УДК 575.082.13:636.1.001.32

ГЕНОТИПУВАННЯ КОНЕЙ УКРАЇНСЬКОЇ ВЕРХОВОЇ ПОРОДИ З ВИКОРИСТАННЯМ ПАНЕЛІ SSR-МАРКЕРІВ

А.В. ШЕЛЬОВ, В.Г. СПИРИДОНОВ, М.Ф.ПАРІЙ, С.Д. МЕЛЬНИЧУК

Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК,
Україна, 08162, Києво-Святошинський р-н, смт Чабани, вул. Машинобудівників, 7
e-mail: receptions@quality.ua

У роботі на основі аналізу 40 голів Української верхової породи коней з використанням панелі 14 SSR-маркерів показано можливість генотипування тварин із високим ступенем достовірності. Всі використані локуси показали високий рівень поліморфізму, кількість ідентифікованих алелей коливалась від 5 до 12 з індексом поліморфізму (PIC) від 0,482 – до 0,879. На основі проведеного дослідження визначено випадковий збіг алелей (CPE), який становить 99,999 %. Отримані дані свідчать про те, що для генетичного аналізу коней УВП найінформативнішими є 6 маркерів: ASB23, HTG06, HTG10, VHL20, HMS07 та ASB17. Панель із 6 наведених маркерів достатня для ідентифікації тварин досліджуваної породи, у відповідності із вимогами ISBC.

Ключові слова: українська верхова порода коней, SSR-маркери, генотипування, визначення достовірності походження.

Вступ. Відкриття поліморфізму коротких тандемних повторів ДНК (мікросателітів) та використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) сприяло розробці універсального інструменту для індивідуальної ідентифікації та встановлення достовірності походження у людей та тварин [1, 2]. Мікросателіти мають простий та стабільний механізм успадкування, який простежується від однієї генерації до іншої, тому їх застосовують для встановлення походження за різними напрямками родинних відносин. Для коней виявлено велику кількість мікросателітних маркерів, але не всі вони є однаково інформативними для різних популяцій та порід коней, саме тому комітетом з генетики коней міжнародного товариства генетики тварин (ISAG) було виділено 9 ДНК-маркерів (AHT04, AHT05, ASB02, HMS03, HMS06, HMS07, HTG04, HTG10 та VHL20) як міжнародну стандартну панель мікросателітних маркерів [3–6]. За рекомендацією комітету визначення достовірності походження коней повинно спиратись на виключення збігу двох або більше маркерів, оскільки виключення збігу лише за одним маркером може бути спричинене невизначеністю або мутаційним процесом [7].

Чисельність коней УВП в Україні становить близько 2779 голів, в тому числі: жеребці-плідники – 90 голів, конематки – 1248, молодняк різного віку – 1129 та коні в спорті – 312 голів. Коні УВП відрізняються породністю, яскравим екстер'єром, добронравністю, слухняністю, високою витривалістю та невибагливістю щодо умов утримання. Українську верхову породу коней (УВП) виведено методом складного відтворного схрещування місцевих та запряжних коней із західноєвропейськими кіньми тракенської, гановерської, угорської та чи-

© А.В. ШЕЛЬОВ, В.Г. СПИРИДОНОВ, М.Ф.ПАРІЙ, С.Д. МЕЛЬНИЧУК, 2009

стокровної верхової породи і як самостійну затверджено в жовтні 1990 року, при цьому робота з її створення розпочалась ще в 1945 році з метою отримання верхово-запряжних коней.

Сьогодні в зв'язку із тим, що переважна більшість високоцінних тварин знаходиться в приватній власності, високою вартістю племінних тварин, збільшенням експорту та імпорту, участю в міжнародних змаганнях, а також застосуванням біотехнологічних методів при відтворенні, необхідність надійної системи ідентифікації і контролю походження коней стає надзвичайно актуальною [7]. До причин, що обумовлюють невідповідність записів у родоводах реальному походженню тварин, можна віднести такі: навмисна фальсифікація, недбалість при описі відмітин і тавруванні, покриття кобили двома жеребцями, випадкові спаровування. Єдиним ефективним способом контролю достовірності походження й ідентифікації тварин є генотипування за допомогою SSR-маркерів [8].

Метою нашої роботи було визначити достовірність походження коней Української верхової породи (УВП) за допомогою мікросателітних ДНК-маркерів, розрахувати частоти виявлених алелей, індекси їхньої гетерозиготності (H_{obs}, H_{exp}), поліморфізму (polymorphic information contents, PIC), а також, вірогідність виключення випадкового збігу алелей (probability of exclusion, PE). На прикладі групи тварин із відомим родоводом показати практичне застосування мікросателітних ДНК-маркерів для встановлення достовірності походження та визначення індивідуальних ДНК-профілів для кожної з досліджуваних тварин.

Матеріали і методи

Геномну ДНК було ізольовано з периферійної крові коней із використанням наборів "QIAamp® DNA Mini Kit" (Qiagen), згідно інструкцій виробника. Для дослідження використовували кров 40 коней УВП з відомим родоводом, наданих Асоціацією сприяння розвитку кінного спорту України.

Чотирнадцять мікросателітних ДНК-маркерів (табл. 1) було відібрано згідно рекомендацій Міжнародного комітету товариства генетики тварин (ISAG). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) застосовували для ампліфікації мікросателітних маркерів коней в стандартних умовах. Продукти ПЛР денатурували формамідом (Sigma) та розділяли методом капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі "ABI Prizm 3130" Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США). Визначення розмірів алелей здійснювали за допомогою програмного забезпечення "Gene Mapper 3.7" (Applied Biosystem, США) із використанням стандарту "Genescan-LIZ 500" (Applied Biosystem, США). Визначення достовірності походження тварин було здійснено згідно принципів успадковування кодомінантних маркерів: у лошати повинен виявлятись один алель від кобили-матері, інший від жеребця-батька.

Кількість та частоти ідентифікованих алелей оцінювали за допомогою безпосереднього підрахунку та аналізу одержаних генотипів, індекси гетерозиготності (H_{obs}, H_{exp}), поліморфізму (PIC) та вірогідність виключення помилкового збігу алелей (PE) було визначено за допомогою програмного забезпечення Cervus 3.0.3 [9] та PowerStatsV12 (Promega).

Результати та обговорення

В результаті проведеної роботи, незважаючи на невелику чисельність досліджуваних тварин, виявлено високий ступінь поліморфізму мікросателітних маркерів у коней УВП (табл. 1).

Кількість виявлених алелей становила від 5-ти для маркерів HTG04 та HTG07 до 12-ти – для HTG10. Свідченням достатньо

Таблиця 1. Індекси гетерозиготності, поліморфізму та вірогідність виключення випадкового збігу алелей для мікросателітних маркерів коней УВП

Назва локусу	Локалізація в хромосомі	Виявлена кількість алелей	H_{obs}	H_{exp}	PIC	PE
HTG04	9	5	0,64	0,585	0,482	0,342
HMS06	4	6	0,76	0,752	0,692	0,527
HMS02	10	6	0,68	0,695	0,636	0,398
AHT04	24	8	0,84	0,689	0,625	0,675
ASB23	3	8	0,80	0,808	0,763	0,599
HTG07	4	5	0,76	0,667	0,601	0,527
HTG06	15	8	0,84	0,810	0,766	0,675
CA425	28	9	0,60	0,807	0,762	0,291
HTG10	21	12	0,92	0,908	0,879	0,836
VHL20	30	10	0,96	0,841	0,805	0,919
AHT05	8	8	0,72	0,781	0,738	0,460
HMS03	9	7	0,60	0,723	0,662	0,291
HMS07	1	9	0,80	0,831	0,792	0,599
ASB17	2	10	0,92	0,856	0,819	0,836
CPE						0,9999998

високого рівня гетерогенності досліджуваної популяції була виявлена гетерозиготність (H_{obs}) (таблиця 1), яка знаходились в межах від 0,60 (CA425 та HMS03) до 0,96 (VHL20), при цьому очікувана гетерозиготність (H_{exp}) становила від 0,585 (HTG04) до 0,908 (HTG10). Індекс поліморфізму (PIC) був різним і коливався від 0,482 (HTG04) до 0,879 (HTG10). На основі отриманих даних підраховано вірогідність виключення випадкового збігу алелей (PE), яка складала від 0,291 (CA425 та HMS03) до 0,919 (VHL20). Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелей (CPE) становила 0,99999, або 99,999 %. Це свідчить про високий рівень інформативності обраної панелі мікросателітних маркерів для дослідження коней української верхової породи.

Слід зауважити, що результати визначення достовірності походження 13 голів із відомим родоводом було повністю підтверджено із використанням панелі з 14 мікросателітних ДНК-маркерів в усіх випадках без виключень.

Визначення достовірності походження племінних коней за допомогою SSR-маркерів є невід'ємною частиною генетичної експертизи, яка в свою чергу, згідно Наказу № 197 Мін. АПК (від 1.06.2004 р.), є складовою племінної справи у конярстві та проводиться з метою контролю достовірності походження племінних тварин, ідентифікації тварин і забезпечення достовірності родоводів племінних тварин, що сприяє підвищенню ефективності методів селекції та виявлення племінних тварин, що є носіями генетичних аномалій, і вилучення їх із селекційного процесу.

Висновки

Отримані дані свідчать про те, що для генетичного аналізу коней УВП найінформативнішими є 6 маркерів: ASB23, HTG06, HTG10, VHL20, HMS07 та ASB17 із середніми показниками PIC — 0,804 та PE —

0,739. Використання лише цих 6-ти маркерів для генетичного аналізу коней УВП дозволяє проводити їхню ідентифікацію із вірогідністю 99,98%, що перевищує вірогідність 99,95%, рекомендовану міжнародним комітетом родовідних книг (ISBC) для визначення достовірності походження племінних тварин.

Перелік літератури

1. *Litt M., Luty J.A.* A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene // Am. J. Hum. Genet. – 1989. – Vol. 44, № 3. – P. 397–401.
2. *Weber J.L., May P.E.* Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction // Am. J. Hum. Genet. – 1989. – Vol. 44, № 3. – P. 388–396.
3. *Ellegren H., Johansson M., Sandberg K., Andersson L.* Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse // Anim. Genet. – 1992. – Vol. 23, № 2 – P. 133–142.
4. *Guerin G., Bertaud M., Amigues Y.* Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8 // Anim. Genet. – 1994. – Vol. 25, № 1. – P. 62.
5. *Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K., Andersson L.* Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites // Anim. Genet. – 1994. – Vol. 25, № 1 – P. 19–23.
6. *Van Haeringen H., Bowling A.T., Stott M.L., Lenstra J.A., Zwaagstra K.A.* A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20 // Anim. Genet. – 1994. – Vol. 25, № 3 – P. 207.
7. *Binns M.M., Uolmes N.G., Holliman A.M.* The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing // Brit. Vet. J. – 1995. – Vol. 151, № 1. – P. 9–15.
8. *Siegal M.* UC Davis Book of Horses: A Complete Medical Reference Guide for Horses and Foals. – Haper Collins, New York, 1996. – P. 126–134.
9. *Marshall T.C., Slate J., Kruuk L., Pemberton J.M.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations // Mol. Ecol. – 1998. – Vol. 7, № 5. – P. 639–655.
10. *Tozaki T., Kakoi H., Mashima S., Hirota K.I., Hasegawa T., Ishida N., Miura N., Choi-Miura N.H., Tomita M.* Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci // J. Vet. Med. Sci. – 2001. – Vol. 63, № 11. – P. 1191–1197.

Представлено І.О. Андрєєвим
Надійшла 8.10.2009

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛОШАДЕЙ УКРАИНСКОЙ ВЕРХОВОЙ ПОРОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПАНЕЛИ SSR-МАРКЕРОВ

А.В. Шелёв, В.Г. Спиридонов, М.Ф. Парий, С.Д. Мельничук

Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК
Украина, 08162, Киево-Святошинский р-н, пгт Чабаны, ул. Машиностроителей, 7
e-mail: receptions@quality.ua

В работе на основе анализа 40 голов лошадей Украинской верховой породы, с использованием панели из 14 SSR-маркеров, показано возможность генотипирования животных с высокой степенью достоверности. Все изученные локусы показали высокий уровень полиморфизма, количество идентифицированных аллелей варьировало от 5 до 12 с индексом полиморфизма (PIC) от 0,482 – до 0,879. На основе анализа полученных данных определена вероятность случайного совпадения аллелей (CPE), которое составляет 99,999%. Это свидетельствует о том, что для генетического анализа лошадей УВП наиболее информативными являются 6 маркеров: ASB23, HTG06, HTG10, VHL20, HMS07 и ASB17. Панель из 6 указанных маркеров является достаточной для идентификации животных исследуемой породы, в соответствии с требованиями ISBC.

Ключові слова: украинская верховая порода лошадей, SSR-маркеры, генотипирование, определение достоверности происхождения.

GENOTYPING OF UKRAINIAN RIDER HORSE BREED USING PANEL OF SSR-MARKERS

A.V. Shelyov, V.G. Spyrydonov, M.F. Parii, S.D. Melnychuk

Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of AIC products,
Ukraine, 08162, Kievo-Svyatoshinskiy district, Chabany village, Mashinobudivnykiv str., 7,
e-mail: receptions@quality.ua

The present study was to evaluate a parentage verification system for Ukrainian Rider horse breed using 14 SSR- markers. A total number of 40 Ukrainian Rider horse including 13 foals for parentage verification were genotyped. The microsatellite loci showed extensive polymorphism with allele numbers ranging from 5 to 12 and polymorphism information content (PIC) values in the range 0.482 – 0.879. The analysis of these loci also revealed that they had a 99,999 % combined probability of exclusion (CPE) of false parentage. This study suggests that the DNA typing method has high potential for parentage testing and individual identification of Ukrainian Rider horse breed.

Key words: Ukrainian Rider horse breed, SSR-markers, genotyping, parentage verification.