

Генетическая дифференциация некоторых пород лошадей Украины по 12 локусам микросателлитной ДНК

О.В. Мельник, соискатель, В.В. Дзицюк, д.с.-х.н., В.Г. Спиридонов, д.с.-х.н., Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

В последнее время в животноводство в целом и в коневодство в частности активно внедряется маркер-вспомогательная селекция (MAS – Marker Assisted Selection), которая позволяет проводить эффективную селекционную работу с учётом генетического потенциала животных. В связи с тем что в популяциях и породах постоянно происходят генетические изменения в результате мутаций и эволюции, проведение регулярного генетического тестирования позволяет следить за происходящими процессами внутри популяций и пород и планировать дальнейшую работу с ними. Особого внимания с генетической точки зрения заслуживают аборигенные породы лошадей, ареал разведения которых ограничен, и чистопородные

породы, единственным методом разведения которых является чистопородное.

Среди большого разнообразия генетических маркеров, используемых в коневодстве, особой популярностью пользуются микросателлитные последовательности ДНК. Микросателлиты характеризуются высокой вариабельностью, кодоминантным характером наследования, высокой степенью полиморфизма, известной локализацией в геноме и широко используются для определения генетической структуры пород и популяций, изучения происхождения и микроэволюции пород, проведения генетического мониторинга в породах с целью сохранения аллелофонда малочисленных пород, усовершенствования методов разведения и т.д. [1]. Международным обществом генетики животных (ISAG) определён перечень микросателлитных локусов ДНК, рекомендованных для проведения генетической экспертизы происхождения

лошадей. Всё больше лабораторий переходят на тестирование по локусам микросателлитов ДНК, а в соответствии с рекомендациями Международного общества генетики животных (ISAG) и Международного комитета по племенным книгам (ISBC) тестирование чистокровных лошадей генетические лаборатории обязаны проводить за этим видом генетических маркеров.

На Украине исследования лошадей с использованием микросателлитных маркеров начаты не так давно [2, 3], а многие из разводимых пород не исследовались за микросателлитными локусами. Целью нашей работы было проведение межпородной генетической дифференциации украинских популяций чистокровной верховой, украинской верховой и гуцульской пород лошадей и определение филогенетических связей между ними.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили на базе научно-исследовательского отдела молекулярно-генетических исследований Украинской лаборатории качества и безопасности продукции АПК. Материалом для исследований служили образцы крови лошадей разных пород (51 гол. чистокровной верховой породы, 34 гол. украинской верховой, 38 гол. гуцульской породы).

Периферическую кровь отбирали в стерильные вакуумные пробирки с консервантом EDTA. Геномную ДНК выделяли, используя наборы «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», Россия) согласно инструкции производителя. Генетический анализ проводили за 12 микросателлитными локусами ДНК (АНТ04, АНТ05, ASB17, ASB23, CA425, HMS03, HMS06, HMS07, НТГ04, НТГ06, НТГ07, VHL20), которые входят в перечень редомендуемых ISAG для индивидуальной идентификации и подтверждения происхождения лошадей. Полимеразную цепную реакцию проводили при стандартных условиях на амплификаторе Veriti 96-Well (Applied Biosystems, США). Продукты амплификации денатурировали формамидом (Sigma, США) и разделяли путём капиллярного электрофореза на 4-капиллярном генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя. Размер аллелей определяли, используя размерный стандарт Genescan-LIZ 500 (Applied Biosystems, США), программное обеспечение «Gene Mapper 3.7» (Applied Biosystems, США).

Частоты аллелей, количество аллелей на локус (Na), индекс полиморфизма (PIC), индекс фиксации (F), наблюдаемую (No) и ожидаемую (Ne) гетерозиготность определяли, используя программное обеспечение Cervus 3.0.3, GENALEX 6 [4]. На основании частот выявленных аллелей исследуемых микросателлитных локусов были рассчитаны генетические расстояния и коэффициенты генетического сходства по Nei [5]. Для построения дендрограммы был использован метод UPGMA [7, 8].

Результаты исследований. В результате проведённых исследований было установлено, что каждая порода лошадей характеризуется определённым спектром частот аллелей и имеет свои особенности (табл. 1).

Число выявленных аллелей служит показателем генетического разнообразия популяции. Для всех исследованных пород общее количество выявленных аллелей было приблизительно одинаковым, хотя максимальным этот показатель был для лошадей украинской верховой породы (98 аллелей). Показатель среднего количества аллелей на локус для всех пород колебался в пределах 7,833–8,167.

Согласно Botstein и др. [6] локусы со значением PIC>0,500 являются высокополиморфными, со значением PIC в пределах 0,250–0,500 – умеренно полиморфными, а если PIC<0,250, то маркеры низкополиморфные. Расчёт индекса полиморфизма показал, что все исследуемые популяции являются высокополиморфными. Несмотря на это, наиболее полиморфной оказалась гуцульская порода лошадей, генофонд которой с 1979 г. подлежит защите.

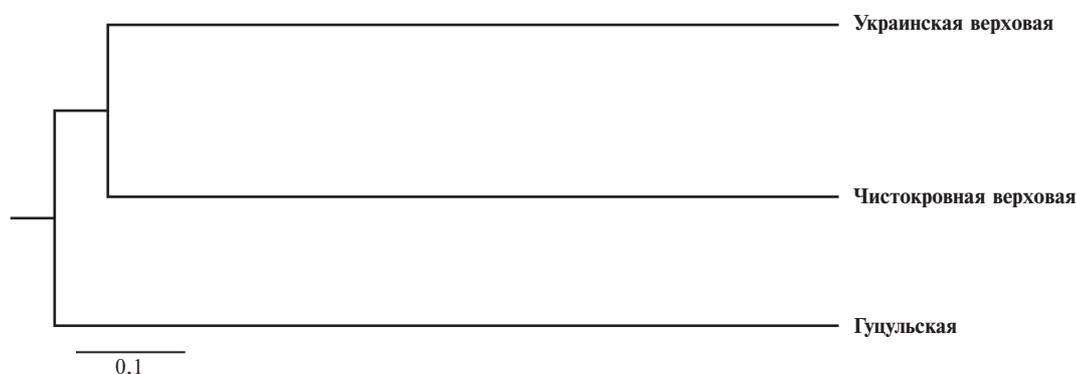
Анализ уровней гетерозиготности во всех трёх породах показал наличие дефицита гетерозиготных генотипов, о чём свидетельствует также положительное значение индекса фиксации. Максимальным он был для исследуемой популяции чистокровной верховой породы лошадей. Несмотря на то что для гуцульских лошадей дефицит гетерозигот был наименьшим (3,7%), в связи с ограниченной численностью породы и с целью предупреждения потери ценного генетического материала контроль за генетическими процессами, что происходят в популяции, заслуживает особого внимания.

1. Генетико-популяционная характеристика исследуемых пород лошадей (в среднем за 12 микросателлитными локусами)

Показатель	Порода		
	чистокровная верховая	украинская верховая	гуцульская
Общее количество аллелей Na	94	98	95
Среднее количество аллелей на локус	7,833	8,167	7,917
Индекс полиморфизма PIC	0,675	0,736	0,745
Наблюдаемая гетерозиготность No	0,642	0,708	0,757
Теоретически ожидаемая гетерозиготность Ne	0,679	0,777	0,784
Индекс фиксации F	0,094	0,077	0,037

2. Генетические расстояния (под диагональю) и генетическое сходство (над диагональю) между исследуемыми породами лошадей за 12 микросателлитными локусами ДНК

	Чистокровная верховая	Украинская верховая	Гуцульская
Чистокровная верховая	–	0,816	0,625
Украинская верховая	0,203	–	0,732
Гуцульская	0,471	0,313	–



Дендрограмма для 3 перемен.
Метод полной связи
1-г Пирсон

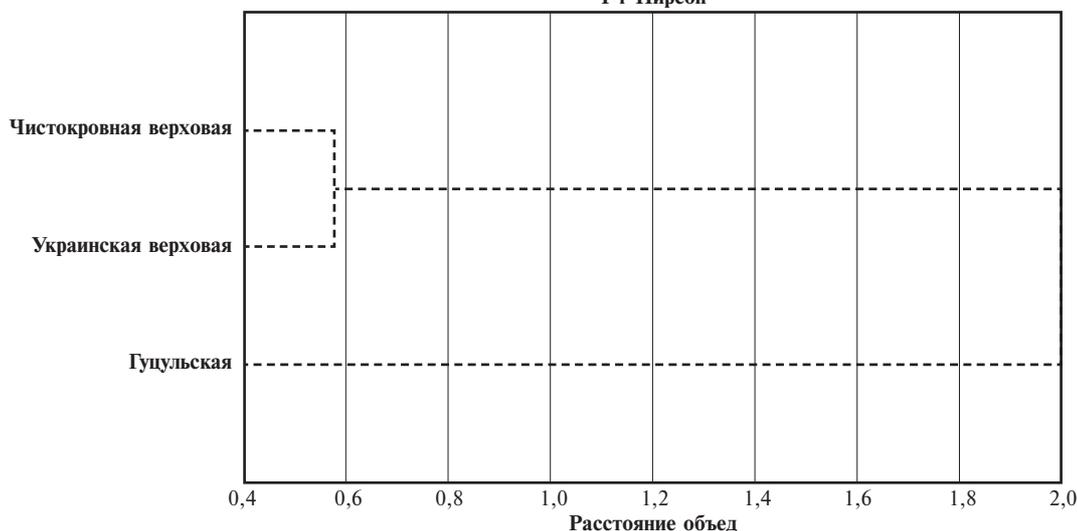


Рис. – Дендрограмма генетических взаимоотношений между исследуемыми породами лошадей

С использованием частоты выявленных аллелей были рассчитаны генетические расстояния и генетическое сходство между исследуемыми популяциями (табл. 2).

Самый высокий уровень генетического сходства был установлен между украинской верховой и чистокровной верховой породами, что свидетельствует о значительном участии чистокровной верховой породы в формировании украинской верховой породы. Наименьшее генетическое сходство наблюдали между чистокровной верховой и гуцульской породами.

На основании генетических расстояний с использованием метода UPGMA была построена филогенетическая дендрограмма (рис.).

Проведённый кластерный анализ показал, что исследуемые породы лошадей образуют два кластера, в один из которых входят чистокровная верховая и украинская верховая породы. Гуцульская порода

оказалась более отдалённой от других исследованных пород, что подтверждает её уникальность и особенности формирования.

Выводы. В результате проведённых исследований трёх пород лошадей с использованием 12 микросателлитных локусов ДНК, которые входят в перечень рекомендованных ISAG, была проведена межпородная генетическая дифференциация и определены особенности исследуемых пород. Во всех популяциях наблюдался дефицит гетерозиготных генотипов, что свидетельствует об их консолидации и возможном дальнейшем сокращении генетического разнообразия. В зависимости от цели, которую ставит перед собой селекционер, это может приводить как к позитивным, так и к негативным последствиям. Кластерный анализ подтвердил значительное влияние чистокровной верховой породы лошадей на формирование украинской верховой породы. В то же время абор-

ригенная гуцульская порода лошадей оказалась более отдалённой от верховых пород. В дальнейшем перспективным является исследование большего количества поголовья исследуемых пород, с использованием дополнительных информативных микросателлитных локусов ДНК.

Литература

1. Храброва Л.А., Блохина Н.В. Руководство по использованию микросателлитов ДНК при генотипической оценке лошадей. Дивово, 2012. 20 с.
2. Спиридонов В.Г., Шельов А.В., Кухтіна К.В. [та ін.] Генетичний аналіз гуцульських коней за микросателітними локусами // Тваринництво України. 2011. № 4. С. 15–18.
3. Спиридонов В.Г., Шельов А.В., Мельничук С.Д. Визначення достовірності походження коней української верхової породи та микросателітний аналіз ДНК // Біологія тварин. 2009. Т. 11. № 1–2. С. 265–269.
4. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006. N. 6. P. 288–295.
5. Nei M., Eds. N., Ryman F., Utter M. Genetic distance and molecular phylogeny // *Population Genetics and Fishery Management*. Washington: University of Washington, 1987. P. 193–224.
6. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *The American Journal of Human Genetics*. 1980. Vol. 32. N. 3. P. 314–331.