



показателями генетических расстояний. Комплексное изучение других важных генетических показателей выявило статистически значимый рост гомозиготности в большинстве популяций лошадей за период с 2001 по 2010 года, и, как следствие, снижение уровня полиморфности и уменьшение резерва генетической изменчивости, но и в соответствии генетического разнообразия, что с одной стороны, может рассматриваться как процесс обеднения генофонда, однако, с другой - как движение к его консолидации.

Ключевые слова: украинская верховая порода лошадей, генофонд, группы крови, аллели, генетический мониторинг, консолидация.

MONITORING OF GENETIC CHANGES IN POPULATIONS UKRAINIAN RIDING HORSE BREED

Rossokha V., Kovaleva T., Tur G., Institute of Animal Science NAAS

In this article we presents the results of the study of genetic processes in populations of Ukrainian horse breed for two decades. Were established a statistically significant change in mane genetic parameters. The intensity of these changes for the five studied populations are varies. The most accuracy of the difference of gene frequencies between generations found in micropopulations of horses in Lozivskiy and Dnepropetrovskiy stud farms, which confirmed by indicators of genetic distances.

Complex study of other important genetic parameters showed a statistically significant increase in homozygosity most populations of horses for the period from 2001 to 2010, and as a result, reducing polymorphism and decrease in provision genetic variability on the one hand, and genetic diversity from another side and accordingly, can be considered as process of depletion of the gene pool, but on the other - as a consolidation movement.

Key words: Ukrainian riding horse breed, genes, blood group, alleles, genetic monitoring, consolidation.

УДК 636.1.082: 577.21

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ЗАВОДСЬКИХ ПОРІД КОНЕЙ ЗА ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ДНК

Росоха В. І., к. с.-г. н., с. н. с., Шкавро Н. М., к. с.-г. н.
Інститут тваринництва НААН

У статті наведено результати тестування коней української верхової, новоолександрівської ваговозної, орловської рисистої та гуцульської порід за мікросателітними локусами ДНК (HTG6, ASB2, HMS2). Локус ASB2 визначено як найбільш поліморфний (5 алейних варіантів локусу та переважно гетерозиготні варіанти генотипів, $H=0,727$; $E=3,66$; $PI=0,700$) для коней гуцульської породи, а для коней української верхової, новоолександрівської ваговозної та орловської рисистої порід - локус HTG6. На основі порівняльного аналізу електрофоретичних профілів батьків та їх потомків підтверджене походження 12 коней гуцульської породи за трьома мікросателітними локусами ДНК.

Ключові слова: ДНК, мікросателітні локуси, поліморфізм, експертиза походження, коні.

Сучасні вимоги щодо ведення селекційно-племінної роботи включають різні аспекти застосування генетичних маркерів – як біохімічних, цитогенетичних, так і поліморфних ДНК-маркерів. Широке розповсюдження ДНК-типування за кордоном і необ-



хідність інтеграції вітчизняного конярства у світове співтовариство зумовлює пріоритетне використання ДНК-технологій у генетичному тестуванні, особливо при контролі достовірності походження коней [1, 2]. Необхідність переходу до використання ДНК-маркерів, а саме системи 17-и мікросателітів, була продиктована, по-перше, необхідністю відповідності міжнародним вимогам (що виходять з раціонального розуміння значно більшої надійності та ефективності контролю походження, що становить 99,99 %), а по-друге, - необхідністю збереження найбільш вразливих щодо навмисної фальсифікації походження порід коней, адже значна складова ціни племінних коней визначається цінністю їх походження [3]. На сьогодні застосування ДНК-маркерів є ефективним, інформативним і достовірним методом, що використовується у фундаментальних та прикладних генетичних дослідженнях на індивідуальному та популяційному рівнях - для проведення моніторингу з метою запобігання зниження генетичної різноманітності та використання його результатів при створенні селекційних програм удосконалення існуючих і виведення нових порід та внутрішньопорідних типів коней [4-7]. Контроль походження коней за локусами мікросателітів ДНК засновано на принципі виключення: відповідно до законів Менделя, гени нащадків мають відповідати генотипам їх батьків. Вивчення генетичної структури місцевих локальних порід тварин, що вирощуються у певних географічних і кліматичних умовах, та пошук видо- і породоспецифічних мікросателітних ДНК-маркерів є досить актуальним з точки зору розширення та доповнення існуючої панелі мікросателітних локусів для ідентифікації коней. Метою наших досліджень була оцінка генетичної структури популяції коней української верхової, новоолександрівської ваговозної, орловської рисистої та гуцульської порід за мікросателітними локусами ДНК (HTG6, ASB2, HMS2) та визначення їх інформативності в контролі походження коней.

Матеріали та методи досліджень. Досліди проведено на групах коней української верхової породи Лозівського кінного заводу, Сумської ДЮСШ, кінного заводу "Прогрес" Запорізької обл. та кінного заводу "Патріот" Рівненської обл. (n=54); новоолександрівської ваговозної породи СТОВ "Ланн" (n=48), орловської рисистої породи АФ "Агротіс" Донецької обл. (n=24) та гуцульської породи НВА "Племконцентр" Закарпатської обл., що за записами в родоводі характеризуються родинними зв'язками (n=20). ДНК було виділено з крові коней за методом Кавасакі з модифікаціями. Аналіз особливостей генетичної структури порід коней за поліморфними мікросателітними локусами ДНК проводили методом мультиплексної ПЛР за використання праймерів: для локусу HTG6 5'- CCT GCT TGG AGG CTG TGA TAA GAT -3' та 5'- GTT CAC TGA ATG TCA AAT TCT GCT -3'; для локусу ASB2 5'- CCT TCC TGT AGT TTA AGC TTC TG -3' та 5'- CAC AAC TGA GTT CTC TGA TAG G -3'; для локусу HMS2 5'-ACG GTG GCA ACT GCC AAG GAA G -3' та 5'- CTT GCA GTC GAA TGT GTA TTA AAT -3'. Режим проведення ампліфікації: денатурація ДНК при 96 °С – 2 хв, далі 10 циклів за схемою: денатурація ДНК при 96 °С – 40 с, відпал праймерів при 60 °С – 40 с, синтез ланцюгів ДНК при 71 °С – 40 с; потім 25 циклів за схемою - денатурація ДНК при 90 °С – 40 с, відпал праймерів при 60 °С – 40 с, синтез ланцюгів ДНК при 71 °С – 40 с (в останньому циклі протягом 3 хв). Детекція продуктів ампліфікації проводилась шляхом електрофоретичного розподілу молекул ДНК у 8 % поліакриламідному гелеві в денатуруючих умовах (за присутності сечовини), напруженість поля 300V. Як стандарт молекулярної маси використовували маркери M50 та pUC ("Fermentas", Литва).

Результати досліджень. Із метою одночасного визначення поліморфізму декількох мікросателітних локусів ДНК коней, було проаналізовано нуклеотидні послідовності та температури відпалу праймерів для забезпечення їх активізації за однакової температури в одній реакційній суміші (мультиплексна ПЛР). Визначено систему локусів (HTG6, ASB2 та HMS2), ампліфіковані фрагменти яких за своєю довжиною не пере-



сікаються, розраховано оптимальну температуру відпалу системи праймерів, яка становила 60 °С. За результатами проведеного аналізу поліморфізму мікросателітних послідовностей ДНК підконтрольних груп коней (табл.1) встановлено високий поліморфізм за всіма дослідженими локусами (до 5 алельних варіантів за різними локусами та до 9 варіацій генотипів).

Таблиця 1

Розподіл генотипів підконтрольних груп коней за мікросателітами ДНК

Локус	Породи															
	українська верхова (n = 58)				новоолександрів- ська вагоозна (n = 46)				орловська рисиста (n = 24)				гуцульська (n = 20)			
	кількість алелів	кількість варіацій генотипів	гомозиготні генотипи, %	гетерозиготні генотипи, %	кількість алелів	кількість варіацій генотипів	гомозиготні генотипи, %	гетерозиготні генотипи, %	кількість алелів	кількість варіацій генотипів	гомозиготні генотипи, %	гетерозиготні генотипи, %	кількість алелів	кількість варіацій генотипів	гомозиготні генотипи, %	гетерозиготні генотипи, %
HTG6	4	9	29,0	71,0	4	7	21,7	78,3	4	5	16,7	83,3	4	5	11,1	88,9
ASB2	3	4	45,0	55,0	3	5	50,0	50,0	4	5	4,2	95,8	5	6	-	100,0
HMS2	3	6	46,7	53,3	3	4	60,0	40,0	4	8	37,5	62,5	4	7	18,8	81,2

Для української верхової породи встановлено високий поліморфізм за локусом HTG6 (виявлено 4 алелі цього локусу) та його переважну гетерозиготність (71 %). За локусами ASB2 та HMS2 виявлено по 3 алелі та практично рівномірний розподіл гомо- та гетерозиготних генотипів – 0,55; 0,53 і 0,45; 0,47, відповідно. Подібний характер розподілу генотипів встановлено за локусом АНТ4. Найбільшу кількість гомозиготних генотипів виявлено за локусом HMS1 (62 %).

Досліджено генетичну структуру групи коней орловської рисистої породи та виявлено високий поліморфізм за всіма локусами (визначено по 4 різних алельних варіанти кожного локусу). Максимальну гетерозиготність встановлено за локусом ASB2 (0,958), також значною кількістю гетерозиготних генотипів характеризується досліджена популяція за локусом HTG6 (83,3 %). Розподіл гомо- та гетерозиготних генотипів на рівні 37,5 % та 62,5 %, відповідно, було виявлено за локусом HMS2.

Досліджена популяція коней новоолександрівської ваговної породи характеризується наявністю значної кількості гетерозиготних генотипів за локусом HTG6 (78,3 %), за яким виявлено 4 різні алельні варіанти. По три алелі визначено за локусами ASB2 та HMS2. Виявлено переважну гомозиготність за локусом HMS2 (60 % генотипів), до того ж вона була найвищою серед всіх досліджених порід коней, та рівномірний розподіл 50 % на 50 % гомо- й гетерозиготних генотипів за локусом ASB2.

За результатами проведеного аналізу поліморфізму мікросателітних послідовностей ДНК підконтрольної групи коней гуцульської породи за локусом HTG6 виявлено 4 алелі та 5 варіантів генотипів, серед яких 11,1 % є гомозиготними; за локусом ASB2 - 5 алелів та 6 варіантів генотипів і визначено їх 100 % гетерозиготність. За локусом HMS2 виявлено 4 алелі та розподіл гомо- та гетерозиготних генотипів на рівні 0,188 та 0,812,



відповідно.

Аналіз частот гомо- та гетерозиготних генотипів, окремо за кожним із досліджуваних мікросателітних локусів за всіма чотирма породами (характеристика визначеного локусу), показав, що найбільш поліморфним є локус HTG6 (80,4 % гетерозиготних генотипів), а найбільш консервативним виявився локус HMS2 (40,8 % гомозиготних форм). Установлено переважну гетерозиготність за локусом ASB2 для гуцульської та орловської рисистої порід (100 % та 95,8 %, відповідно), у той час, як для новоолександрівської ваговозної та української верхової порід розподіл гомо- та гетерозиготних генотипів за цим локусом був майже рівномірний. Були розраховані частоти гомо- та гетерозиготних генотипів у цілому за породою за всіма досліджуваними мікросателітними локусами (характеристика породи). Установлено, що найвищою кількістю гетерозиготних генотипів (90 %) характеризується гуцульська порода коней, що свідчить про підтримку генетичної різноманітності в цій популяції, яка є необхідною умовою для ефективної селекційної роботи.

За кількістю ідентифікованих алелів за дослідженими локусами і визначених частот алелів, було розраховано ступені гетерозиготності - H, ефективна кількість алелів у локусі - E та індекс ступеня поліморфізму – PIC (табл. 2); показано, що у популяціях підконтрольних груп коней досліджені мікросателітні локуси мають високий ступінь поліморфізму.

Таблиця 2

Популяційно-генетичні параметри, що обчислені за мікросателітними локусами ДНК підконтрольних груп коней

Локус	H	E	PIC	Локус	H	E	PIC
<i>Українська верхова порода</i>				<i>Орловська рисиста порода</i>			
HTG6	0,725	3,64	0,676	HTG6	0,735	3,78	0,686
ASB2	0,552	2,23	0,452	ASB2	0,721	3,59	0,668
HMS2	0,625	2,67	0,555	HMS2	0,739	3,83	0,691
<i>Новоолександрівська ваговозна порода</i>				<i>Гуцульська порода</i>			
HTG6	0,629	2,70	0,557	HTG6	0,722	3,60	0,669
ASB2	0,601	2,51	0,525	ASB2	0,727	3,66	0,700
HMS2	0,541	2,18	0,456	HMS2	0,711	3,46	0,667

Так, значення ступеня гетерозиготності (H) перевищувало 70 %. Найвищими показниками оцінюваних параметрів для гуцульської породи характеризувався локус ASB2 (H=0,727, E=3,66), HTG6 в орловській рисистій (H=0,735, E=3,78) та українській верховій порід (H=0,725, E=3,64), які є найбільш поліморфними в дослідженій вибірці коней. На основі виявлених частот алелів визначено індекс ступеня поліморфізму (PIC), значення якого для кожного локусу було на рівні вище 0,5 до 0,7, окрім локусу ASB2 для української верхової породи (0,452) та локусу HMS2 для новоолександрівської ваговозної породи (0,456)ю Таким чином можна стверджувати, що досліджені локуси характеризуються високим рівнем поліморфності.

Із метою підтвердження походження коней за мікросателітними локусами ДНК за батьком, матір'ю, або за двома батьками, проведено тестування одночасно за трьома локусами, відповідно до менделєвського характеру успадкування. На рисунку наведено



алгоритм визначення походження шляхом порівняння бендів на електрофореграмі (відповідно до визначених алелів мікросателітного локусу) батьків та їх потомків. За трьома мікросателітними локусами ДНК - HTG6, ASB2 та HMS2 було підтверджено походження коней за двома батьками для 7 особин, за матір'ю - для двох особин піддослідного стада гуцульської породи, за батьком - для трьох коней.

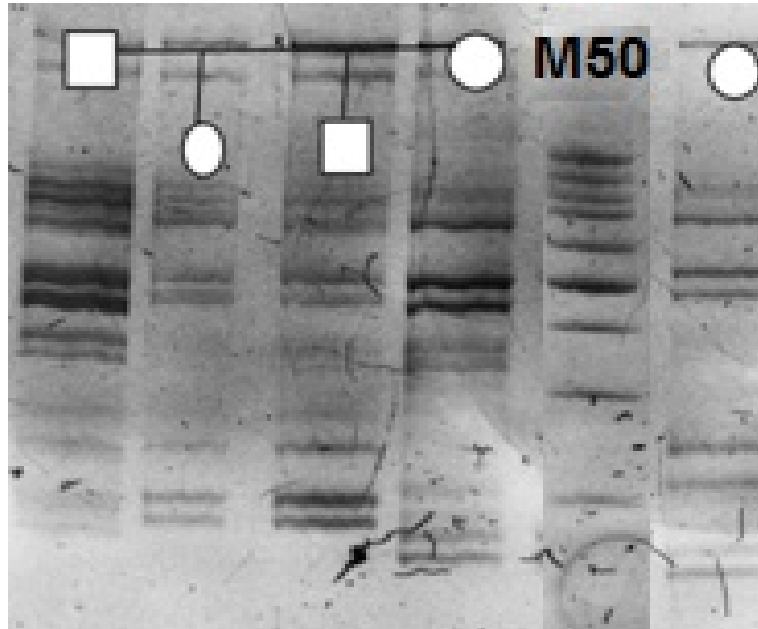


Рис. Приклад перевірки походження коней за локусами HTG6, ASB2 та HMS2. Доріжки 1-7 - ДНК коней, включаючи батьків та їх нащадків, M50 - маркер розмірів фрагментів ДНК.

Висновки:

1. Аналіз розподілу алелів та генотипів мікросателітних локусів ДНК досліджених порід коней виявив високий поліморфізм локусів HTG6, ASB2 та HMS2. Найбільшу кількість алельних варіантів (5) визначено за локусом ASB2 для коней гуцульської породи, високою кількістю варіацій генотипів (9) за локусом HTG6 характеризувалися досліджені коні української верхової породи.

2. Для коней гуцульської породи найбільш інформативним визначено локус ASB2 ($H = 0,727$; $E = 3,66$; $PI_C = 0,700$), а для дослідженої вибірки української верхової, новоолександрівської ваговоїзної та орловської рисистої порід - локус HTG6 (відповідно $H = 0,725, 0,629, 0,735$; $E = 3,64, 2,70, 3,78$; $PI_C = 0,676, 0,557$ та $0,686$).

3. Установлено, що найвищою кількістю гетерозиготних генотипів (90 %) характеризується гуцульська порода коней, що свідчить про підтримку генетичної різноманітності в цій популяції, яка є необхідною умовою для ефективної селекційної роботи.

4. Використання мультиплексної ПЛР (HTG6+ASB2+HMS2) дає змогу вирішувати спірні питання експертизи походження племінних коней за умов порівняльного аналізу електрофоретичних профілей мікросателітних локусів ДНК батьків та їх потомків.

Бібліографічний список

1. Зайцева М. А. Породоспецифические особенности аллелофонда микросателлитов ДНК лошадей заводских и местных пород : автореф. дис. на соискание науч. степ.



пени к.с.-х. наук: спец. 06.02.07 «Разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных» / Зайцева М. А. – Дивово, 2010. – 23 с.

2. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture / Commission on genetic resources for food and agriculture food and agriculture organization of the united nations [Электронный ресурс]: Rome, 2007. – Режим доступа:

<http://www.fao.org/docrep/010/a1200e/a1200e.htm>

3. Калашников В. В. Прикладная генетика в коневодстве / Калашников В. В., Храброва Л. А., Зайцев А. М. - Farm Animals. – 2013. – № 2. – С. 60-62.

4. Van De Goor L. P. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci / L. P. Van De Goor, H. Panneman, W. A. Van Haeringen // Animal Genetics. – 2009. – N. 41. – P.122-127.

5. Felicetti M. Genetic diversity in the Maremmano horse and its relationship with other European horse breeds / M. Felicetti, M. Lopes, A. Verini-Supplizi [et al.] // Anim. Genet. – 2010. – N.41, Suppl. 2. – P. 53-55.

6. Luis C. Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite loci variation / C. Luis, R. Juras, M. M. Oom [et al.] // Anim. Genet. – 2007. – Vol. 38. – P. 20-27.

7. Sun-young L. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing / L. Sun-Young, C. J. Gil-Jae // Vet. Sci. – 2006. – №7 (1). – P. 63-67.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ЗАВОДСКИХ ПОРОД ЛОШАДЕЙ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДНК

Россоха В.И., Шкавро Н.М., Институт животноводства НААН

В статье приведены результаты тестирования лошадей украинской верховой, новоалександровской тяжеловозной, орловской рысистой и гуцульской пород по микросателлитным локусам ДНК (HTG6, ASB2, HMS2). Локус ASB2 определен как наиболее полиморфный (выявлены 5 аллельных вариантов локуса и преимущественно гетерозиготные варианты генотипов, $H = 0,727$, $E = 3,66$, $PIC = 0,700$) для лошадей гуцульской породы, а для лошадей украинской верховой, новоалександровской тяжеловозной и орловской рысистой пород - локус HTG6. На основе сравнительного анализа электрофоретических профилей родителей и их потомков подтверждено происхождения 12 лошадей гуцульской породы по трем микросателлитным локусам ДНК.

Ключевые слова: ДНК, микросателлитные локусы, полиморфизм, экспертиза происхождения, лошади.

THE FACTORY HORSES BREED GENETIC STRUCTURE INVESTIGATION BY MICROSATELLITE DNA LOCI

Rossokha V., Shkavro N., Institute of Animal Science NAAS

The article highlights the results of Ukrainian riding, Novooleksandrivsky draft, Orlov trotter and Hutsul horses breed testing by microsatellite DNA loci (HTG6, ASB2, HMS2). The ASB2 locus defined as the most polymorphic (the five allelic variants and high heterozygosity genotype level were detected, $H = 0,727$, $E = 3,66$, $PIC = 0.700$) for Hutsul horses breed, and the HTG6 locus for Ukrainian riding, Novooleksandrivsky draft and Orlov trotter horses breeds. The origin of 12 Hutsul horses by three microsatellite DNA loci was confirmed based on a comparative analysis of electrophoresis profiles of parents and their offspring.

Keywords: microsatellite DNA loci, polymorphism, parentage control, horses.