

УДК 575.082-13:636.122

ОЦІНКА УКРАЇНСЬКОЇ ПОПУЛЯЦІЇ ЧИСТОКРОВНОЇ ВЕРХОВОЇ ПОРОДИ КОНЕЙ ЗА МІКРОСАТЕЛІТНИМИ ДНК-МАРКЕРАМИ

А.В. ШЕЛЬОВ^{1,2}, О.В. МЕЛЬНИК¹, В.Г. СПИРИДОНОВ¹, С.Д. МЕЛЬНИЧУК¹,
Н.В. ЗУЄВА²

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України
Україна, 03041, Київ, вул. Генерала Родімцева, 19, навчальний корпус №1

² Інститут розведення і генетики тварин НААН України
Україна, 08321, Київська область, Бориспільський район, с. Чубинське,
вул. Погребняка, 1
e-mail: shelyov@mail.ru

Мета. Дослідити алелофонд вітчизняної популяції чистокровної верхової породи коней за мікросателітними локусами з метою оцінки та збереження її генетичного різноманіття, а також визначення генетичної ситуації в популяції. **Методи.** Дослідження української популяції коней чистокровної верхової породи проводили, використовуючи ПЛР за 12 мікросателітними локусами ДНК. **Результати.** При проведенні генетичного дослідження за 12 мікросателітними локусами найінформативнішими виявилися АНТ04, АSB23, HMS07 та АSB17, а найменш інформативними – НTG06 та СА425. За усіма локусами, окрім НTG06, популяція має тенденцію до зростання гомозиготності. Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелів становила 99,7851%. **Висновки.** Отримані дані свідчать про високу різноманітність алелофону української популяції чистокровних верхових коней. Для підвищення достовірності генотипування чистокровної верхової породи доцільно використовувати додаткові високоінформативні мікросателітні ДНК-маркери.

Ключові слова: чистокровна верхова порода коней, генотипування, алель, мікросателіти ДНК.

Вступ. Чистокровна верхова порода коней є однією з найстаріших чистокровних порід коней, яких розводять у наші дні. Її було виведено в Англії наприкінці XVII – початку XVIII століття шляхом тривалого схрещування місцевих кобил із жеребцями східних порід. Починаючи з XVIII століття протягом 250 років англійських чистокровних коней розводили «в собі», тобто в умовах практично повної ізоляції від впливу генетичного матеріалу інших порід. У 1793 році було опубліковано перший том племінної книги (студбук) чистокровної верхової породи. З того часу жоден кінь, батьки якого не записані до студбука і достовірність походження якого не підтверджено генетичною експертизою, не може бути віднесений до чистокровної верхової породи. Наразі племінні книги ведуть за єдиними правилами в кожній країні, де займаються розведенням даної породи. Цю роботу контролює Міжнародний комітет з племінних книг (ISBC).

Успішна селекційна робота у племінному конярстві є неможливою без наявності достовірної інформації у родоводах коней, за якими можна простежити розвиток породи. Некоректні записи в племінних книгах унеможливають по-

© А.В. ШЕЛЬОВ, О.В. МЕЛЬНИК, В.Г. СПИРИДОНОВ, С.Д. МЕЛЬНИЧУК, Н.В. ЗУЄВА, 2013

дальший прогрес породи і можуть звести нанівець усі попередні селекційні досягнення. Особливо актуальною ця проблема є для чистокровних порід коней, яких розводять «в чистоті».

Починаючи з 2001 року згідно з новими вимогами ISAG та ISBC [1, 2] генетична експертиза походження коней чистокровної верхової породи в обов'язковому порядку здійснюється лише за мікросателітними локусами ДНК. Так, згідно з вимогами ISBC комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелів (CPE) за використовуваною панеллю мікросателітних маркерів повинна бути не меншою за 99,95%. Генотипування коней із використанням стандартної панелі з 14 маркерів дозволяє контролювати передачу спадкового матеріалу одразу за 13 хромосомами [3].

Метою нашої роботи було дослідження алелофонду вітчизняної популяції чистокровної верхової породи коней з метою оцінки та збереження її генетичного різноманіття та визначення генетичної ситуації в популяції.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень була 51 гол. коней чистокровної верхової породи, що утримуються в умовах державних та приватних кінних заводів, а також у приватних власників на території України. Дослідження проводили на базі відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК. Периферійну кров було відібрано у стерильні вакуумні пробірки із консервантом EDTA. Геномну ДНК виділяли за використання наборів «ДНК-сорб-В» («Амплі-Сенс», Росія) згідно з інструкцією виробника. Для аналізу було обрано 12 мікросателітних локусів, які входять до стандартної панелі маркерів для генотипування коней, визначеної ISAG. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за стандартних умов.

Продукти ампліфікації денатурували формамідом (Sigma, США) та розділяли шляхом електрофорезу на автоматичному 4-капілярному генетичному аналізаторі ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Розміри алелів визначали, використовуючи розмірний стандарт Genescan-LIZ 500 (Applied Biosystems, США) та програмне забезпечення «Gene Mapper 3.7» (Applied Biosystem, США).

Під час проведення популяційно-генетичного аналізу визначали такі показники: кількість алелів на локус (Na), ефективну кількість алелів (Ne), частоти алелів, індекси фактичної (Ho) і теоретичної (He) гетерозиготності, поліморфізму (PIC), фіксації (F), критерій Пірсона χ^2 , вірогідність виключення випадкового збігу алелів (PE). Для статистичної обробки даних використовували програмне забезпечення Cervus3.0.3, PowerStatsV12 (Promega), GENALEX 6 [4].

Результати та обговорення

У результаті проведених досліджень у популяції загалом було виявлено 94 алелі. Розподіл частот усіх ідентифікованих алелів наведено в табл. 1.

За локусом HTG04 виявлено 5 алельних варіантів, серед яких найчастіше (0,4020) зустрічали алельний варіант 131 п.н., у той час як алель у 125 п.н. спостерігали з найменшою частотою (0,0392). Серед 7 виявлених алелів за локусом HTG06 найбільшу частоту мав алель у 169 п.н. За локусом АНТ04 найчастіше (0,2255) зустрічали алельний варіант розміром 260 п.н. У той же час алель 142 п.н. ідентифікували найрідше (0,0098). Локус ASB23 виявився найполіморфнішим. Серед 13 алельних варіантів найбільшою частотою (0,2745) характеризувався алельний варіант 132 п.н. За локусами HTG07, HTG06, СА425, VHL20 ідентифіковано по 7 алелів. З найменшою частотою (0,0098) зустрічалися алельні варіанти 118 п.н. (HTG07), 86, 92, 98, 104 п.н.

Таблиця 1. Розподіл частот ідентифікованих алелів

Локус	Алель (частота)							
HTG04	125 (0,0392)	127 (0,3922)	129 (0,1176)	131 (0,4020)	133 (0,0490)			
HMS06	157 (0,0098)	159 (0,1176)	161 (0,0686)	163 (0,1765)	167 (0,0098)	169 (0,5784)	171 (0,0392)	
АНТ04	142 (0,0098)	144 (0,0392)	146 (0,1471)	148 (0,1176)	150 (0,1961)	152 (0,0980)	158 (0,0686)	160 (0,2255)
	162 (0,0980)							
ASB23	124 (0,0098)	126 (0,0098)	128 (0,0588)	130 (0,1961)	132 (0,2745)	134 (0,1863)	136 (0,0588)	138 (0,0196)
	144 (0,0098)	146 (0,0294)	148 (0,0882)	150 (0,0490)	152 (0,0098)			
HTG07	118 (0,0098)	120 (0,1471)	122 (0,0294)	124 (0,0686)	126 (0,2549)	128 (0,4314)	130 (0,0588)	
HTG06	84 (0,3333)	86 (0,0098)	90 (0,5784)	92 (0,0098)	98 (0,0098)	100 (0,0490)	104 (0,0098)	
CA425	228 (0,0098)	230 (0,0294)	232 (0,1765)	234 (0,0098)	238 (0,0686)	240 (0,6961)	242 (0,0098)	
VHL20	85 (0,1373)	87 (0,1078)	91 (0,0294)	93 (0,1078)	95 (0,2059)	97 (0,4020)	99 (0,0098)	
АНТ05	130 (0,0784)	132 (0,4118)	134 (0,1863)	136 (0,0196)	138 (0,1471)	140 (0,1569)		
HMS03	150 (0,0784)	152 (0,5098)	154 (0,0784)	158 (0,0098)	160 (0,0686)	162 (0,0294)	164 (0,1176)	166 (0,0686)
	168 (0,0196)	170 (0,0196)						
HMS07	170 (0,0588)	172 (0,0392)	174 (0,1176)	176 (0,1569)	178 (0,2549)	180 (0,2745)	182 (0,0784)	184 (0,0196)
ASB17	92 (0,1471)	94 (0,0490)	104 (0,0294)	106 (0,3333)	108 (0,1569)	110 (0,0196)	112 (0,0882)	114 (0,1765)

(HTG06), 228, 234, 242 п.н. (CA425) та 99 п.н. (VHL20). Алельний варіант розміром у 128 п.н. (HTG07) траплявся із частотою 0,4314, варіант 90 п.н. (HTG06) – із частотою 0,5784, 240 п.н. (CA425) – 0,6961. За локусом VHL20 найчастіше (0,4020) зустрічався алельний варіант 97 п.н.

Серед 6 алельних варіантів локусу АНТ05 алельний варіант 132 траплявся найчастіше (0,4118), а алельний варіант у 136 п.н. – із частотою 0,0196. За локусом HMS03 алель у 158 п.н. зустрічався із найменшою частотою (0,0098), у той же час

алель 152 п.н. мав частоту 0,5098. Локуси HMS07 та ASB17 у досліджуваній популяції представлені 6 алельними варіантами, найчастіше з яких ідентифікували алельні варіанти 180 п.н. (0,2745) та 106 п.н. (0,3333), відповідно.

Середня кількість алелів на локус (Na) становила 7,83 і коливалася від 5 (HTG04) до 13 (ASB23). Середнє значення ефективної кількості алелів (Ne) становило 3,96 (від 1,917 для CA425 до 6,652 для АНТ04).

Рівень фактичної гетерозиготності (Ho) за досліджуваними локусами коливався від 0,314 (CA425) до 0,824 (ASB23). Тео-

Таблиця 2. Характеристика поліморфізму використаних у дослідженні локусів мікросателітів ДНК

Локус	Na	Ne	Ho	He	χ^2	F	PIC	PE
HTG04	5	3,002	0,588	0,673	24,726**	0,118	0,606	0,227
HMS06	7	2,591	0,647	0,620	60,298***	-0,054	0,578	0,351
АНТ04	9	6,652	0,765	0,858	100,945***	0,100	0,832	0,535
ASB23	13	5,979	0,824	0,841	128,952***	0,011	0,813	0,643
HTG07	7	3,548	0,647	0,725	35,046*	0,099	0,678	0,351
HTG06	7	2,230	0,608	0,557	107,857***	-0,102	0,475	0,300
CA425	7	1,917	0,314	0,483	49,916***	0,344	0,442	0,069
VHL20	7	4,048	0,725	0,760	20,847	0,037	0,720	0,469
АНТ05	6	3,891	0,647	0,750	18,179	0,129	0,708	0,351
HMS03	10	3,365	0,588	0,710	86,412***	0,163	0,682	0,277
HMS07	8	5,255	0,765	0,818	75,018***	0,056	0,784	0,535
ASB17	8	5,002	0,706	0,808	80,004***	0,118	0,775	0,437
Середнє значення	7,833	3,957	0,652	0,717	65,683	0,085	0,674	0,37875
							CPE	0,997851

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

ретично очікувана гетерозиготність (He) в середньому становила 0,717, у той час як фактична – 0,652, що свідчить про надлишок гомозиготних генотипів у популяції відповідно до закону Харді-Вайнберга. Нами встановлено достовірний ($p < 0,05$) надлишок гомозигот за локусами HTG04, АНТ04, ASB23, HTG07, CA425, HMS03, HMS07, ASB17. У той же час за локусами HMS06 та HTG06 спостерігали незначний дефіцит гомозигот ($p < 0,001$) (табл. 2).

Розрахунок індексу фіксації (F) за локусами HMS06 та HTG06 виявив надлишок гетерозигот на рівні 5,4 та 10,2%, відповідно. За рештою локусів спостерігали надлишок гомозигот від 1,1% (ASB23) до 34,4% (CA425).

Найвище значення індексу поліморфізму (PIC) спостерігали за локусом АНТ04 (0,832), найменше – за CA425 (0,442). Це свідчить про те, що серед обраної панелі мікросателітних локусів локус АНТ04 є найбільш, а CA425, у свою чергу, найменш інформативним. Середнє значення індексу поліморфізму для всієї панелі мікросателітних маркерів становило 0,674.

Вірогідність виключення випадкового збігу алелів у середньому становила 0,37875 і коливалась від 0,069 (CA425) до 0,643 (ASB23). Значення комбінованої вірогідності виключення випадкового збігу алелів (CPE) за 12 досліджуваними локусами становило 0,997851. Для підвищення цього показника доречно прогенотипувати вибране поголів'я за додатковими високоінформативними мікросателітними локусами ДНК.

Висновки

Результати проведених досліджень свідчать про досить різноманітний алелофонд української популяції чистокровної верхової породи, що може бути наслідком впливу генетичного матеріалу чистокровної верхової породи з інших країн. Серед 12 обраних нами мікросателітних маркерів при визначенні генотипу коней найінформативнішими виявилися 4 – АНТ04, ASB23, HMS07 та ASB17, а найменш інформативними – HTG06 та CA425. Майже за всіма локусами популяція має тенденцію до зростання гомозиготності. Виняток стано-

вить лише локус HTG06. Значення комбінованої вірогідності виключення випадкового збігу алелів виявилось недостатнім (99,7851%) відповідно до вимог ISBC. Тому в подальшому до переліку використаних у дослідженні мікросателітів ДНК необхідно додати додаткові високоінформативні мікросателітні ДНК-маркери.

Перелік літератури

1. Храброва Л.А. Эффективность контроля происхождения лошадей по полиморфным системам крови и микросателлитам ДНК // Коневодство и конный спорт. – 2012. – №2. – С. 7 – 9.
2. Генетична ідентифікація та експертиза походження свійських коней (*Equus caballus*) мікросателітними фрагментами дезоксирибонуклеїнової кислоти. (Методичні рекомендації) / Спиридонов В.Г., Шельов А.В., Кухтіна К.В., Мельничук С.Д., Григорюк І.П. – К.: Видавничий центр НУБіП України, 2010. – 20 с.
3. Храброва Л.А. Использование генетических исследований в коневодстве // Коневодство и конный спорт. – 2010. – № 2. – С. 11–13.
4. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 288–295.

Представлено К.В. Спірідонову
Надійшла 14.03.2013

ОЦЕНКА УКРАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧИСТОКРОВНОЙ ВЕРХОВОЙ ПОРОДЫ ЛОШАДЕЙ ЗА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМИ ДНК-МАРКЕРАМИ

А.В. Шелёв^{1,2}, О.В. Мельник¹, В.Г. Спиридонов¹, С.Д. Мельничук¹, Н.В. Зуева²

¹ Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины
Украина, 03041, Киев, ул. Генерала Родимцева, 19, учебный корпус №1

² Институт разведения и генетики животных НААН Украины
Украина, 08321, Киевская область, Бориспольский район, с. Чубинское, ул. Погребняка, 1
e-mail: shelyov@mail.ru

Цель. Провести генетический анализ украинской популяции чистокровной верховой породы лошадей за микросателлитными локусами ДНК. **Методы.** Исследования укра-

инской популяции лошадей чистокровной верховой породы проводили, используя 12 микросателлитных локусов ДНК. **Результаты.** При проведении генетического исследования за 12 микросателлитными локусами наиболее информативными оказались АНТ04, ASB23, HMS07 и ASB17, а наименее информативными – HTG06 и СА425. По всем локусам, кроме HTG06, популяция имеет тенденцию к возрастанию гомозиготности. Комбинированная вероятность исключения случайного совпадения аллелей составила 99,7851%. **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о высоком разнообразии аллелофонда украинской популяции чистокровных верховых лошадей. Для повышения достоверности генотипирования чистокровной верховой породы целесообразно использовать дополнительные высокоинформативные микросателлитные ДНК-маркеры.

Ключевые слова: чистокровная верховая порода лошадей, генотипирование, аллель, микросателлиты ДНК.

EVALUATION OF UKRAINIAN POPULATION OF THOROUGHBRED RIDING HORSES BREED FOR MICROSATELLITE DNA MARKERS

A.V. Shelyov^{1,2}, O.V. Melnyk¹, V.G. Spiridonov¹, S.D. Melnychuk¹, N.V. Zujeva²

¹ National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
Ukraine, Kyiv, st. Generala Rodimceva, 17, Education Building № 1

² The Institute of Animal Breeding and Genetics NAAN
Ukraine, 08321, Kyiv region, Boryspil district, Chubynske, Pogrebnyaka str., 1
e-mail: shelyov@mail.ru

Aim. Aim is to explore alelofund of the national population of thoroughbred horse breed horses for microsatellite loci with view to assess and maintain its genetic diversity and determining the genetic situation in the population. **Methods.** Research of Ukrainian population Thoroughbred horse breed horses performed using PCR for 12 microsatellite DNA loci. **Results.**

A genetic study of 12 microsatellite loci suggested that most informative were AHT04, ASB23, HMS07 and ASB17, and the least informative – HTG06 and CA425. For all loci, except for HTG06, population tends to increase homozygosity. Combined exclusion probability of accidental coincidence of alleles was 99.7851%. **Conclusions.** The results obtained indicate a high

diversity of alelofund in Ukrainian population of thoroughbred horses. To improve the authenticity of thoroughbred horse breed genotyping one should use additional highly informative microsatellite DNA markers.

Key words: Thoroughbred riding horse breed, genotyping, allele, microsatellite DNA.