

LATVIJAS ŠKIRNES ZIRGU ĢENĒTISKĀ DAUDZVEIDĪBA

LATVIAN WARMBLOD HORSE GENETIC DIVERSITY STUDY

Agnese Viluma¹, Dace Smiltina², Daina Jonkus³

¹Zviedrijas Lauksaimniecības zinātņu universitāte, Zviedrija

²LLU LF Molekulārās ģenētikas pētījumu laboratorija, Latvija

³LLU LF Agrobiotehnoloģijas institūts, Latvija

¹Department of Animal Breeding and Genetics SLU, Sweden

¹LUA, Laboratory of Molecular Genetic Researches, Faculty of Agriculture, Latvia

³LUA, Faculty of Agriculture, Latvia

dace.smiltina@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this research work is to describe the genetic diversity in Latvian warmblood genetic recourse horse population by 17 microsatellite markers in order to provide background knowledge for further population structure research, parentage testing purposes and conservation decisions. As a research material blood samples from 13 genealogical lines where used. DNA extraction was performed with “Fermentas” commercial kit and QIAcube DNA extraction technology by using DNeasy Blood & Tissue reagents. DNA was amplified with StockMarks[®] Applied Biosystems commercial kit. PCR products were sent for sequencing to LVMI “Silava” laboratory and received data where analyzed by free software Genalex6. We could successfully amplify 87 horses in 17 microsatellite loci. All markers were found to be polymorphic and all except HTG10 (which significantly deviated from HW equilibrium, $p < 0.05$) were used for genetic diversity estimation. After correcting allelic richness measure for rare alleles it still showed relatively high value with 8.63 ± 0.54 alleles and together with expected heterozygosity measure of 0.78 ± 0.02 Latvian warmblood population can be considered to be among the most variable horse breeds in Europe.

KEY WORDS: Latvian Warmblood horse, genetic diversity, microsatellite markers.

IEVADS

Arvien pieaugošās tirgus prasības, konkrētu pazīmju pastiprināta selekcionēšana, kā arī mākslīgās apsēklošanas un embriju transplantēšanas tehnoloģijas veicina ne tikai sugu daudzveidības samazināšanos vienai šķirnei aizvietojojot citas, bet arī šķirņu iekšējās daudzveidības sarukšanu. Šobrīd pastāv uzskats, ka nākotnes vajadzībām, kuras mēs nevaram prognozēt, ir jāparedz pietiekoša dzīvnieku daudzveidības rezerve. Šo iemeslu dēļ Pārtikas un Lauksaimniecības organizācija (FAO) ir izvirzījusi tālejošu mērķi - saglabāt pēc iespējas lielāku bioloģisko daudzveidību, lai nodrošinātu nākotnes iespējas un saglabātu mazāk labvēlīgo reģionu ekonomisko un sociālo attīstību (Rege, Gibson, 2003).

Latvijas zirgu šķirne ar savām unikālajām īpašībām ir pasaules ģenētisko resursu bioloģiskās daudzveidības sastāvdaļa. Sākot ar 19. gs beigām M. Lažes vadībā tika veikta mērķtiecīga vietējo zirgu uzlabošana ar Oldenburgas, Hanoveras un Holšteinas vaisliniekiem un 1937. gadā Latvijas zirgu šķirni apstiprināja kā neatkarīgu populāciju, kura pateicoties savām labajām rakstura un darba īpašībām guva latviešu zemnieku ievērību (Baltakmens, Stukuls, 1978). Šobrīd par ģenētiskiem resursiem Latvijas zirgu šķirnē uzskata braucamā tipa zirgus, kuri atbilst šķirnes braucamā zirgu tipa prasībām un ir pieteikti ciltsdarbam saskaņā ar ciltsdarba programmas prasībām (Latvijas zirgu šķirnes ciltsdarba programma, 2010 – 2015).

Lai veiktu padziļinātus ģenētiskos pētījumus (piem., rezistences, iedzimto slimību,

eksterjera kļūdu un produktivitātes/darbspēju ietekmējošu mutāciju izpēti) Latvijas zirgu šķirnes populācijā sākotnēji ir nepieciešams tās ģenētiskās daudzveidības raksturojums un struktūras pētījumi. Turklāt, nekļūdīga, tālejoša un produktīva ciltsdarba veikšanai audzētāju organizācijām un turpmākiem pētījumiem ir nepieciešams ticams dzīvnieku izcelšanās informācijas ieguves avots. Populācijas ģenētiskā stāvokļa tiešai novērtēšanai ir nepieciešams šķirnes molekulārās daudzveidības apsekojums, nosakot šai šķirnei raksturīgās alēles, to frekvences un alēļu daudzveidību dažādos lokusus. Lai gan mūsdienās mikrosatelītu marķieri bieži vien tiek aizstāti ar SNP (viena nukleotīda polimorfisma) marķieriem (jo īpaši visu genomu aptverošos pētījumos), populāciju ģenētiskās daudzveidības novērtēšanā un paternitātes/identitātes noteikšanas gadījumos savas augstās daudzveidības un lēto izmaksu dēļ mikrosatelītu marķieri ir piemērotākā metode.

Šī pētnieciskā darba mērķis – ar DNS mikrosatelītu marķieru metodi izpētīt Latvijas šķirnes ģenētisko resursu programmā iekļauto zirgu (šķirnes kodola) ģenētisko daudzveidību.

Darbs tapis pateicoties projekta Eiropas Sociālā fonda (ESF) projekta “Atbalsts LLU maģistra studiju īstenošanai”, Vienošanās Nr. 2009/0165/1DP/1.1.2.1.1/09/IPIA/VIAA/008 atbalstam.

MATERIĀLS UN METODIKA

Kā darba materiāls izmantoti Latvijas šķirnes ģenētisko resursu programmā iekļauto zirgu asins paraugi, kuri iegūti bakalaura un maģistra darba izstrādes laikā, kopā 93 paraugi, kas pārstāv 13 Latvijā sastopamās šīs šķirnes ģenealoģiskās līnijas. Daļa ģenealoģisko līniju, kā Amona, Flagmaņa, Gaida, Gintera un Spēkoņa, ir plaši sastopamas un līdz ar to ievākto paraugu īpatsvars šīm līnijām ir lielāks. Savukārt Māda, Markgrāfa, Siego un Duo līnijas dzīvnieki ir sastopami retāk, tādēļ ievākto paraugu skaits ir mazāks. Banko līnija mūsdienās ir saglabājusies tikai ķēvēs un Juvēla līnija ir reti sastopama.

DNS izdalīšana veikta LLU LF Molekulārās ģenētikas pētījumu laboratorijā (MGPL) ar „Fermentas” komerciālo reaģentu komplektu un QIAcube DNS izdalīšanas iekārtu izmantojot DNeasy Blood & Tissue reaģentus. Mikrosatelītu marķieru amplificēšana no iegūtās DNS veikta ar StockMarks[®] Applied Biosystems komerciālo reaģentu komplektu, kura sastāvā ietilpst specifiski praimeru 17 mikrosatelītu lokusu amplificēšanai. Paraugi sekvenēti LVMI „Silava” laboratorijā un iegūtie dati ar genotipēto alēļu garumiem analizēti ar brīvi pieejamu programmu Genalex6 (Peakall, Smouse, 2006).

Analizējot iegūtos genotipu datus tika noteikti sekojoši ģenētiskās daudzveidības rādītāji: alēļu daudzveidība (A), efektīvais alēļu skaits lokusā (A_e), populācijas sagaidāmā (H_e) un novērotā (H_o) heterozigotāte. Lai novērtētu iegūto rezultātu atbilstību Hārdija - Veinberga (HV) vienādojumam pielietota χ^2 metode ar vienu brīvības pakāpi.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Pētījuma ietvaros tika veiksmīgi papildināts LF MGPL esošo ģenētisko resursu zirgu asins paraugu skaits, kas turpmāk būs pieejams arī citiem molekulārās ģenētikas pētījumiem. DNS iegūts no 93 zirgu asins paraugiem, bet amplificēt izdevās 87 zirgu DNS 17 mikrosatelītu lokusus. Visos 17 mikrosatelītu lokusus kopā Latvijas zirgu šķirnes ģenētisko resursu zirgu populācijā konstatētas 158 alēles. Aplūkojot visu lokusu frekvences, secinām, ka pētītie 17 mikrosatelītu marķieru lokusi Latvijas zirgu šķirnes populācijā ir polimorfi, jo nevienas alēles frekvence nevienā lokusā nepārsniedz 0.99. Ģenētisko daudzveidību raksturojošie lielumi analizētajos lokusus aprakstīti 1. tabulā.

Analizējot iegūtos genotipu datus, konstatējam vienu lokusu (HTG10) ar būtisku novirzi no Hārdija - Veinberga (HV) vienādojuma ($p < 0.05$). Pārējie 16 lokusi atbilda priekšnosacījumam par selektīvo lokusu neitralitāti un bija pielietojami turpmākiem

populācijas struktūras pētījumiem. Lokusa HTG10 novirze no HV likuma var būt izskaidrojama divējādi - ar genotipēšanas kļūdu vai arī šī lokusa ciešu saistību ar kādu no gēniem, kas ir pakļauts selekcijas procesam populācijā. Kāda konkrēta lokusa selekcija var stabilizēt alēļu frekvences visās subpopulācijās un tā rezultātā izraisīt populācijas struktūras un ģenētisko distanču nepietiekamu novērtēšanu. Vai pretēji tam, dažādu reģionu atšķirīga selekcijas spiediena rezultātā var rasties mainīga alēļu fiksācija dažādās subpopulācijās, kas, var izraisīt šo parametru pārvērtēšanu (Hedrick, 2011). Selekcijas efekti un genotipēšanas kļūdas var radīt kļūdainus analīžu rezultātus un tāpēc visi lokusi (pētījumā tikai lokuss HTG10) no rezultātu analīzes jāizslēdz.

1. tabula / Table 1

Latvijas zirgu šķirnes ģenētiskās daudzveidības raksturojums 17 mikrosatelītu lokusos
Genetic diversity measures of Latvian Warmblood horse in 17 microsatellite loci

Lokuss Locus	Alēļu daudzveidība Allelic richness	Efektīvās alēles Effective alleles	Sagaidāmā heterosigotāte Expected heterozygosity	Novērotā heterozigotāte Observed heterozygosity	χ^2
VHL20	10	4.51	0.78	0.67	0.86 ^{n.b.}
HTG4	8	3.84	0.74	0.72	0.06 ^{n.b.}
AHT4	8	4.58	0.78	0.80	0.06 ^{n.b.}
HMS7	8	5.00	0.80	0.73	0.60 ^{n.b.}
HTG6	10	4.47	0.78	0.68	1.13 ^{n.b.}
AHT5	12	7.82	0.87	0.78	0.35 ^{n.b.}
ASB2	14	6.86	0.85	0.79	0.32 ^{n.b.}
ASB23	10	3.61	0.72	0.60	1.01 ^{n.b.}
HMS6	7	4.37	0.77	0.59	3.12 ^{n.b.}
HMS2	9	6.30	0.84	0.70	2.00 ^{n.b.}
HMS3	10	4.13	0.76	0.70	0.41 ^{n.b.}
HTG7	6	2.42	0.59	0.49	1.72 ^{n.b.}
HTG10	10	1.78	0.44	0.29	5.35 ^{0.05}
ASB17	10	5.28	0.81	0.79	0.04 ^{n.b.}
CA425	12	5.87	0.83	0.70	1.11 ^{n.b.}
HMS1	6	4.54	0.78	0.67	0.95 ^{n.b.}
LEX3	8	5.05	0.80	0.62	1.75 ^{n.b.}
Vidēji* Average*	9.25 ± 0.55	4.92 ± 0.33	0.69 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.01 ^{n.b.}

* Aprēķini veikti izmantojot 16 lokusu datus (pēc HTG10 izslēgšanas)/Calculated from 16 microsatellite loci

Alēļu daudzveidība, viens no visbiežāk aprakstītajiem ģenētiskās daudzveidības mēriem (Leberg, 2002), tiek uzskatīta par svarīgu rādītāju konservējošās ģenētikas jomā (Foulley, Ollivier, 2006). Visaugstākais alēļu daudzveidības rādītājs ir AHT5, ASB2, CA425 lokusiem, pārsniedzot 10 alēles lokusā. Ar šī rādītāja palīdzību ir iespējams konstatēt populācijas samazināšanos vai pagātnē notikušas „pudeļkakla” parādības (Leberg, 2002; Foulley, Ollivier, 2006). Tiek uzskatīts, ka alēļu bagātība var daudz labāk atspoguļot populācijas ilgtermiņa potenciālu salīdzinājumā ar heterozigotātes rādītāju, jo selekcijas limiti ir vairāk atkarīgi no sākotnējās alēļu daudzveidības, nekā no heterozigotātes proporcijas (Petit et al., 1998). Kaut arī Lebergs (2002) norāda, ka gan prakse, gan teorija apliecina faktu, ka alēļu bagātības

rādītājs ir daudz jūtīgāks pret īslaicīgiem, stipri izteiktiem „pudeļkakla” notikumiem, šajā pētījumā iegūtie rezultāti par „pudeļkakla” efektu Latvijas zirgu šķirnes populācijā neliecina.

Efektīvais alēļu skaits populācijā norāda vienlīdzīgi sadalītu alēļu skaitu, kas spētu radīt sagaidāmo homozigotāti (aprēķināma pēc novērotajām alēļu frekvencēm). Rādītājs ir pielietojams kodominantu marķieru datiem un ir atkarīgs no paraugkopas lieluma (Hedrick, 2011). Tas kalpo kā papildinošs rādītājs alēļu bagātībai. Efektīvo alēļu skaits Latvijas zirgu šķirnes populācijā svārstās no 1.78 (HTG10) līdz 7.82 (AHT5) alēlēm lokusā ar vidējo vērtību 4.92 ± 0.33 alēles. Ne vienmēr augsts alēļu daudzveidības rādītājs nodrošina pietiekamu efektīvo alēļu skaitu. Piemēram, lokusa ASB23 ($A = 10$ alēles) efektīvo alēļu skaits ir mazāks (3.6 alēles) nekā lokusa HMS1 ($A = 6$ alēles) efektīvo alēļu skaits (4.5 alēles). Tāpēc izvērtējot piemērotākos lokusus populācijas struktūras izpētei un paternitātes/identitātes testiem ir nepieciešams izmantot abus rādītājus.

Sagaidāmā heterozigotāte ir varbūtība, ka konkrētajā populācijā lokusā jebkuras divas randomi izvēlētas alēles nav identiskas. Šis ģenētiskās daudzveidības mērs gan nav īpaši jūtīgs pret papildus daudzveidības esamību, jo maksimālā H_e robeža ir vienāda jebkuram alēļu skaitam (Hedrick, 2011). Šī iemesla dēļ var tikt apgrūtināta ģenētiskās daudzveidības diferenciācija starp populācijām, ja tiek izmantoti marķieri ar augstu polimorfisma līmeni kā mikrosatelīti. Šo marķieru heterozigotāte var sasniegt 0.8 vai pat augstāku vērtību (Hedrick, 2011), ko apstiprina arī mūsu pētījuma rezultāti. Vairākos lokusus (AHT5, ASB2, HMS2, ASB17, CA425) H_e pārsniedz 80% sliekšni. Latvijas zirgu šķirnes vidējais sagaidāmās heterozigotātes rādītājs ir 0.69 ± 0.02 , kas ir nedaudz mazāks nekā novērotā heterozigotāte 0.78 ± 0.02 . Visticamāk tā ir liecība heterozigotāti veicinošai pāru atlasei. Taču, pielietojot χ^2 metodi ar vienu brīvības pakāpi, netika konstatēta būtiska novirze ($p > 0.05$) no HV vienādojuma.

Pēc Luis et al. (2007) publicētajiem pasaules zirgu šķirņu (33 šķirnes) datiem, lielākais alēļu skaits starp zinātnieka pētījumā iekļautajām šķirnēm bija Kaspijas Ponijiem (7.75 ± 1.96 alēles, paraugkopā iekļauti 147 indivīdi). Pēc mūsu noteiktā Latvijas zirgu šķirnes vidējā alēļu skaita (9.25 ± 0.55 alēles) varam secināt, ka Latvijas zirgu šķirne būtu ierindojama ģenētiskās daudzveidības augšgalā. Arī pēc rādītāju korekcijas veikšanas (izslēdzot retās alēles un lokusus, kas literatūrā aprakstītajos pētījumos nav analizēti), alēļu daudzveidības rādītājs (8.63 ± 0.54) pārsniedz citu Eiropā pētīto šķirņu vidējos rādītājus, kas svārstās no 5.4 ± 0.19 līdz 6.89 ± 0.26 alēlēm (Leroy et al., 2009; Marletta et al., 2006; Juras, Cothran, 2004). Arī salīdzinot sagaidāmās heterozigotātes rādītāju Latvijas šķirnes zirgu populācija (0.78 ± 0.02) ierindojas daudzveidīgāko populāciju priekšgalā. Aplūkojot heterozigotātes rādītājus dažādu pasaules zirgu šķirņu populācijās (Luis et al., 2007; Leroy et al., 2009; Marletta et al., 2006; Juras, Cothran, 2004) augstākais aprakstītais H_e rādītājs ir 0.80 (Sicīlijas vietējā zirgu šķirne). Turklāt, tādu radniecīgu šķirņu kā Hanoveras (0.77 ± 0.02), Holšteinas (0.71 ± 0.03) arī Lietuvas braucamzirga (0.76) populācijām raksturīgi augstāki sagaidāmās heterozigotātes rādītāji, kā Latvijas zirgu šķirnei.

Kopumā, iegūtie rezultāti liecina, ka Latvijas zirgu šķirnes ģenētisko resursu populācija ir viena no daudzveidīgākajām gan alēļu bagātības ziņā, gan pēc heterozigotātes rādītājiem. Viens no iespējamajiem iemesliem ir prezentatīva paraugkopa, kas tika veidota no visām Latvijas zirgu šķirnē pastāvošajām ģeoloģiskajām līnijām un no pēc iespējas tālāk radniecīgiem indivīdiem. Turklāt jāņem vērā, ka šī šķirne ir veidota uzlabojot vietējos zirgus ar Oldenburgas, Holšteinas un Hanoveras (vēlāk arī Angļu pilnasiņu un Traķēnas) vaisliniekiem (Latvijas zirgu šķirnes ciltsdarba programm, 2010) un to, ka radniecīgu šķirņu izmantošana ciltsdarbā turpinās vēl joprojām. Ticams, ka šī iemesla dēļ mēs varam novērot augstus ģenētiskās daudzveidības rādītājus. Lai noteiktu dažādu šķirņu ietekmes īpatsvaru mūsu populācijā, būtu nepieciešams noteikt krustošanā izmantojamo šķirņu mikrosatelītu

marķieru alēles un to frekvences.

Augstai ģenētiskajai daudzveidībai ir gan pozitīvi, gan negatīvi aspekti. No daudzveidības saglabāšanas puses, populācijas lielāka gēnu daudzveidība nodrošina labākas adaptēšanās spējas mainīgiem apkārtējās vides apstākļiem, ģenētisko rezervi un daudzveidīgu selekcijas materiālu. Taču vienlaikus padara neparedzamāku selekcijas procesu un var apgrūtināt turpmākos ģenētiskos pētījumus, kuru īstenošanai būs nepieciešams lielāks dzīvnieku skaits un vairāki marķieri.

SECINĀJUMI

Visi analizētie 17 mikrosatelītu lokusi Latvijas šķirnes ģenētisko resursu populācijā ir polimorfī, taču tikai 16 marķieri ir piemēroti turpmāku aprēķinu veikšanai (HTG10 lokuss bija jāizslēdz novirzes no HV vienādojuma dēļ, $p < 0.05$).

Visaugstākais alēļu daudzveidības rādītājs konstatēts lokusiem AHT5, ASB2, CA425 (pārsniedzot 10 alēles), savukārt efektīvais alēļu skaits visaugstākais ir lokusos HMS2, ASB2, AHT5 (pārsniedzot 6 alēles).

Ar vidējo alēļu skaitu populācijā (izslēdzot retās alēles) 8.63 ± 0.54 un vidējo heterozigotātes līmeni 0.78 ± 0.02 Latvijas zirgu šķirne ir pieskaitāma pie daudzveidīgākajām Eiropā sastopamajām zirgu populācijām.

LITERATŪRA

1. Baltakmens, R., Stukuls, V. Latvijas zirgi. Rīga: Liesma, 1978; 130.
2. Foulley, J.L. and Ollivier, L. Estimating allelic richness and its diversity. - *Livestock Science*. 2006; 101: 150-158.
3. Hedrick, P. Genetics of populations. Jones and Bartlett Publishers, 2011; 675.
4. Juras, R., Cothran E.G. Microsatellites in Lithuanian native horse breeds: usefulness of parentage testing. - *Biologia*. 2004; 4: 6 – 9.
5. Latvijas zirgu šķirnes ciltsdarba programma, 2010 - 2015.
6. Leberg, P.L. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. - *Molecular Ecology*. 2002; 11: 2445 - 2449.
7. Luis, C., Juras, R., Oom, M.M. and Cothran, E.G. Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite loci variation. *Animal Genetics*. 2007; 38: 20–27.
8. Leroy, G., Callède, L., Verrier, E., Mériaux, J.C., Ricard, A., Coralie Danchin-Burge, C. and Rognon, X. Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by microsatellite polymorphism. - *Genetics Selection Evolution*. 2009; 41:31.
9. Marletta, D., Tupac-Yupanqui I., Bordonaro, S., Garcia, D., Guastella, A.M., Crisone, A., Canon, J., Dunner, S. Analysis of genetic diversity and determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers. - *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2006; 123: 315–325.
10. Peakall, R. and Smouse, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. - *Molecular Ecology Notes*. 2006; 6: 288 – 295.
11. Petit, R.J., El Mousadik, A., Pons, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. - *Conservation Biology*. 1998; 12: 844 - 855.
12. Rege, J.E.O. and Gibson, J.P. Animal genetic resources and economic development: issues in relation to economic valuation. - *Ecological Economics*. 2003; 45: 319 - 330.