

ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ДЕЯКИХ ПОРІД КОНЕЙ ЗА МІКРОСАТЕЛІТНИМИ ЛОКУСАМИ ДНК

О. В. Мельник

В. В. Дзіцюк, доктор сільськогосподарських наук

В. Г. Спиридонов, доктор сільськогосподарських наук

Проведено генетичний аналіз коней трьох порід за використання 12 мікросателітних локусів ДНК, рекомендованих Міжнародним товариством генетики тварин. У досліджуваних популяціях виявлено високий рівень поліморфізму та приблизно однакову кількість алелів на локус. Для всіх популяцій встановлено дефіцит гетерозиготних генотипів, що підтверджує індекс фіксації. Визначення генетичної подібності між досліджуваними породами підтверджує активний вплив чистокровної верхової породи на формування української верхової. Надалі перспективним є дослідження більшого поголів'я досліджуваних порід за даним типом генетичних маркерів.

Мікросателітні локуси, генетичний поліморфізм, гетерозиготність, генетична подібність, чистокровна верхова порода, українська верхова порода, гуцульська порода.

Останнім часом у тваринництво в цілому, і в конярство зокрема, активно впроваджується маркер-допоміжна селекція (MAS – Marker Assisted Selection), яка дає змогу проводити ефективну селекційну роботу з урахуванням генетичного потенціалу тварин. У зв'язку з тим, що в популяціях і породах постійно відбуваються генетичні зміни в результаті мутацій і еволюції, проведення регулярного генетичного тестування

дозволяє стежити за генетичними процесами, які відбуваються всередині популяцій і порід, і планувати подальшу роботу з ними. На особливу увагу, з генетичної точки зору, заслуговують аборигенні породи коней, ареал розведення яких обмежений, і чистопородні породи, єдиним методом розведення яких є чистопородне.

Серед великого різноманіття генетичних маркерів, які використовують у конярстві, особливою популярністю користуються мікросателітні послідовності ДНК. Мікросателіти характеризуються високою варіабельністю, кодомінантним характером успадкування, високим ступенем поліморфізму, відомою локалізацією в геномі й широко використовуються для визначення генетичної структури порід і популяцій, вивчення походження та мікроеволюції порід, проведення генетичного моніторингу в породах з метою збереження алелофонду нечисленних порід, удосконалення методів розведення і т. д. [3]. Міжнародним товариством генетики тварин (ISAG) визначено перелік мікросателітних локусів ДНК, рекомендованих для проведення генетичної експертизи походження коней. Останнім часом все більше лабораторій переходить на тестування за мікросателітними локусами ДНК, а відповідно, до рекомендацій Міжнародного товариства генетики тварин (ISAG) і Міжнародного комітету з племінних книг (ISBC). Тестування чистокровних коней генетичні лабораторії зобов'язані проводити за цим типом генетичних маркерів. В Україні дослідження коней за використання мікросателітних маркерів розпочато не так давно [1, 2], а багато порід за цим типом генетичних маркерів не досліджували.

Мета досліджень – проведення міжпородної генетичної диференціації українських популяцій чистокровної верхової, української верхової та гуцульської порід коней.

Матеріали та методи досліджень. Роботу проводили на базі науково-дослідного відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК. Матеріалом були 123 голови коней трьох порід: чистокровної верхової – 51 гол., української верхової – 34 гол., гуцульської – 38 гол. Периферійну кров відбирали з яремної вени у стерильні вакуумні пробірки з консервантом EDTA. Геному ДНК виділяли, використовуючи набори «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Росія) згідно з інструкцією виробника. Для здійснення генетичного аналізу використовували 12 мікросателітних локусів ДНК (АНТ04, АНТ05, ASB17, ASB23, CA425, HMS03, HMS06, HMS07, НТG04, НТG06, НТG07, VHL20), які входять до переліку рекомендованих ISAG. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за стандартних умов [5]. Продукти ампліфікації денатурували формамідом (Sigma, США) та проводили електрофорез на 4-капілярному генетичному аналізаторі ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), згідно з протоколом 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.

Використовуючи програмне забезпечення Cervus 3.0.3 [6] та PowerStatsV12 (Promega) визначали кількість алелів на локус (Na),

фактичну (Ho) та теоретично очікувану (He) гетерозиготність, індекс поліморфізму (PIC), індекс фіксації (F). На підставі частот виявлених алелів досліджуваних мікросателітних локусів було розраховано генетичні відстані й коефіцієнти генетичної схожості за Nei [7].

Результати досліджень. У результаті проведених досліджень було встановлено, що кожна порода коней характеризується певним спектром частот алелів і має свої особливості (табл. 1).

Кількість виявлених алелів є показником генетичної різноманітності популяції. Для всіх досліджених порід загальна кількість виявлених алелів була приблизно однаковою, хоча максимальним цей показник був для коней української верхової породи (98 алелів). Показник середньої кількості алелів на локус для всіх порід коливався в межах 7,833–8,167.

Згідно з Botstein та ін. [4], локуси зі значенням PIC > 0,500 є високополіморфними, зі значенням PIC в межах 0,250–0,500 – помірно поліморфними, а якщо PIC < 0,250, то маркери низькополіморфні. Розрахунок індексу поліморфізму показав, що всі досліджувані популяції є високополіморфними. Найбільш поліморфною, незважаючи на невелику кількість та локальний характер розведення, виявилася гуцульська порода коней, генофонд якої з 1979 р. підлягає захисту.

1. Генетична характеристика коней досліджуваних порід за мікросателітними локусами

Показник	Порода		
	Чистокровна верхова	Українська верхова	Гуцульська
Загальна кількість алелів, Na	94	98	95
Середня кількість алелів на локус	7,833	8,167	7,917
Індекс поліморфізму, PIC	0,675	0,736	0,745
Фактична гетерозиготність, Ho	0,642	0,708	0,757
Теоретично очікувана гетерозиготність, He	0,679	0,777	0,784
Індекс фіксації, F	0,094	0,077	0,037

Аналіз рівнів гетерозиготності в усіх трьох породах показав наявність дефіциту гетерозиготних генотипів, про що свідчить також позитивне значення індексу фіксації. Максимальним він був для досліджуваної популяції чистокровної верхової породи коней. Незважаючи на те, що для гуцульських коней дефіцит гетерозигот був найменшим (3,7%), у зв'язку з обмеженою кількістю породи та з метою запобігання втратам цінного генетичного матеріалу, контроль за генетичними процесами, що відбуваються в популяції, заслуговує на особливу увагу.

Використовуючи частоти виявлених алелів, було розраховано генетичні відстані й генетичну схожість між досліджуваними популяціями (табл. 2).

Найвищий рівень генетичної подібності було встановлено для української верхової та чистокровної верхової порід, що свідчить про

значну участь чистокровних верхових коней у формуванні української верхової породи. Гуцульська порода виявилася більш віддаленою від досліджених верхових порід, що підтверджує її унікальність та особливості формування.

2. Генетичні відстані (під діагоналлю) та генетична подібність (над діагоналлю) між досліджуваними породами коней за 12 мікросателітними локусами ДНК

	Чистокровна верхова	Українська верхова	Гуцульська
Чистокровна верхова	-	0,816	0,625
Українська верхова	0,203	-	0,732
Гуцульська	0,471	0,313	-

Висновки

У результаті проведених досліджень трьох порід коней з використанням 12 мікросателітних локусів ДНК, було здійснено міжпородну генетичну диференціацію та визначено особливості досліджуваних порід. В усіх популяціях спостерігався дефіцит гетерозиготних генотипів, що свідчить про їх консолідацію та можливе подальше скорочення генетичного різноманіття. Залежно від мети, яку ставить перед собою селекціонер, це може призводити як до позитивних, так і до негативних наслідків. Аналіз генетичної подібності підтвердив значний вплив чистокровної верхової породи коней на формування української верхової. Водночас, аборигенна гуцульська порода виявилася більш віддаленою від верхових порід. Надалі перспективним є дослідження більшої кількості поголів'я досліджуваних порід, з використанням додаткових інформативних мікросателітних локусів ДНК.

Список літератури

1. Визначення достовірності походження коней української верхової породи та мікросателітний аналіз ДНК / В. Г. Спиридонов, А. В. Шельов, С. Д. Мельничук, Т. Є. Ільницька // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11, № 1–2. – С. 265–269.
2. Генетичний аналіз гуцульських коней за мікросателітними локусами / В. Спиридонов, А. Шельов, К. Кухтіна, Ю. Стефурак // Тваринництво України. – 2011. – № 4. – С. 15–18.
3. Храброва Л. А. Руководство по использованию микросателлитов ДНК при генотипической оценке лошадей / Л. А. Храброва, Н. В. Блохина / Дивово, 2012. – 20 с.
4. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms / David Botstein, Raymond L. White, Mark Skolnick, Ronald W. Davis // The American Journal of Human Genetics. – 1980. – Vol. 32, No. 3. – P. 314–331.
5. Dimsoski P. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses / Pero Dimsoski // Forensic Sciences. – 2003. – Vol. 44, No. 3. – P. 332–335.
6. Kalinowski S. T. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment / Steven

T. Kalinowski, Mark L. Taper, Tristan C. Marshall // *Molecular Ecology*. – 2007. – Vol. 16, No. 5. – P. 1099–1106.

7. Nei M. Genetic distance and molecular phylogeny / Masatoshi Nei // *Population Genetics and Fishery Management*. – Washington : University of Washington, 1987. – P. 193–224.

Проведен генетический анализ лошадей трех пород при использовании 12 микросателлитных локусов ДНК, рекомендованных Международным обществом генетики животных. В исследуемых популяциях выявлен высокий уровень полиморфизма и приблизительно одинаковое количество аллелей на локус. Для всех популяций установлен дефицит гетерозиготных генотипов, что подтверждает индекс фиксации. Определение генетического сходства между исследуемыми породами подтверждает активное воздействие чистокровной верховой породы на формирование украинской верховой. В дальнейшем перспективным является исследование большего поголовья исследуемых пород по данному типу генетических маркеров.

Микросателлитные локусы, генетический полиморфизм, гетерозиготность, генетическое сходство, чистокровная верховая порода, украинская верховая порода, гуцульская порода.

By means of 12 microsatellite DNA loci, which are recommended by the International Society of Animal Genetics, genetic analysis of three horse breeds was performed. The high level of polymorphism and a similar number of alleles by locus in studied populations were revealed. For all populations heterozygotes deficiency, confirming index fixation was found. Determination of genetic similarity between the studied species confirms an active influence Thoroughbred horse breed on the formation of Ukrainian Rider breed. The future research of greater number horses of these breeds is perspective.

Microsatellite loci, genetic polymorphism, heterozygosity, genetic similarity, Thoroughbred horse breed, Ukrainian Rider horse breed, Hucul breed.