



ТЭС ОМГИЙН АДУУНЫ МИТОХОНДРИЙН ДНХ-ИЙН СУДАЛГАА

Б.Болор-Оюут^{1*}, Б.Очирхуяг², Ж.Хулан²

¹Ерөнхий болон Сорилын Биологийн Хүрээлэн, ШУА, Улаанбаатар, Монгол Улс

²Байгалийн Ухааны Салбар, Шинжлэх ухааны сургууль, МУИС, Улаанбаатар, Монгол Улс

*Холбоо барих хаяг: boloroyut@yahoo.com

ХУРААНГУЙ

Популяцийн генетик олон янз байдлын судалгаа нь амьтдын үүлдэр, генетик нөөцийг хадгалах, нөхөн сэргээхэд чухал шаардлагатай судалгааны чиглэл юм. Митохондрийн ДНХ-ийн хяналтын хэсэг нь мутацийн хэмжээ их, рекомбинаци бага явагддаг мөн эхийн талын холбоо хамаарлыг харуулдагаараа эволюци болон филогенетикийн судалгаанд өргөн ашиглагддаг. Бид Завхан аймгийн Тэс омгийн адууны генетикийн олон янз байдал, эхийн талын гарал үүслийн холбоог тодорхойлох зорилгоор 10 цусны дээж цуглуулж ашиглав. Бидний судалгаагаар 8 гаплотип тодорхойлогдсон ба полиморф сайтын тоо 44 байв. Нуклеотидийн олон янз байдал 0.0224 байсан бол гаплотипийн олон янз байдал нь 0.9333 байлаа. Судалгаагаар илэрсэн 8 гаплотипээс 4 (A, C, F, I) гаплогрупп тодорхойлогдов.

ТҮЛХҮҮР ҮГС: Тэс адуу, Д-гогцоо, хяналтын хэсэг, адууны гаплотип

ОРШИЛ

Монгол адуу нь нүүдлийн мал аж ахуйн нөхцөлд уналга эдэлгээнд ашиглахад тохирсон, монгол орны эрс тэс уур амьсгалд сайн зохицсон, ихээхэн тэсвэр хатуужилтай, харьцангуй жижгэвтэр биетэй байдаг. Өнөөдрийн байдлаар генетикийн олон янз байдал болон гарал үүслийн судалгаа нь дутмаг байгаа билээ. Адууны митохондрийн ДНХ-ийн (мтДНХ) хэсэг нь ойролцоогоор 16600 хос нуклеотид хэмжээтэй 37 генийг агуулсан ба Д-гогцоо хэмээн нэрлэгдэх үл кодлох хэсэг нь 1192 хос нуклеотидоос тогтоно [1, 2, 3]. Д-гогцоо нь 2 хэт хувьсамтгай хэсэг (HV1, HV2 хэсэг), 4 хадгалагдсан дарааллын блок (conserved sequence block) болон TGTGCACC гэсэн 8 хос нуклеотид хэмжээтэй тандем дарааллыг агуулна [4]. Ishida болон бусад судлаачид Адууны (Equus) төрлийн

амьтдын филогенетикийн холбоо хамаарлыг судлах зорилгоор адууны мтДНХ-ийн бүтэн дарааллыг олшруулан хэт хувьсамтгай хэсгийг тогтоожээ. Тэд зөөврийн РНХ-ийн хоёр талд байрлах пролин нийлэгжүүлэгч хэсэг болон хадгалагдсан дарааллын блокын төв (central conserved sequence block) хэсгийн хооронд орших хэт хувьсамтгай нэгдүгээр хэсэг нь нийт митохондрийн ДНХ-ийн хувьд хамгийн их мутацийг агуулсан хэсэг болохыг тогтоосон [5]. Бид энэхүү судалгааны ажлаар Тэс омгийн адууны генетик олон янз байдлыг тодорхойлох зорилгоор мтДНХ-ийн Д-гогцооны хэсгийн хэт хувьсамтгай 1-р хэсгийн дарааллыг олшруулан гаплотипийг тодорхойлж уг үр дүнд үндэслэн гаплогруппийг илрүүлэв.

СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН, АРГА ЗҮЙ

Цусны дээжийг цуглуулах болон ДНХ ялгах
Адууны цусны дээжийг Завхан аймгийн Баянхайрхан сумаас EDTA бүхий хуруу шилэнд цуглуулж 4°C-д хадгалсан. Нийт 10 цусны дээжнээс геномын ДНХ-ийг СТАВ агуулсан задлагч буфер (СТАВ (10%), 5M NaCl, 0.5M EDTA (pH=8.0), 1M Tris-HCl (pH=8.0), β-mercaptoethanol) ашиглан фенол-хлороформын аргаар ялгасан.

ПГУ явуулах болон дарааллыг тодорхойлох
ПГУ- д адууны митохондрийн ДНХ-ийн Д-гогцооны хяналтын 1162 х.н хэсэгт зохиогдсон AjasF- 5' CGA CAA CAA TTC ACC CTC AT 3' ,

AjasR 5'GAA GAA GGG TTG ACA GAT TTA 3' дараалалтай [6] хос праймерийг ашиглав. Урвалын холимгийг APEX Taq master mix-ийг ашиглан үйлдвэрлэгчийн протоколын дагуу хийж гүйцэтгэсэн. ПГУ-ыг (Thermo scientific™, Arktik Thermal cycler) 94°C-д 3 минут; 94°C-д 30 секунд ; 55°C-д 30 секунд; 72°C-д 90 секунд 35 удаа давтан; 72°C-д 10 минутын горимоор тохируулан явуулав. Урвалын бүтээгдэхүүнийг (агароз гел) электрофорезийн арга зүйг ашиглан тодорхойлсон. Нуклеотидийн дарааллыг Солонгос улсын Macrogen Биотехнологийн компанид тогтоолгов.

Статистикийн анализ хийх болон гаплогрупп тодорхойлох Тэс омгийн адууны мтДНХ-ийн Д-гогцооны дарааллыг тодорхойлж MEGA v.6 программыг ашиглан нуклеотидийн дарааллыг харьцуулсан. Гаплотипийн олон янз байдал,

нуклеотидийн олон янз байдал, полиморф сайт, гаплотипийн тоо зэргийг тооцоходоо DNaSP v.5.10 программ [7] болон Arlequin v3.1 [8] програмуудыг тус тус ашиглав.

Хүснэгт 1

Филогенетикийн мод байгуулахад ашигласан адууны гаплотипийн Генбанкны бүртгэлийн дугаар

Гаплогрупп	Тоо	Генбанкинд бүртгэгдсэн дугаар
A	3	AB329587, AB329588, AB329592
C	3	AB329604, AB329604, AB329608
F	2	AF014415, AF056071

Гаплогруппийг тогтооходоо филогенетикийн сүлжээний (phylogenetic median-joining network) загварыг ашигласан [9]. Судалгаагаар илэрсэн гаплотипүүдийг Генбанкинд бүртгэгдсэн адууны

ижил гаплотипүүдтэй (Хүснэгт 1) харьцуулан филогенетикийн модыг Neighbor-joining арга зүйг ашиглаж MEGA v.6 программ дээр Bootstrap утгыг 1000 репликациар тооцон байгуулсан.

СУДАЛГААНЫ ДҮН

Тэс омгийн адууны мтДНХ-ийн Д-гогцооны генетик олон янз байдал. Тэс адууны митохондрийн ДНХ-ийн Д-гогцооны 1162 хн хэсгийг ПГУ-ын аргаар олшруулан нуклеотидийн дарааллыг тогтоосноос харьцуулалт хийж, 743х.н бүтээгдэхүүнийг цаашдын судалгаанд ашиглав. Митохондрийн ДНХ-ийн 743 х.н дараалал дахь азотлог сууриудын агууламжийг тооцоход С: 28.92%, Т: 27.30%, А: 25.23%, G:18.55 гэсэн харьцаатай

байлаа. Сээр нуруутны митохондрийн ДНХ-ийн азотлог сууриудын агууламж нь голдуу А>С>Т>G гэсэн бүтэцтэй байдаг бол [10,15] , бидний судалгаанд С болон Т илүү хэмжээтэйгээр илэрлээ. Нийт 8 гаплотип тодорхойлогдсон ба хувьсамтгай сайтын тоо 44 байлаа. Харьцуулалт хийсэн 743 х.н нуклеотидийн дарааллыг Генбанкинд бүртгүүлж бүртгэлийн дугаар авсан (хүснэгт 2).

Хүснэгт 2

Гаплотипийг тодорхойлсон үр дүн болон генбанкны бүртгэлийн дугаар

Омог	Дээжний дугаар	Гаплотип	NCBI Ген банкны бүртгэлийн дугаар
Тэс	T1	H9	MN004393
	T2	H10	MN004394
	T3	H11	MN004395
	T4	H12	MN004396
	T5	H13	MN004397
	T28	H14	MN004398
	T31	H14	MN004399
	T33	H15	MN004400
	T34	H14	MN004401
	T35	H16	MN004402

Тэс адуунд нийтлэг гаплотип 1 (Н6), давтагдашгүй гаплотип 7 илэрсэн ба нийтлэг илэрсэн Н6 гаплотипэд Т28, Т31, Т34 дээжүүд хамаарагдаж байв. Мөн Н6, Н8 зэрэг гаплотипд харьяалагдах дээжнүүдийн мтДНХ-ийн 16064

нуклеотидийн байрлалд нэг инсерц илрэв. Энэ азотлог суурь нь Монгол адуунд үүссэн шинэ төрлийн мутаци байх боломжтой. Хувьсамтгай нуклеотидийн сайт болон гаплотипийг тодорхойлсон үр дүнг Зураг 1-т харуулав.

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦҮҮЛЭХҮЙ

Achilli болон бусад судлаачид адууны 18 гаплогруппийг тогтоосон ба олон улсын судлаачид адууны генетик олон янз байдлын судалгаанд тэдний арга зүйг ашиглах нь түгээмэл байгаа билээ. Мөн эдгээр судлаачид Пржевальскийн адууны 17 дараалалд гаплогруппийг тодорхойлоход 14 дараалалд F гаплогрупп илэрч байв. Бид мөн Achilli болон бусад [12] судлаачдын тодорхойлсон нуклеотидийн солигдолтын хамгийн парсимониум модыг ашиглан Тэс адууны гаплогруппийг тодорхойлоход H1-H8 гэсэн 8 гаплогруппоос A, C, I, F гэсэн 4 гаплогрупп тодорхойлогдлоо. Dawei Cai болон бусад судлаачид Хятад нутгийн эртний адууны гаплогруппийг Jansen ба бусад судлаачдын филогенетикийн загварыг ашиглан тодорхойлоход нийт 7 гаплогрупп тодорхойлогдсон ба нийтлэг илэрсэн нь A болон F гаплогруппүүд байлаа. Эдгээр эрдэмтэд 17 ялгаатай популяцийн 1053 адуунд өөрсдийн илрүүлсэн 7 гаплогруппийн тархалтыг тодорхойлоход F гаплогрупп нь Зүүн Евразид зүүн хэсгээс баруунруу тархалт нь буурах хандлагатай байсанд үндэслэн зөвхөн Зүүн Евразид болон Пржевальскийн адуунд байх эртний гаралтай гаплогрупп мөн хэмээн таамагласан байна [13]. Мөн Achilli болон бусад судлаачид адууны гаплогруппийг тодорхойлоход Азид A болон C гаплогрупп, Европд I гаплогрупп

ДҮГНЭЛТ

Генетик олон янз байдал их байгаа нь популяцийн тоо толгой өндөр, мөн адууг сайжруулахын тулд эрлийзжүүлэг хийдгээс хамаарч Европийн Хойд хэсэгт илэрдэг I гаплогрупп илэрсэн байх магадлалтай.

Тэс адуунд 4 гаплогрупп илэрсэнээс зөвхөн Зүүн Азид илэрдэг F гаплогрупп нь хамгийн өндөр

харин F гаплогрупп нь Пржевальскийн адуунд илэрч байсан хэмээн тодорхойлжээ. Манай судалгаагаар A (37.5%) болон F (25%) гаплогрупп илэрсэн. Адууны митохондрийн ДНХ-ийн D-гогцооны хэсэгт нийт 44 нуклеотидийн солигдол илэрсэнээс транзиц мутаци 43, инсерц 1 илэрлээ. Үүнээс үзэхэд бусад судлаачдын судалж тогтоосны дагуу хөхтний митохондрийн эволюцид транзиц мутаци нийтлэг илэрдэг [14] гэдгийг дахин батлан харуулж байна. 537 дахь нуклеотидийн байрлалд илэрсэн инсерц нь зөвхөн Монгол адуунд өвөрмөц байх боломжтой. Hironaga Kakoi болон бусад судлаачид Япон адууны митохондрийн ДНХ-н дарааллын генетик олон янз байдлыг үнэлэхдээ Монгол болон Европ адууны хадгалагдсан дараалалтай харьцуулжээ. Уг судалгаанд Монгол болон Европ адууны гаплогруппийн олон янз байдал 0.50-0.96, генетик олон янз байдал 0.014–0.021 гэж тооцжээ [11]. Харин манай судалгаагаар Тэс омгийн адууны генетик олон янз байдал 0.0224, гаплогрупп олон янз байдал 0.9333 байсан нь уг судалгааны дүнтэй тохирч байгаа юм. Мөн уг судалгаанд Монгол адуунд A,C,D гэсэн 3 гаплогрупп илэрч байгааг тодорхойлжээ. Эдгээрээс A гаплогрупп нь манай судалгааны H1, H4, H5 гаплогруппүүдэд, C гаплогрупп нь H2, H3 гаплогруппүүдэд D гаплогрупп нь H6, H8 гаплогруппүүдэд илэрсэн.

давтамжтай илэрсэн ба энэ гаплогрупп нь Пржевальскийн адуунд түгээмэл байдаг. Энэ нь Монгол орчин үеийн адуу болон Пржевальскийн адууны холбоо хамаарлын талаар нэмэлт судалгаа хийх боломжтойг харуулж байна.

НОМ ЗҮЙ

1. Wolstenholme, D. R. 1992. Genetic novelties in mitochondrial genomes of multicellular animals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:918-925.
2. Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27:1767-1780.
3. Bowling, A. T., A. Del Valle and M. Bowling. 2000. A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. *Anim. Genet.* 31:1-7.
4. Ishida N., Hasegawa T., Takeda K., Sakagami M., Onishi A., Inumaru S., Komatsu M., Mukoyama H. 1994. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Anim Genet* 25:215-221.
5. Ishida, N., T. Oyunsuren, S. Mashima, H. Mukoyama and N. Saitou. 1995. Mitochondrial DNA sequences of various species of the Genus *Equus* with special reference to the phylogenetic relationship between *Przewalskii's* wild horse and domestic horse. *J. Mol. Evol.* 41:180-188.
6. Tao Zhang ., Hongzhao Lu., Chen Chen ., Hai Jiang., Sanqiao Wu. 2012. Genetic Diversity of mtDNA D-loop and Maternal Origin of Three

- Chinese Native Horse Breeds. Anim. Sci. Vol. 25, No. 7: 921-926.
7. Rozas, J., J. C. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
 8. Laurent Excoffier, Guillaume Laval, Stefan Schneider. 2006. Arlequin ver3.1 An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>
 9. Jansen, T., P. Forster, M. A. Levine, H. Oelke, M. Hurles, C. Renfrew, J. Weber and K. Olek. 2002. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:10905-10910.
 10. Asakawa, S., Y. Kumazawa, T. Araki, H. Himeno, K. Miura and K. Watanabe. 1991. Strand-specific nucleotide composition bias in echinoderm and vertebrate mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* 32:511-20.
 11. Hironaga Kakoi., Teruaki Tozaki., Hitoshi Gawahara. 2007. Molecular analysis using Mitochondrial DNA and Microsatellites to infer the formation process of Japanese native horse populations. *Biochemical Genetics*, Vol. 45, Nos. 3/4, DOI: 10.1007/s10528-007-9083-0.
 12. Achilli, A., A. Olivieri, P. Soares, H. Lancioni, B. Hooshiar Kashani, U. A. Perego, S. G. Nergadze, V. Carossa, M. Santagostino, S. Capomaccio, M. Felicetti, W. Al-Achkar, M. C. Penedo, A. Verini-Supplizi, M. Houshmand, S. R. Woodward, O. Semino, M. Silvestrelli, E. Giullotto, L. Pereira, H. J. Bandelt and A. Torroni. 2012. Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:2449-2454.
 13. Dawei Cai., Zhuowei Tang., Lu Han., Camilla F. Speller., Dongya Y. Yang., Xiaolin Ma., Jian'en Cao., Hong Zhu., Hui Zhou. 2009. Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse. *Journal of Archaeological Science* 36 (2009) 835-842.
 14. Kim, K. I., Y. H. Yang, S. S. Lee, C. Park, R. Ma, J. L. Bouzat and H. A. Lewin. 1999. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Anim. Genet.* 30:102-108.
 15. Ji, X., X. Wu, P. Yan and G. Amato. 2008. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of Siamensis Crocodile (*Crocodylus siamensis*). *Mol. Biol. Rep.* 35:133-138.

MITOCHONDRIAL DNA STUDY OF MONGOLIAN HORSES

B. Bolor-Oyut^{1*}, B. Ochirkhuyag², Khulan J²

¹Institute of General and Experimental Biology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

²Department of Biology, School of Arts and Sciences, National University of Mongolia, Ulaanbaatar

*Corresponding author: boloroyut@yahoo.com

ABSTRACT

Studies of population genetic diversity is important research field in conservation and restoration of animal breeds and genetic resources. The control region of mitochondrial DNA is widely used for population and evolutionary studies because of its 'maternal inheritance and high level of sequence variation as well as its' much less recombination rate. To determine genetic diversity and maternal inheritance, we collected 10 blood samples of Tes horses from Zavkhan, Mongolia. In this study, 8 haplotypes and 44 polymorphic sites were detected. Haplotype diversity was 0.9333 and nucleotide diversity was 0.0224. 4 haplogroups (A, C, F, I) were identified among 8 haplotypes.

KEYWORDS: Tes horses, D-loops, control panels, horse haplotype