердження походження. Визначення походження за допомогою молекулярних маркерів забезпечує значно вищу ймовірність виключення випадкового збігу алелів (>90 %), ніж тестування за групами крові (70–90 %) чи іншими біохімічними маркерами (40–60 %) [3]. Мікросателіти мають простий і стабільний характер успадкування і передаються від одного

покоління до іншого. Родинний аналіз ґрунтується на кодомінантній природі мікросателітних локусів: один алель успадковується від батька, інший — від матері. Тому лоша не може мати алелі, які відсутні у його батьків. Міжнародний комітет родовідних книг (ISBC) рекомендує проводити визначення походження на виключенні збігу двох чи більше маркерів, може бути спричинене мутаційним процесом чи невизначеністю. Необхідно використати усі можливості для отримання додаткової інформації щоб прийняти рішення щодо виключення, зокрема застосування додаткових маркерів чи аналізу мутацій [4].

Численні дослідження з підтвердження достовірності походження за допомогою мікросателітів свідчать, що вірогідність ідентифікації перевищує 99,95 %, яка рекомендована ISBC для визначення достовірності походження племінних тварин [5].

Ellegren та ін. [6] вважають, що для досягнення максимального рівня виключення випадкового збігу алелів (PE) необхідно використовувати щонайменше 10 мікросателітних локусів. Marklund та ін. [7] використовували 8 мікросателітів, які забезпечили вірогідність виключення 96–99 % для різних порід. Численні дослідження із генотипування коней мікросателітами ДНК доводять, що ефективність підтвердження батьківства залежить від породи і кількості мікросателітів. Так, наприклад, використання 14 мікросателітних маркерів у дослідженнях Sun-young і Gil-jae [8] забезпечило вірогідність ідентифікації коней на рівні 99,8 %. Використання такої ж кількості мікросателітів при генотипуванні української верхової породи забезпечило показник 99,99993 %, а застосування лише 6 мікросателітних локусів дозволило ідентифікувати коней із вірогідністю 99,98 % [9].

Практично кожна порода має свою характерну генетичну структуру з наявністю певних «приватних» алелів. Визначення генетичних особливостей коней різних порід надає додаткову інформацію для вивчення їх походження, яка може бути використана в програмах зі збереження генофонду малочисельних популяцій. Результати кластерного аналізу досліджуваних порід коней демонструє дендрограма, яка вказує на генетичну дивергенцію гілок, утворених різними породами коней [10].

Висока швидкість мутацій мікросателітів і кодомінантний характер успадкування дозволяють оцінювати внутрішньо- і міжпородне генетичне різноманіття і генетичне змішування навіть близькоспоріднених порід. Генетичне різноманіття є результатом варіацій в послідовності ДНК. Його наявність дозволяє селекціонерам удосконалювати існуючі породи у відповідності до змін навколишнього середовища, у зв'язку із хворобами та потребами цивілізації. Щоб визначити видовоспецифічні стандарти Міжнародне товариство генетики тварин (ISAG) сформувало консультативну групу ISAG із збереження генетичного різноманіття тварин, яка у 2004 році була перейменована на ISAG/FAO консультативну групу генетичної різноманітності тварин. Важливою характеристикою різноманіття популяції на генетичному рівні є гетерозиготність. Дефіцит гетерозигот є наслідком збільшення гомозигот, яке може бути результатом зростання інбридингу [11]. Той, у свою чергу, може призводити до інбредних депресій та зменшення генетичної різноманітності.

ДНК-типування коней дозволяє не лише проводити генетичну ідентифікацію і контроль походження, але може використовуватися і для оцінки подібності і розбіжностей між їх геномами. Храброва Л. О. вивчала вплив рівня інбридингу, розрахованою за формулою Райта, на ступінь гомозиготності коней чистокровної верхової породи за 13 локусами мікросателітів ДНК. Отримані результати засвідчили, що рівень інбридингу, який часто використовують у селекційних програмах, характеризує лише ймовірність переходу частини геному в гомозиготний стан. Тому цей показник часто не відповідає фактичній гомозиготності тварин, яка може бути визначена за використання мікросателітів. Мікросателітні дані завдяки їх високому рівню алельної варіації широко використовують для оцінки генетичних взаємовідносин між популяціями та індивідами шляхом вимірювання генетичних відстаней. Для визначення генетичних відстаней використовують метод Nei або

Cavalli-Sforza в залежності від родинних зв'язків. Численні дослідження свідчать про використання мікросателітів для визначення генетичних відстаней між різними породами коней [13, 14]. Генетичні відносини між породами можна виявляти через побудову їх філогенетичного дерева, для чого найчастіше використовують метод найближчих сусідів.

Гетерозиготність окрім того, що є однією із основних генетично-популяційних характеристик породи, пов'язана також із репродуктивними і працездатними якостями кобил [15]. Репродуктивні якості визначали за відсотком жеребності, успішним жеребленням, діловим виходом лошат, а також частотою абортів і народженням нежиттєздатних лошат. Максимальні показники жеребності (100 %) і ділового виходу лошат (96,3 %) мали кобили, гетерозиготні за всіма 13 мікросателітними локусами. Найнижчі показники відтворення мали найбільш гомозиготні матки, жеребність яких у середньому складала всього 58,3 %. Кобили із різним ступенем гомозиготності за локусами мікросателітів ДНК незначно відрізнялися між собою за індексом успіху скакової працездатності.

Висновки

Використання молекулярно-генетичних методів є необхідною частиною успішної племінної роботи у конярстві. Широкого використання у генотипуванні коней завдяки високому рівню поліморфізму та кодомінантному характеру успадкування набули мікросателіти ДНК. Окрім традиційного їх використання для індивідуальної ідентифікації, підтвердження походження, вирішення проблеми генетичного різноманіття, дані мікросателітного аналізу можна використовувати для оцінки репродуктивних і працездатних якостей коней.

Перспективи подальших досліджень. Подальше використання мікросателітів можна спрямувати на поглиблене вивчення особливостей алелофонду зарубіжних і вітчизняних порід коней, яке може сприяти визначенню породної належності і створенню генетичних паспортів коней.

О. V. Melnyk, В. В. Дзицюк, В. Г. Спиридонов, А. В. Шельов

THE USE OF MICROSATELLITES OF DNA IN HORSEBREEDING

S u m m a r y

Basic directions of the use of microsatellite markers in horse breeding are resulted in the article. Efficiency of application of microsatellite of DNA in parentage verification, individual identification, solving problems of horses is routined. Subsequent prospects of the use of this type of genetic markers in horse breeding are defined.

О. В. Мельник, В. В. Дзицюк, В. Г. Спиридонов, А. В. Шельов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ ДНК В КОНЕВОДСТВЕ

А н н о т а ц и я

В статье приведены основные направления использования микросателлитных маркеров в коневодстве. Показана эффективность применения микросателлитов ДНК при подтверждении достоверности происхождения, индивидуальной идентификации, сохранении генетического разнообразия лошадей. Определены последующие перспективы использования этого вида генетических маркеров в коневодстве.

1. Храброва Л. А. Теоретические и практические аспекты генетического мониторинга в коневодстве : автореф. дис...докт. с.-х. наук: спец. 06.02.07 «Разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных» / Л. А. Храброва // РАСХН, ВНИИ коневодства. — Дивово, 2011. — 38 с.
2. Sun-young L. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing / L. Sun-young, C. Gil-jae // Vet. Sci. — 2006. — 7 (1). — P. 63–67.
3. Teneva A. Application of molecular markers in livestock improvement / A. Teneva, M. P. Petrović // Biotechnology in Animal Husbandry. — 2010. — Vol. 26 (3–4). — P. 135–154.
4. Binns M. M. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing / M. M. Binns, N. G. Uolmes, A. M. Holliman // Brit. Vet. J. — 1995. — Vol. 151. — P. 9–15.
5. Tozaki T. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci / T. Tozaki, H. Kakoi, S. Mashima // J. Vet. Med. Sci. — 2001. — Vol. 63. — P. 1191–1197.
6. Ellegren H. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse / H. Ellegren, M. Johansson, K. Sandberg, L. Andersson // Anim. Genet. — 1992. — Vol. 23. — P. 133–142.
7. Marklund S. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites / S. Marklund, H. Ellegren, S. Erikson, et al // Anim. Genet. — 1994. — Vol. 25. — P. 19–23.
8. Sun-young L. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing / L. Sun-young, C.-J. Gil-jae // Vet. Sci. — 2006. — 7 (1). — P. 63–67.
9. Шельов А. В. Генотипування коней української верхової породи з використанням панелі SSR-маркерів / А. В. Шельов, В. Г. Спиридонов, М. Ф. Парій, С. Д. Мельничук // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. — 2009. — Т. 7, № 2. — С. 257–261.
10. Зайцева М. А. Породоспецифические особенности аллелофонда микросателлитов ДНК лошадей заводских и местных пород : автореф. дис...канд. с.-х. наук: спец. 06.02.07 «Разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных» / М. А. Зайцева // РАСХН, ВНИИ коневодства. — Дивово, 2010. — 23 с.
11. Zolgharnein H. Genetic population structure of Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) using microsatellite analysis / H. Zolgharnein, M. A. Salari-Aliabadi, A. M. Forougmand, S. Roshani // Iranian journal of biotechnology. — 2011. — Vol. 9, No. 1. — P. 56–62.
12. Храброва Л. А. Влияние инбридинга на степень гомозиготности чистокровных верховых лошадей по локусам микросателлитов ДНК / Л. А. Храброва // Коневодство и конный спорт. — 2010. — № 5. — С. 7–8.
13. Canon J. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data / J. Canon, M. L. Checa, C. Carleos et al. // Animal genetics. — 2000. — Vol. 31. — P. 39–48.
14. Luis C. Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite loci variation / C. Luis, R. Juras, M. M. Oom, E. G. Cothran // Animal Genetics. — 2007. — Vol. 38. — P. 20–27.
15. Храброва Л. А. Влияние степени гомозиготности микросателлитных локусов на плодовитость и работоспособность кобыл чистокровной верховой породы / Л. А. Храброва, Н. В. Блохина // Коневодство и конный спорт. — 2011. — № 4. — С. 8–9.

Рецензент: провідний науковий співробітник лабораторії фізіології і патології відтворення, кандидат біологічних наук, с. н. с. Андрушко О. Б.