

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНУ КАР 1.3 У ОВЕЦЬ АСКАНІЙСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

К.В. Скрепець, кандидат сільськогосподарських наук
ORCID: 0000-0002-8873-3801

В.Н. Іовенко, доктор сільськогосподарських наук, професор
ORCID: 0000-0002-0829-7844

Г.О. Яковчук
ORCID: 0000-0002-2141-8540

І.М. Свістула
ORCID: 0000-0002-7981-7923

*Інститут тваринництва степових районів імені М.Ф. Іванова
«Асканія-Нова» – Національний науковий селекційно-генетичний
центр з вівчарства
e-mail: ascitsr_priemnaya@ukr.net*

В.В. Дзіцюк, доктор сільськогосподарських наук, професор
ORCID: 0000-0001-9697-4165

Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН

Надійшла 29.09.2023

Мета. Встановлення особливостей генетичної структури за локусом КАР 1.3 у овець асканійської тонкорунної (АТП) та асканійської каракульської порід (АКП). **Методи.** молекулярно-генетичні та ДНК-технології. **Результати.** Досліджено генетичну структуру овець асканійської селекції різних напрямків продуктивності. У особин з тонкорунною вовною виявлено два генотипи, а у асканійської каракульської породи три генотипи (XX, XY та YY), що утворені двома алелями. Серед алелів найбільш розповсюдженим виявився КАР 1.3^X, як серед овець АТП, так і АКП (0,767 та 0,600). Альтернативний йому КАР 1.3^Y зустрічався з меншою частотою (0,233 та 0,400 відповідно).

В середньому визначено, що найбільшу частку складали особини – носії гетерозиготного генотипу КАР 1.3 XY (56,66%), але кожна досліджена популяція вирізнялась своєрідним профілем за геном КАР 1.3. Якщо в популяції асканійської тонкорунної породи розподіл визначених генотипів майже однаковий XY - 46,67% та 53,33% гомозигот XX, то в асканійській каракульській породи виявлені відмінності більш значні. Концентрація гетерозиготного генотипу XY

складає 66,66 %, а частота гомозиготи XX майже вдвічі нижче. Гомозиготний варіант KAP 1.3 YY було виявлено у популяції АКП, з частотою - 6,67 %. Встановлено, що вівці асканійської каракульської породи вирізняються високим рівнем поліморфізму, про що свідчать високий показник рівня реалізації можливої мінливості ($V=51,43$), ефективна кількість алелів ($N_a=1,92$), середня кількість генотипів на локус ($\mu=2,53$) та більша гетерозиготність ($H=0,48$). **Висновки.** Ген KAP 1.3 у популяціях овець асканійської тонкорунної та асканійської каракульської порід виявився поліморфним. У овець з тонкорунною вовною виявлено два генотипи, а у асканійської двома алелями. В обох популяціях алель KAP 1.3X зустрічається з дещо вищою частотою (0,767 в АТП та 0,600 в АКП). каракульської породи три генотипи (XX, XY та YY), що утворені у асканійської тонкорунної породи найпоширенішим виявився гомозиготний генотип KAP 1.3 XX з концентрацією 53,33%, а у асканійської каракульської породи найбільшу долю склали носії гетерозиготного генотипу XY (66,66%). При визначенні основних популяційно-генетичних параметрів двох досліджуваних порід овець виявлено, що обидві популяції за геном KAP 1.3 мають достатню гетерозиготність з невеликим фактичним надлишком гетерозиготних генотипів і загалом перебувають у стані генетичної рівноваги.

Ключові слова: вівці, QTL-локуси, молекулярно-генетичні маркери, білки кератинових волокон

DOI: 10.33694/2617-0787-2023-1-16-70-77

UDC: 636.32/38.082.12

POLYMORPHISM OF THE KAP 1.3 GENE IN SHEEP OF THE ASCANIAN BREEDING

K.V. Skrepets, Candidate of Agricultural Sciences

ORCID: 0000-0002-8873-3801

V.M. Iovenko, Doctor of Agricultural Sciences, Professor

ORCID: 0000-0002-0829-7844

G.O. Yakovchuk

ORCID: 0000-0002-2141-8540

I.M. Svistula

ORCID: 0000-0002-7981-7923

Ivanov's Institute of Animal Husbandry in Steppe Regions "Askaniya-Nova" – National Scientific Selection-Genetical Center of Sheep

Breeding

ascitsr_priemnaya@ukr.net

V.V. Dzitsyuk, Doctor of Agricultural Sciences, Professor
ORCID: 0000-0001-9697-4165
Institute of Animal Breeding and Genetics named after M. V. Zubets
NAAS

Aim. To establish the features of the genetic structure at the KAP 1.3 locus in sheep of the Ascanian fine-wool (ATP) and Ascanian Karakul breeds (AKP). **Methods.** Molecular genetic and DNA technologies. **Results.** The genetic structure of sheep of the Ascanian selection of different productivity directions was studied. In individuals with fine-wool, two genotypes were found, and in the Ascanian Karakul breed three genotypes (XX, XY and YY), formed by two alleles. Among the alleles, KAP 1.3X was the most common, both among sheep of the ATP and AKP (0.767 and 0.600). Its alternative, KAP 1.3Y, was found with a lower frequency (0.233 and 0.400, respectively).

On average, it was determined that the largest proportion was made up of individuals - carriers of the heterozygous genotype KAP 1.3 XY (56.66%), but each studied population was distinguished by a peculiar profile according to the KAP 1.3 gene. If in the population of the Ascanian fine-wool breed the distribution of the identified genotypes is almost the same XY - 46.67% and 53.33% homozygotes XX, then in the Ascanian Karakul breed, the differences were more significant. The concentration of the heterozygous genotype XY is 66.66%, and the frequency of the homozygous XX is almost half as low. The homozygous variant KAP 1.3 YY was detected in the AKP population, with a frequency of 6.67%. It was established that sheep of the Askani Karakul breed are distinguished by a high level of polymorphism, as evidenced by a high indicator of the level of realization of possible variability ($V=51.43$), effective number of alleles ($N_a=1.92$), average number of genotypes per locus ($\mu=2.53$) and higher heterozygosity ($H=0.48$). **Conclusions.** The KAP 1.3 gene in the populations of sheep of the Askani fine-wool and Askani Karakul breeds turned out to be polymorphic. Two genotypes were detected in sheep with fine-wool wool, and two alleles in the Askani breed. In both populations, the KAP 1.3X allele occurs with a slightly higher frequency (0.767 in ATP and 0.600 in AKP). Karakul breed has three genotypes (XX, XY and YY), which are formed in the Ascanian fine-wool breed, the most common was the homozygous KAP 1.3 XX genotype with a concentration of 53.33%, and in the Ascanian Karakul breed, the largest proportion was made up of carriers of the heterozygous XY genotype (66.66%). When determining the main population-genetic parameters of the two studied sheep breeds, it was found that both

populations for the KAP 1.3 gene have sufficient heterozygosity with a small actual excess of heterozygous genotypes and are generally in a state of genetic equilibrium.

Keywords: *sheep, QTL loci, molecular genetic markers, keratin fiber proteins*

DOI: 10.33694/2617-0787-2023-1-16-70-77

Постановка проблеми.

Сучасні ДНК-технології дозволяють вивчати генетичну різноманітність тварин і виділяти гени, що несуть комплекс бажаних для селекції ознак.

Вовнова продуктивність овець більшості порід залежить від багатьох факторів, основними з яких є як породна так і індивідуальні особливості, умови годівлі та пристосованості тварин до умов їх утримання та розведення. Величина настригу вовни є одним з основних критеріїв при оцінці продуктивності напівтонкорунних і тонкорунних овець.

Розподіл частот зустрічальності алелів і генотипів надає можливість проведення досліджень взаємозв'язку поліморфних варіантів гена з показниками вовнової продуктивності тварин.

Аналіз останніх досліджень і публікацій.

Отримання вовни високої якості є основним завданням вівчарства, а також важливим параметром при оцінці тонкорунних і м'ясо-вовнових порід овець. Якість вовни вимірюється комплексом показників, таких як тонина, міцність, довжина, звивистість та ін. Зарубіжні вчені, проводячи безліч досліджень на біохімічні властивості вовняного волокна, відзначили що гени сімейства кератинів, найбільш ймовірно впливають на якість вовни. Виразність цих властивостей визначається білками, що формують вовнове волокно [1-5]. Серед цих білків виділяють білки кератинових волокон. Їх можна розділити на дві групи: білки кератинового проміжного філамента (KRT - keratins або KIF - keratin intermediate filaments) та білки, що пов'язані з кератином (KAP) [6-8]. KRTs грають ключову роль в основних структурах волокон вовни (мікрофібрил) і вбудовані в матрикс KAPs.

Дослідження поліморфізму генів кількісних ознак, пов'язаних з продуктивністю, і на їх основі вивчення генетичної структури популяцій овець різного походження, з метою визначення впливу цих генів на продуктивність, є вкрай актуальними.

Матеріал і методи досліджень.

Дослідження проводили на вівцях асканійської селекції: асканійської тонкорунної (АТП) та асканійської каракульської (АКП) порід, які утримувалися у ДПДГ «Асканія-Нова» Херсонської області.

Виділення геномної ДНК проводилося з клітин крові з використанням комплекту реагентів для екстракції ДНК „ДНК-Сорб-Б” за стандартною методикою, згідно рекомендацій виробника. Полімеразно-ланцюгову реакцію здійснювали з використанням програмованого ампліфікатора Libe Line 212.

Для ампліфікації фрагмента гена KAP 1.3 використовували праймери:

F: 5'- GGG TGG AAC AAG CAG ACC AAA CTC-3'

R: 5'- TAG TTT GTT GGG ACT GTA CAC TGG C -3' [7].

Температурний режим ампліфікації гена KAP 1.3:

початкова денатурація – 5 хв. при 95°C;

40 циклів: денатурація – 60 с при 95 °C;

відпал праймерів – 60 с при 65 °C;

синтез – 60 с при 72 °C;

термінальна елонгація – 7 хв. при 72 °C.

Продукт ампліфікації гену KAP 1.3 – фрагмент довжиною 598 п.н. Для рестрикції гена KAP 1.3 використовувалася рестриктаза *BseI* I (*Bsr* I) (CCNNNNN/NGG) [7, 9].

Для розділення продуктів ампліфікації проводили горизонтальний електрофорез у 2,5% агарозному гелі. Візуалізацію отриманих результатів здійснювали за допомогою трансілюмінатора в УФ світлі з довжиною хвилі 312 nm та подальшим документуванням електрофореграм цифровою фотокамерою. Диференціацію ампліконів за розмірами проводили за допомогою маркера молекулярних мас pUC19/MspI.

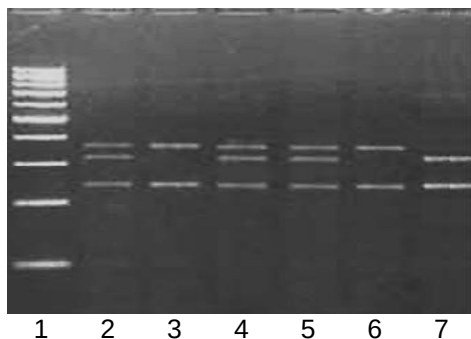
Результати досліджень. Поліморфізм гена KAP 1.3 у овець асканійської селекції раніше не вивчався. Основною метою нашої наукової роботи було встановлення особливостей генетичної структури за цим локусом у овець асканійської тонкорунної породи (АТП) та асканійської каракульської породи (АКП).

Методом ПЛР-ПДРФ аналізу досліджено генетичну структуру овець асканійської селекції різних напрямків продуктивності (табл. 1 та рис. 1).

Тварини з генотипом XX мають два сайти рестрикції, тому в результаті на фореграмі виявляють три рестрикційні фрагменти довжиною 350 п.н., 225 п.н. та 23 п.н.. Для генотипу XY характерна присутність чотирьох сайтів рестрикції, що призводить до формування п'яти фрагментів довжиною 350 п.н., 307 п.н., 225 п.н.,

43 п.н. та 23 п.н., а генотип YY має три сайти рестрикції та чотири ділянки довжиною 307 п.н., 225 п.н., 43 п.н. та 23 п.н. [7].

За результатами ПЛР ПДРФ аналізу встановлено, що у овець досліджених популяцій ген КАР 1.3 є поліморфним. У особин з тонкорунною вовною виявлено два генотипи, а у асканійської каракульської породи три генотипи (XX, XY та YY), що утворені двома алелями. (табл. 1).



Доріжки: 1 – ДНК-маркер 100 bp (Fermentas); 2, 4, 5 – генотип XY (350 п.н., 307 п.н., 225 п.н., 43 п.н., 23 п.н.); 3, 6 – генотип XX (350 п.н., 225 п.н., 23 п.н.); 7 – генотип YY (307 п.н., 225 п.н., 43 п.н., 23 п.н.)

Рис. 1. Електрофореграма розділення продуктів рестрикції генуКАР 1.3 (Bsell) у 2,5 % агарозному гелі

Таблиця 1. Генетична структура овець асканійської тонкорунної та асканійської каракульської порід за частотою алелів і генотипів гену КАР 1.3

Порода	Генотип						Алель	
	XX		XY		YY		X	Y
	n	%	n	%	n	%		
АТП (n=15)	8	53,33	7	46,67	-	-	0,767	0,233
АКП (n=15)	4	26,67	10	66,66	1	6,67	0,600	0,400

Серед алелів найбільш розповсюдженим виявився КАР 1.3^X, як серед овець АТП, так і АКП (0,767 та 0,600). Альтернативний йому КАР 1.3^Y зустрічався з меншою частотою (0,233 та 0,400 відповідно).

В середньому визначено, що серед тварин досліджених порід найбільшу частку складали особини – носії гетерозиготного генотипу КАР 1.3 XY (56,66%), але кожна досліджена популяція вирізнялась своєрідним профілем за дослідженим геном КАР 1.3. Якщо в стаді асканійської тонкорунної породи розподіл визначених генотипів майже однаковий XY - 46,67 % та 53,33% гомозигот XX, то в

асканійській каракульській породі виявлені відмінності більш значні. Концентрація гетерозиготного генотипу ХУ складає 66,66 %, а частота гомозиготи ХХ майже вдвічі нижче. Гомозиготний варіант КАР 1.3 YY було виявлено у популяції АКП, з частотою - 6,67 %.

Більш точну уяву про особливості структури популяцій за генетичними маркерами дає комплексне вивчення із застосуванням декількох методів, кожен з яких має свою специфіку у з'ясуванні генетичної мінливості популяції. Результати комплексної оцінки генетичних структур досліджених груп за локусом КАР 1.3 представлені у таблиці 2.

Таблиця 2. Параметри генетичної структури досліджених порід овець за геном КАР 1.3

Порода	H	V	Na	μ	h_{μ}	χ^2
АТП	0,36	38,33	1,56	2,00	0,00	1,35
АКП	0,48	51,43	1,92	2,53	0,16	2,27

При проведенні популяційного аналізу було встановлено, що вівці асканійської каракульської породи вирізняються високим рівнем поліморфізму, про що свідчать високий показник рівня реалізації можливої мінливості ($V=51,43$), ефективна кількість алелів ($Na=1,92$), середня кількість генотипів на локус ($\mu=2,53$) та більша гетерозиготність ($H=0,48$). За середньою кількістю генотипів на локус вівці асканійської тонкорунної породи вирізняються нижчим значенням ($\mu=2,00$).

При порівнянні фактичного розподілу генотипів з теоретично очікуваним, у відповідності з законом Харді-Вайнберга в досліджених популяціях не виявлено вірогідних відхилень частот прояву різних генотипів за локусом КАР 1.3, про що свідчать низькі значення χ^2 , тобто вони знаходяться у стані генної рівноваги.

Розподіл частот зустрічальності алелів і генотипів надає можливість проведення досліджень взаємозв'язку поліморфних варіантів гена з показниками вівчової продуктивності тварин.

ВИСНОВКИ

1. Ген КАР 1.3 у популяціях овець асканійської тонкорунної та асканійської каракульської порід виявився поліморфним. У овець з тонкорунною вовною виявлено два генотипи, а у асканійської каракульської породи три генотипи (ХХ, ХУ та YY), що утворені двома алелями.

2. В обох досліджених популяціях алель КАР 1.3^x зустрічається з дещо вищою частотою (0,767 в АТП та 0,600 в АКП). У асканійської тонкорунної породи найпоширенішим виявився гомозиготний

генотип KAP 1.3 XX з концентрацією 53,33%, а у асканійської каракульської породи найбільшу долю склали носії гетерозиготного генотипу XY (66,66%).

3. При визначенні основних популяційно-генетичних параметрів двох досліджуваних порід овець виявлено, що обидві популяції за геном KAP 1.3 мають достатню гетерозиготність з невеликим фактичним надлишком гетерозиготних генотипів і загалом перебувають у стані генетичної рівноваги.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gong H. et al. Wool keratin-associated protein genes in sheep- A Review // *Genes*. – 2016. – 7 (6). <https://doi.org/10.3390/genes7060024>
2. Ibrahim M.F., Hassan R.D., Ahmed M.D., Haidan M. El-Shorbagy and Ramadan Wael A. Effect of Genetic Polymorphisms of the KAP1.1 and KAP1.3 Genes on Wool Characteristics in Egyptian Sheep // *Journal of Biological Sciences*. – 2018. – 18 (4). – P. 158-164.
3. Itege-Mweza T.O., Forrest R.H., McKenzie G.W., Hogan A., Abbott J., Amofo O., Hickford J.G.H. Polymorphism of the KAP1.1, KAP1.3 and K33 genes in Merino sheep // *Mol. Cell. Probs*. – 2007. – 21. – P. 338-342.
4. Itege-Mweza T.O. Identify cation of genetic markers associated with wool quality traits in merino sheep. Ph.D. Thesis, Lincoln University, Christchurch, New Zealand, 2007.
5. Jin M, Wang L, Li S, Xing MX, et al. (2011). Characterization and expression analysis of KAP7.1, KAP8.2 gene in Liaoning new-breeding cashmere goat hair follicle. *Mol. Biol. Rep.* 38: 3023-3028.
6. Kuczek ES, Rogers GE. Sheep wool (glycine + tyrosine)-rich keratin genes. A family of low sequence homology // *Eur. J. Biochem.* 1987. 166: 79-85.
7. Kumar R., Meena A.S., Kumari R., Jyotsana B., Prince L.L., Kumar S. Polymorphism of KRT1.2 and KAP1.3 genes in Indian sheep breeds // *Indian Journal of Small Ruminants*. – 2016. – 22 (1). – P. 28-31.
8. Marshall R. Orwin D, Gillespie J. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin // *Electron. Microsc. 1991. Rev.* 4: 47-83.
9. Mahajan V, Das A, Taggar R, et al. (2017). Association of polymorphic variants of KAP 1.3 gene with wool traits in Rambouillet sheep // *Indian Journal of Animal Sciences*. – 2017. – 87 (10). – P.1237-1242.