

УДК 636.162.082: 575

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ШЕТЛЕНДСЬКИХ ПОНІ З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ДНК

О. В. Мельник, В. Г. Спиридонов, В. В. Дзіцюк, С. А. Осадчий
oksa.pion@gmail.com

Національний університет біоресурсів і природокористування України
Україна, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, 03041

Метою роботи було проведення генетичного аналізу 12 голів шетлендських поні з відомим родоводом за мікросателітними локусами ДНК для індивідуальної ідентифікації, підтвердження достовірності походження і популяційно-генетичної характеристики обраного поголів'я. Для проведення дослідження використовували геномну ДНК, виділену з цільної крові. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за 7 мікросателітними локусами ДНК (HTG04, HTG06, HMS06, HMS02, AHT04, ASB17, ASB23), рекомендованими Міжнародним товариством генетики тварин (ISAG). Продукти ампліфікації денатурували формамідом та розділяли шляхом електрофорезу на генетичному аналізаторі. У результаті досліджень було ідентифіковано 37 алелів. Кількість виявлених алелів на локус коливалася від 4 (HTG06) до 7 (ASB23) і в середньому становила 5,29. Середнє значення фактичної гетерозиготності (0,619) виявилось меншим за теоретично очікувану (0,723), що свідчить про переважання у досліджуваній групі тварин гомозиготних

генотипів. Незважаючи на те, що всі аналізовані локуси були поліморфними ($PI > 0,550$), найбільш поліморфним виявився локус ASB23 (0,812). У свою чергу, локус HMS02 мав найменше значення індексу поліморфізму (0,589). Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелів становила 99,04 %. Проведений генетичний аналіз засвідчив ефективність використання обраних мікросателітних локусів ДНК для індивідуальної ідентифікації, підтвердження достовірності походження та популяційно-генетичної характеристики шетлендських поні. В подальшому перспективним є дослідження більшої кількості поні цієї породи за додатковими локусами мікросателітної ДНК.

Ключові слова: ШЕТЛЕНДСЬКІ ПОНІ, МІКРОСАТЕЛІТИ, ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ, ПОЛІМОРФІЗМ, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, ГЕТЕРОЗИГОТНІСТЬ, ЧАСТОТИ АЛЕЛІВ

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION OF SHETLAND PONY USING MICROSATELLITE LOCI OF DNA

O. V. Melnyk, V. G. Spyrydonov, V. V. Dzitsiuk, S. A. Osadchyj
oksa.pion@gmail.com

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
Ukraine, Kyiv, Heroyiv Oborony st., 15, 03041

The aim of the present work was to conduct a genetic analysis of 12 goals of Shetland pony with known pedigree by microsatellite DNA loci for individual identification, parentage testing and population-genetic characterization of the selected livestock. In a study genomic DNA was extracted from whole blood. PCR was performed

by 7 microsatellite loci of DNA (HTG04, HTG06, HMS06, HMS02, AHT04, ASB17, ASB23), recommended by the International Society of Animal Genetics (ISAG). Amplification products were denatured formamide and separated by electrophoresis on a genetic analyzer. A total number of 37 alleles were detected. The

number of detected alleles per locus ranged from 4 (HTG06) to 7 (ASB23) with the mean number 5.29. The mean value of observed heterozygosity (0.619) was lower than expected (0.723), indicating the prevalence in the studied group of animals homozygous genotypes. Despite the fact that all analyzed loci were polymorphic ($PIC > 0.550$), the most polymorphic locus was ASB23 (0, 812). In turn, the locus HMS02 had the lowest value of PIC (0.589). Combined exclusion probability was 99.04 %. Conducted genetic analysis has shown the efficiency of selected microsatellite loci of DNA for individual

identification, parentage testing and population-genetic characterization of Shetland pony. In future available is genetic analysis of more number of pony of this breed using additional microsatellite DNA loci.

Keywords: SHETLAND PONY, MICROSATELLITES, GENETIC ANALYSIS, POLYMORPHISM, POLYMERASE CHAIN REACTION, HETEROZYGOSITY, ALLELE FREQUENCY

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШЕТЛЕНДСКИХ ПОНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДНК

О. В. Мельник, В. Г. Спиридонов, В. В. Дзицюк, С. А. Осадчий
oksa.pion@gmail.com

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины
Украина, г. Киев, ул. Героев Оборона, 15, 03041

Целью работы было проведение генетического анализа 12 голов шетлендских пони с известной родословной по микросателлитным локусам ДНК для индивидуальной идентификации, подтверждения подлинности происхождения и популяционно-генетической характеристики выбранного поголовья. Для проведения исследования использовали геномную ДНК, выделенную из цельной крови. Полимеразную цепную реакцию проводили за 7 микросателлитными локусами ДНК (HTG04, HTG06, HMS06, HMS02, ANT04, ASB17, ASB23), рекомендованными Международным обществом генетики животных (ISAG). Продукты амплификации денатурировали формамидом и разделяли путем электрофореза на генетическом анализаторе. В результате исследований было идентифицировано 37 аллелей. Количество выявленных аллелей на локус колебалось от 4 (HTG06) до 7 (ASB23) и в среднем составляло 5,29. Среднее значение фактической гетерозиготности (0,619) оказалось меньше теоретически ожидаемой (0,723), что свидетельствует о преобладании в исследуемой группе животных гомозиготных генотипов. Несмотря на то, что все рассматриваемые локусы были полиморфными ($PIC > 0,550$), наиболее полиморфным оказался локус ASB23 (0, 812). В

свою очередь, локус HMS02 имел наименьшее значение индекса полиморфизма (0,589). Комбинированная вероятность исключения случайного совпадения аллелей составила 99,04%. Проведенный генетический анализ показал эффективность использования избранных микросателлитных локусов ДНК для индивидуальной идентификации, подтверждения подлинности происхождения и популяционно-генетической характеристики шетлендских пони. В дальнейшем перспективным является исследование большего количества пони этой породы за дополнительными локусами микросателлитной ДНК.

Ключевые слова: ШЕТЛЕНДСКИЕ ПОНИ, МИКРОСАТЕЛЛИТЫ, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ПОЛИМОРФИЗМ, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, ГЕТЕРОЗИГОТНОСТЬ, ЧАСТОТА АЛЛЕЛЯ

Шетлендські поні є однією із найстаріших порід коней *Equus caballus*. Батьківщиною породи вважаються Шетлендські та Оркнейські острови, які знаходяться 200 кілометрів на північ від

Шотландії. Формування породи шетлендських поні відбувалося в суворих умовах північного клімату і поганій якості кормової бази. Саме тому ці поні є невибагливими до умов утримання та годівлі. Припускають, що ця порода коней походить від дрібних британських коней кельтського походження. Тривалий час шетлендські поні не викликали цікавості за межами Шетлендських островів. Лише у XIX столітті після заборони у 1847 році використання дитячої і жіночої праці в шахтах промисловість звернула увагу на малих і витривалих поні. Розпочався активний експорт шетлендських поні до Англії та інших країн. У цей же час відбулося прилиття до породи крові норвезьких фьордів, арабів і мустангів, завдяки чому поні поділилися на 2 класи: клас «А» – основний, тварини з висотою у холці до 107 см; клас «Б» – обласгороджений тип з висотою у холці від 107 до 120 см.

Наприкінці XIX століття маркіз Лондондеррі на острові Мейнленд заснував кінний завод із чистопородного розведення шетлендських поні. У 1890 році в Англії було створено першу племінну книгу цієї породи, від якої пішли решта племінних книг.

Сьогодні попит на шетлендських поні пов'язаний із їх широким використанням для розваг дітей, у навчанні верховій їзди та кінному спорту, іпотерапії. На фоні цього спостерігається тенденція до збільшення поголів'я цієї породи. Незважаючи на широке використання шетлендських поні, у генетичному відношенні вони залишаються недостатньо вивченими. У Київській області є кілька господарств, які займаються розведенням шетлендських поні. Одним із них є навчально-науково-виробнича лабораторія конярства НУБіП України. Генетичні дослідження цієї породи поні в нашій країні проводили за системами груп крові [1]. Проте сьогодні усе більше генетичних лабораторій переходить на тестування коней за мікросателітними локусами ДНК, а у

випадку чистокровної верхової та арабської порід використання цього виду генетичних маркерів є обов'язковим. Мікросателіти характеризуються високою варіабельністю, кодомінантним характером успадкування, високим ступенем поліморфізму, відомою локалізацією в геномі. Це дозволяє використовувати їх для підтвердження достовірності походження [3, 2, 7], внутрішньо- та міжпородної диференціації порід [4, 10], вивчення генетичної різноманітності коней [6, 7].

Метою нашої роботи був генетичний аналіз шетлендських поні за мікросателітними локусами ДНК для індивідуальної ідентифікації, підтвердження достовірності походження і популяційно-генетичної характеристики обраного поголів'я.

Матеріали і методи

Для проведення дослідження було обрано 12 голів шетлендських поні (з них 5 кобил, 2 жеребці, 5 лошат) з відомим родоводом, яких розводять у навчально-науково-виробничій лабораторії конярства НУБіП України. Периферійну кров відбирали у стерильні вакуумні пробірки із консервантом EDTA. Геномну ДНК виділяли, використовуючи набори «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Росія) згідно з інструкцією виробника. Генетичний аналіз проводили за 7 мікросателітними локусами ДНК, які входять до переліку рекомендованих ISAG для індивідуальної ідентифікації та підтвердження достовірності походження коней. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за стандартних умов на ампліфікаторі Veriti 96-Well (Applied Biosystems, США) за наступних параметрів: 1 етап — початкова денатурація (95 °C — 10 хв), 2 етап — 30 циклів (95 °C — 30 с, 60 °C — 30 с, 72 °C — 1 хв). Заключний 3 етап тривав 72 °C 60 хв [9]. Продукти ампліфікації денатурували формамідом (Sigma, США) та проводили електрофорез на 4-

капілярному генетичному аналізаторі ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) згідно протоколу виробника. Розмір алелів визначали, використовуючи розмірний стандарт Genescan-LIZ 500 (Applied Biosystems, США), програмне забезпечення «Gene Mapper 3.7» (Applied Biosystem, США) та внутрішній контрольний зразок.

Підтвердження достовірності походження проводили згідно принципу кодомінантного успадкування мікросателітних локусів: лоша повинне мати один алель, успадкований від батька, інший — від матері.

Частоти алелів, кількість алелів на локус (N_a) визначали шляхом прямого підрахунку отриманих даних, ефективну

кількість алелів на локус, фактичну (H_o) та теоретично очікувану (H_e) гетерозиготність, індекс поліморфізму (PIC), індекс фіксації (F) та вірогідність виключення випадкового збігу алелів (PE) обраховували, використовуючи програмне забезпечення Cervus 3.0.3, GENALEX 6 [5], PowerStats.

Результати й обговорення

У результаті проведених досліджень було проведено індивідуальну ідентифікацію всіх 12 голів поні. Частоти виявлених алелів за досліджуваними мікросателітними локусами ДНК наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл частот алелів мікросателітних локусів для шетлендських поні

Локус	Алелі і частоти						
АНТ04	H (0,417)	J (0,042)	L (0,250)	N (0,292)			
ASB17	F (0,375)	K (0,292)	M (0,083)	N (0,042)	Q (0,042)	T (0,167)	
ASB23	J (0,083)	K (0,125)	L (0,125)	S (0,125)	T (0,083)	U (0,208)	V (0,250)
HMS02	G (0,292)	H (0,042)	I (0,500)	J (0,167)			
HMS06	K (0,208)	L (0,042)	N (0,083)	O (0,167)	P (0,208)	Q (0,292)	
HTG04	I (0,042)	J (0,042)	K (0,417)	L (0,333)	M (0,042)	O (0,125)	
HTG06	H (0,208)	K (0,042)	O (0,417)	P (0,333)			

За локусами HTG04, HMS06 та ASB17 було ідентифіковано по 6 алелів. Серед алельних варіантів за локусом HTG04 з найбільшою частотою виявляли алель K (0,417), у той час як алелі I, J та M зустрічалися з частотою 0,042. З такою ж частотою ідентифікували алельні варіанти L (HMS06) та N і Q (ASB17). За локусами HMS06 та ASB17 найбільшу частоту відмічали для алелів Q (0,292) та F (0,375), відповідно.

Для локусів HTG06, HMS02 та АНТ04 кількість виявлених алелів становила 4. Найчастіше (із частотою 0,417) за локусами HTG06 та АНТ04 ідентифікували алелі O та H, відповідно. У той же час алельні варіанти K, та J за цими ж локусами виявилися найменш розповсюдженими — 0,042. Що стосується локусу HMS02, то у половині випадків

зустрічався алель I, тоді як H виявляли з найменшою частотою (0,042).

Найбільш поліморфним серед досліджуваних виявився локус ASB23, який у шетлендських поні був представлений 7 алельними варіантами. Причому розподіл частот алелів виявився більш-менш рівномірним. Так, алельні варіанти U та V спостерігали із частотами 0,208 та 0,250, відповідно. Алелі J та T, а також K, L та S зустрічалися з однаковою частотою — 0,083 та 0,125, відповідно.

Основні генетичні показники, отримані у результаті досліджень наведено у таблиці 2. Загалом у досліджуваних тварин було ідентифіковано 37 алелів. Інформативність локусу залежить від кількості виявлених алелів і частоти їх поширення в популяції. Середня кількість алелів на локус (N_a) становила 5,29 і

коливалася в межах від 4 (HTG06, HMS02, АНТ04) до 7 (ASB23). Що стосується ефективної кількості алелів (N_e), то в середньому цей показник становив 3,843.

Найвище значення N_e було зафіксовано для локусу ASB23 (6,000), а найнижче (2,909) — для HMS02.

Таблиця 2

Популяційно-генетичні характеристики шетлендських поні

Локус	Кількість виявлених алелів, N_a	Ефективна кількість алелів, N_e	Фактична гетерозиготність, H_o	Теоретично очікувана гетерозиготність, H_e	Індекс поліморфізму, PIC	Індекс фіксації, F	Вірогідність виключення випадкового збігу алелів, P_E
АНТ04	4	3,097	0,917	0,677	0,614	-0,3539	0,830
ASB17	6	3,789	0,833	0,736	0,694	-0,1321	0,662
ASB23	7	6,000	0,833	0,833	0,812	0	0,662
HMS02	4	2,909	0,250	0,656	0,589	0,6190	0,045
HMS06	6	4,800	0,583	0,792*	0,760	0,2632	0,271
HTG04	6	3,273	0,417	0,694	0,644	0,4000	0,124
HTG06	4	3,032	0,500	0,670	0,606	0,2539	0,188
Середнє значення	5,29±0,512	3,843±0,471	0,619±0,102	0,723±0,028	0,674±0,035	0,1500±0,1356	0,397±0,128
CPE							0,9904

Примітка.* — $P < 0,05$

Середні значення фактичної (H_o) та теоретично очікуваної (H_e) гетерозиготності становили 0,619 та 0,723, відповідно. Максимальне значення H_o було виявлено за локусом АНТ04 — 0,917, мінімальне (0,250) — за локусом HMS02. Показник N_e коливався в межах від 0,656 (HMS02) до 0,833 (ASB23). Достовірне переважання гомозиготних генотипів над гетерозиготними спостерігали лише за локусом HMS06. За рештою досліджуваних локусів спостерігалася тенденція до переважання гомозигот (локуси HTG04, HTG06, HMS02) чи гетерозигот (локуси АНТ04 та ASB17). При розрахунку індексу фіксації (F) за двома локусами (АНТ04 та ASB17) було виявлено надлишок гетерозигот на рівні 35,39 та 13,21 %, відповідно. За рештою локусів, окрім ASB23, спостерігали надлишок гомозиготних генотипів, який знаходився в межах від 25,39 % (HTG06) до 61,9 % (HMS02).

Аналіз розрахованих індексів поліморфізму (PIC) засвідчив, що

досліджувана група тварин за всіма локусами є поліморфною ($PIC > 0,550$). Середнє значення PIC становило 0,674 і коливалося від 0,589 (HMS02) до 0,812 (ASB23). Це свідчить про те, що локус HMS02 є найменш, а ASB23 найбільш поліморфним.

В усіх 5 випадках, ґрунтуючись на кодомінантній природі успадкування мікросателітних локусів, було підтверджено походження лоша поні відповідно до записів родоводів. Приклад родинного аналізу за мікросателітними локусами ДНК зображено на рисунку. Окрім індивідуальної ідентифікації, підтвердження достовірності походження та популяційно-генетичної характеристики, дані проведеного аналізу за мікросателітними локусами ДНК дозволяють прослідкувати успадкування нащадками алелів батьків. У таблиці 3 наведено успадкування алелів жеребців Ереліс та Галун їхніми нащадками.

Вірогідність виключення випадкового збігу алелів знаходилася в межах від 0,045 (HMS02) до 0,830 (АНТ04) і в середньому становила 0,397.

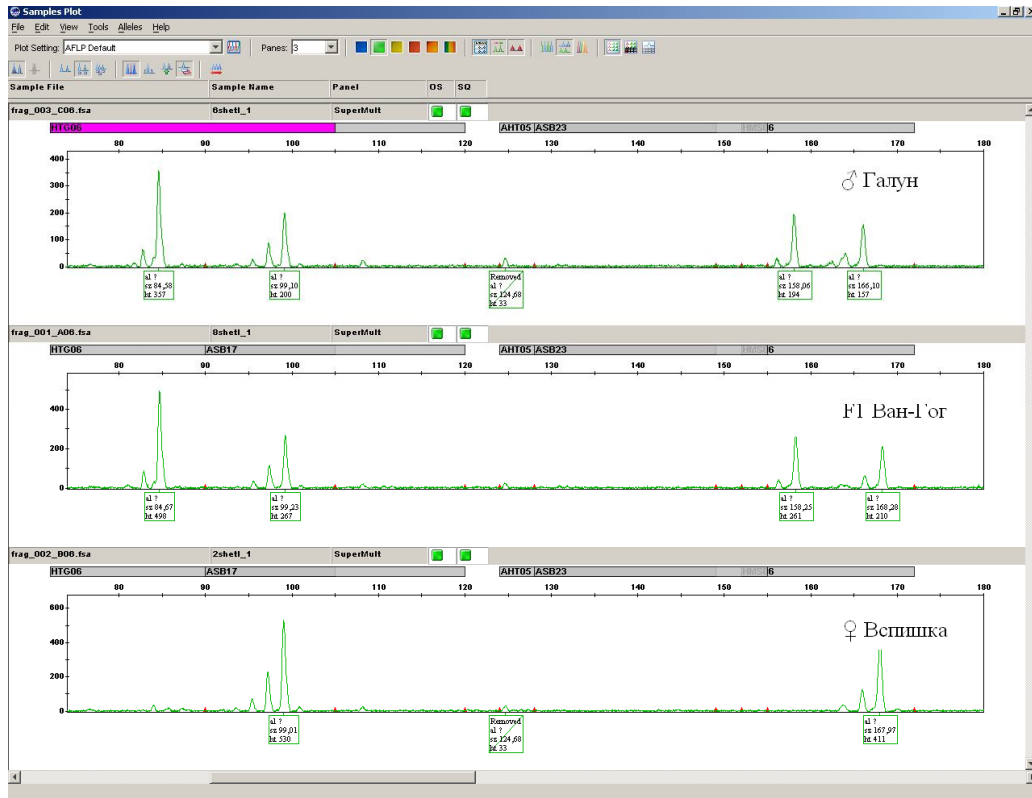


Рис. 1. Родинний аналіз шетлендських поні за мікросателітними локусами HTG06 та HMS06

Значення комбінованої вірогідності виключення випадкового збігу алелів склало 0,9904, або 99,04%. Для підвищення достовірності генотипування

шетлендських поні доцільно провести генетичний аналіз за додатковими локусами мікросателітної ДНК.

Таблиця 3

Успадкування алелів Ереліса та Галуна у нащадків

Локус	Кличка						
	Ереліс	Долорес (дочка Ереліса)	Ванесса (дочка Ереліса)	Галун	Вегас (син Галуна)	Ван-Гог (син Галуна)	Гаврош (син Галуна)
АНТ04	H/L	H/L	H/N	H/L	L/N	H/L	L/N
ASB17	F/K	F/F	F/M	N/T	F/T	K/T	F/T
ASB23	S/U	K/S	S/U	V/V	T/V	J/V	L/V
HMS02	I/I	I/I	I/I	G/G	G/H	G/G	G/G
HMS06	Q/Q	N/Q	Q/Q	K/O	K/P	K/O	K/P
HTG04	L/L	L/O	L/L	K/K	K/K	K/K	K/L
HTG06	H/P	P/P	P/P	H/O	H/O	H/O	H/O

Примітка: жирним шрифтом виділені алелі Ереліса та Галуна

Висновки

Проведені дослідження засвідчили ефективність використання обраних 7 мікросателітних локусів для індивідуальної ідентифікації,

підтвердження достовірності походження та популяційно-генетичного аналізу шетлендських поні. Усі досліджувані локуси виявилися поліморфними, проте найвищий показник індексу поліморфізму

було зафіксовано за локусом ASB23. Середня фактична гетерозиготність була меншою за теоретично очікувану, що свідчить про переважання у досліджуваній групі тварин гомозиготних генотипів. Використовуючи обрані мікросателітні локуси ДНК, в усіх 5 випадках було підтверджено достовірність походження лошат шетлендських поні та прослідковано успадкування ними алелів жеребців.

Перспективи подальших досліджень. Проведена робота є початковим етапом досліджень шетлендських поні в Україні за мікросателітними локусами ДНК. В подальшому для підвищення достовірності генотипування цієї породи поні доцільним є збільшення кількості тварин та поліморфних локусів для розроблення інформативної панелі мікросателітної ДНК.

1. Glushak I. I. Genotyp ta gabitus shetlendskykh poni shodo formuvannya yikh u selektsijnu grupu porody [Family-group selection execution according to Shetland pony genotype & habit]. *Naukovo-tehnichnyj byuleten* (Kharkiv, Instytut tvarynnystva UAAN) — Scientific and Technical Bulletin, 2008, no. 98, pp. 74–81 (in Ukrainian).

2. Khanshour A. M., Conant E. K., Juras R., Cothran E. G. Microsatellite analysis for parentage testing of the Arabian horse breed from Syria. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2013, 37, pp. 9–14.

3. Khrabrova L. A., Zajtsev M. A., Kalynkova L. V. Kontrol' proishozhdenija po microsatellitam DNK. *Nauchnoje obespechenije konkurentnosposobnosti plem., sport. i product. konevodstva v Rossii i stranah SNG (nauchno-prakticheskaya konferentsiya, posvyashch. 70-letiyu prof. S. S. Sergiyenko), sbornik nauchnyh trudov* [Scientific. ensuring the competitiveness of the tribes., sports. and product. horse breeding in Russia and the CIS (Scientific and Practical Conference dedicated. 70th anniversary of prof. S. S. Sergiyenko) collection. research. works]. Divovo, 2007, vol. 1, pp. 98–103 (in Russian).

4. Khrabrova L. A., Zajtseva M. A., Kalinkova L. V. Geneticheskaya differentsiaciya chistokrovnyh porod loshadej raznyh linij

chistokrovnoj arabskoj porody [Genetic differentiation of purebred horse breeds by microsatellite DNA loci]. *Sel'skhozjaystvennaya biologiya — Agricultural Biology*, 2008, no. 2, pp. 19–21 (in Russian).

5. Peakall R., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 2006, no. 6, pp. 288–295.

6. Rjabova T. N., Khrabrova L. A., Ustyanceva A. V., Morozov R. O. Otsenka geneticheskoho raznoobraziya populyacij loshadej ahalktekinskoj porody po DNK-markeram [Genetic diversity evaluation of horse populations of akhal-teke breed on DNA markers]. *Konevodstvo i konnyj sport — Horse breeding and equestrian sports*, 2012, no. 5, pp. 6–8 (in Russian).

7. Shel'ov A. V., Spyrydonov V. G., Parij M. F., Melnychuk S. D. Genotypuvannya konej ukrajins'koyi verchovoyi porody konej z vykorystannyam paneli z SSR-markeriv [Genotyping of Ukrainian rider horse breed using panel of SSR-markers]. *Visnyk Ukrain's'koho tovarystva genetykiv ta selektsioneriv — Journal of Ukrainian Society of Geneticists and Breeders*, 2009, Vol. 7, no. 2, pp. 257–261 (in Ukrainian).

8. Silva A. C. M., Paiva S. R., Albuquerque M. S. M., Egito A. A., Santos S. A., Lima F. C., Castro S. T., Mariante A. S., Correa P. S., McManus C. M. Genetic variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11, (2), pp. 881–890.

9. Spyrydonov V. G., Shelyov A. V., Kuhtina K. V., Melnychuk S. D., Grygoryuk I. P. *Genetychna identyfikatsiya ta ekspertyza pohodzhennya sviys'kyh konej (Equus caballus) mikrosatelitnymi frahmentamy dezoksiribonukleynovoyi kysloty (metodychni rekomendatsiyi)* [Genetic identification and parentage verification of domestic horses (Equus caballus) by microsatellite fragments of deoxyribonucleic acid. (Guidelines)]. Kyjiv, Publishing Center of NULES of Ukraine, 2010. 20 p. (In Ukrainian).

10. Zajtseva M. A., Khrabrova L. A. Vnutriporodnaya differentsiaciya po 17 lokusam mikrotellitnoj DNK loshadej raznyh linij chistokrovnoj arabskoj porody [Intrapedigree diversity on 17 loci of microsatellite DNA in Arabian horses of different lines]. *Konevodstvo i konnyj sport — Horse breeding and equestrian sports*, 2010, no. 1, pp. 19–21 (in Russian).