УДК 575.082.13:636.1.001.32

ВИЗНАЧЕННЯ ДОСТОВІРНОСТІ ПОХОДЖЕННЯ КОНЕЙ УКРАЇНСЬКОЇ ВЕРХОВОЇ ПОРОДИ ТА МІКРОСАТЕЛІТНИЙ АНАЛІЗ ДНК

В. Г. Спиридонов[1], А. В. Шельов[1], С. Д. Мельничук[1], Т. Є. Ільницька[2]

[1]Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК
[2]Асоціація сприяння розвитку кінного спорту України

У статті визначається достовірніть походження коней Української верхової породи з використанням 14 ДНК-маркерів. Для дослідження було проаналізовано 40 коней, зокрема з них 13 лошат. Мікросателітні локуси показали високий рівень поліморфізму, кількість визначених алелей коливалась від 5 до 12 з індексом поліморфізму (PIC) від 0,482 до 0,879. Крім того, аналіз локусів показав, що комбінована вірогідність випадкового збігу алелей (CPE) складає 99,99993 %. Ця робота продемонструвала, що використання обраної панелі ДНК-маркерів має високий потенціал, як для визначення достовірності походження, так і для індивідуальної ідентифікації коней Української верхової породи.

Ключові слова: УКРАЇНСЬКА ВЕРХОВА ПОРОДА КОНЕЙ, ДНК-МАРКЕРИ, ГЕНОТИПУВАННЯ, ВИЗНАЧЕННЯ ДОСТОВІРНОСТІ ПОХОДЖЕННЯ

Українську верхову породу коней (УВП), як самостійну, затверджено в жовтні 1990 року, при цьому робота з її виведення розпочалась ще у 1945 році, з метою отримання верхово-запряжних коней. З 1953 року напрям селекційної роботи було змінено на верховий. Породу виведено методом складного відтворного схрещування місцевих та запряжних коней з західноєвропейськими кіньми тракенської, гановерської, угорської та чистокровної верхової породи. Коні УВП відрізняються породністю, яскравим екстер'єром, добронравністю, слухняністю, високою витривалістю та невибагливістю щодо умов утримання. Наразі чисельність коней УВП в Україні становить близько 2779 голів, у тому числі: жеребці-плідники — 90 голів, конематки — 1248, молодняк різного віку — 1129 та коні в спорті — 312 голів.

Підвищення ефективності контролю походження племінних коней є одним з найважливіших завдань племінної справи. В умовах сьогодення, у зв'язку із появою великої кількості приватних власників, високою вартістю племінних тварин, збільшенням експорту та імпорту, участю в міжнародних змаганнях, а також застосуванням біотехнологічних методів при відтворенні необхідність надійної системи ідентифікації і контролю походження коней стає надзвичайно актуальною [1]. Причини, що обумовлюють помилки в документах коней можуть бути різними (покриття кобили двома жеребцями, випадкові спаровування, недбалість при описі відмітин і таврування, навмисна фальсифікація). Єдиним ефективним способом контролю достовірності походження та ідентифікації тварин є генетичне тестування за допомогою ДНК-маркерів [2].

Відкриття поліморфізму коротких тандемних повторів ДНК (мікросателітів) та використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) сприяло розробці універсального інструменту для індивідуальної ідентифікації та встановлення достовірності походження у людей та тварин [3, 4]. Мікросателіти мають простий та стабільний механізм успадкування, який простежується від однієї генерації до іншої, тому їх застосовують для встановлення походження за різними напрямками родинних відносин. Для коней виявлено велику кількість мікросателітних маркерів, але не всі вони є однаково інформативними для різних

популяцій та порід коней, саме тому, комітетом з генетики коней Міжнародного товариства генетики тварин (ISAG) було виділено 9 ДНК-маркерів (AHT04, AHT05, ASB02, HMS03, HMS06, HMS07, HTG04, HTG10 та VHL20), як міжнародну стандартну панель мікросателітних маркерів [5–8]. За рекомендацією комітету визначення достовірності походження коней повинно спиратись на виключення збігу двох або більше маркерів, оскільки виключення збігу лише за одним маркером може бути спричинене невизначеністю або мутаційним процесом [1].

Метою нашої роботи було визначити достовірність походження коней Української верхової породи (УВП) за допомогою мікросателітних ДНК-маркерів, розрахувати частоти виявлених алелей, індекси їхньої гетерозиготності (Hobs, Hexp), поліморфізму (polymorphic information contents, PIC), а також вірогідність виключення випадкового збігу алелей (probability of exclusion, PE); на прикладі групи тварин із відомим родоводом показати практичне застосування мікросателітних ДНК-маркерів для встановлення достовірності походження та визначення індивідуальних ДНК-профілів для кожної з досліджуваних тварин.

Матеріали і методи

Геномну ДНК було ізольовано з периферійної крові коней із використанням наборів «QIAamp® DNA Mini Kit» (Qiagen), згідно з інструкцією виробника. Для дослідження використовували кров 40 коней УВП з відомим родоводом, наданих Асоціацією сприяння розвитку кінного спорту України.

Чотирнадцять мікросателітних ДНК-маркерів (табл. 1) було відібрано згідно з рекомендаціями комітету Міжнародного товариства генетики тварин (ISAG). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) застосовували для ампліфікації мікросателітних маркерів коней у стандартних умовах. Продукти ПЛР денатурували формамідом (Sigma) та розділяли методом капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі «ABI Prizm 3130» Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США). Визначення розмірів алелей здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Gene Mapper 3.7» (Applied Biosystem, США) із використанням стандарту «Genescan-LIZ 500» (Applied Biosystem, США). Визначення достовірності походження тварин було здійснено згідно з принципами успадковування кодомінантних маркерів: у лошати повинен виявлятись один алель від кобили-матері, інший від жеребця-батька.

Таблиця 1

Мікросателітні ДНК-маркери для ідентифікації коней

Назва маркеру	Локалізація в геномі, № хромосоми	Розмір алелей, п.н.	Флуоресцентна мітка
HTG04	9	116–141	FAM
HMS06	4	153–171	R6G
HMS02	10	215–236	TAMRA
AHT04	24	138–170	FAM
ASB23	3	128–154	R6G
HTG07	4	114–130	TAMRA
HTG06	15	74–103	R6G
CA425	28	224–250	R6G
HTG10	21	85–171	TAMRA
VHL20	30	83–107	FAM
AHT05	8	126–152	R6G
HMS03	9	146–174	TAMRA
HMS07	1	167–189	FAM
ASB17	2	89–131	R6G

Кількість та частоти ідентифікованих алелей оцінювали за допомогою безпосереднього підрахунку та аналізу одержаних генотипів, індекси гетерозиготності (Hobs, Hexp), поліморфізму (PIC) та вірогідність виключення помилкового збігу алелей (PE) було визначено за допомогою програмного забезпечення Cervus 3.0.3 [9] та PowerStatsV12 (Promega).

Результати й обговорення

У результаті проведеної роботи виявлено високий ступінь поліморфізму мікросателітних маркерів у коней УВП, незважаючи на невелику чисельність досліджуваних тварин (табл. 2). Кількість виявлених алелей коливалась від 5 для маркерів HTG04 та HTG07 до 12 — для HTG10. Гетерозиготність, що спостерігалась (Hobs), та гетерозиготність, що очікувалась (Hexp), коливались від 0,60 (CA425 та HMS03) до 0,96 (VHL20) та 0,585 (HTG04) до 0,908 (HTG10), відповідно, що свідчить про достатньо високий рівень гетерогенності досліджуваної популяції. Індекс поліморфізму (PIC) коливався від 0,482 (HTG04) до 0,879 (HTG10), тоді як вірогідність виключення випадкового збігу алелей (PE) складала від 0,291 (CA425 та HMS03) до 0,919 (VHL20). Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелей (CPE) становила 0,9999993, або 99,99993 %. Це свідчить про високий рівень інформативності обраної панелі мікросателітних маркерів для дослідження коней Української верхової породи.

Таблиця 2

Індекси гетерозиготності, поліморфізму та вірогідність виключення випадкового збігу алелей для мікросателітних маркерів коней УВП

Назва локусу	К-ть алелей	Hobs	Hexp	PIC	PE
HTG04	5	0,64	0,585	0,482	0,342
HMS 06	6	0,76	0,752	0,692	0,527
HMS 02	6	0,68	0,695	0,636	0,398
AHT04	8	0,84	0,689	0,625	0,675
ASB23	8	0,80	0,808	0,763	0,599
HTG07	5	0,76	0,667	0,601	0,527
HTG06	8	0,84	0,810	0,766	0,675
CA425	9	0,60	0,807	0,762	0,291
HTG10	12	0,92	0,908	0,879	0,836
VHL20	10	0,96	0,841	0,805	0,919
AHT05	8	0,72	0,781	0,738	0,460
HMS03	7	0,60	0,723	0,662	0,291
HMS07	9	0,80	0,831	0,792	0,599
ASB17	10	0,92	0,856	0,819	0,836
CPE					0,9999998

Слід зауважити, що результати визначення достовірності походження 13 лошат були повністю підтверджені із використанням панелі з 14 мікросателітних ДНК-маркерів в усіх випадках без виключень.

Висновки

Отримані данні свідчать про те, що для генетичного аналізу коней УВП найінформативнішими є 6 маркерів: ASB23, HTG06, HTG10, VHL20, HMS07 та ASB17 із

середніми показниками PIC — 0,804 та PE — 0,739. Використання лише цих 6 маркерів для генетичного аналізу коней УВП дозволяє проводити їхню ідентифікацію із вірогідністю 99,98 %, що перевищує вірогідність 99,95 %, рекомендовану Міжнародним комітетом родовідних книг (ISBC) для визначення достовірності походження племінних тварин [10].

Перспективи подальших досліджень. Визначення достовірності походження племінних коней за допомогою ДНК-маркерів є складовою генетичної експертизи, яка в свою чергу, згідно з Наказом № 197 Мін. АПК (від 1.06.2004 р.), є невід'ємною частинною племінної справи у тваринництві та проводиться з метою:

— контролю достовірності походження племінних тварин;

— ідентифікації тварин і забезпечення достовірності родоводів племінних тварин, що сприяє підвищенню ефективності методів селекції;

— виявлення племінних тварин, що є носіями генетичних аномалій, і вилучення їх із селекційного процесу.

V. Spyrydonov, A. Sheliov, S. Melnychuk, T. Ilnytska

PARENTAGE VERIFICATION OF UKRAINIAN RIDER HORSE BREED USING MICROSATELLITES DNA MARKERS

S u m m a r y

The present study was to evaluate a parentage verification system for Ukrainian Rider horse breed using 14 DNA markers. A total number of 40 Ukrainian Rider horse including 13 foals for parentage verification were genotyped. The microsatellite loci showed extensive polymorphism with allele numbers ranging from 5 to 12 and polymorphism information content (PIC) values in the range 0,482–0,879. The analysis of these loci also revealed that they had a 99,99993 % combined probability of exclusion (CPE) of false parentage. This study suggests that the DNA typing method has high potential for parentage testing and individual identification of Ukrainian Rider horse breed.

В. Г. Спиридонов, А. В. Шельов, С. Д. Мельничук, Т. Е. Ильницкая

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОСТОВЕРНОСТИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЛОШАДЕЙ УКРАИНСКОЙ ВЕРХОВОЙ ПОРОДЫ И МИКРОСАТЕЛИТНЫЙ АНАЛИЗ ДНК

А н н о т а ц и я

Работа посвящена определению достоверности происхождения лошадей Украинской верховой породы с использованием 14 ДНК-маркеров. В общей сложности 40 лошадей, включая 13 жеребят, были генотипированы. Проанализированные микросателитные локусы показали высокий уровень полиморфизма, количество идентифицированных аллелей колебалось от 5 до 12 с индексом полиморфизма (PIC) от 0,482 до 0,879. Кроме того, анализ локусов показал, что комбинированная вероятность случайного совпадения аллелей (CPE) составляла 99,99993 %. Данная работа показала, что использование выбранной панели ДНК-маркеров имеет высокий потенциал, как для определения достоверности происхождения, так и для индивидуальной идентификации лошадей Украинской верховой породы.

1. *Binns M. M.* The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing / Binns M. M., Uolmes N. G., Holliman A. M. // Brit. Vet. J. — 1995. — 151. — P. 9–15.

2. *Siegal M.* UC Davis Book of Horses : A Complete Medical Reference Guide for Horses and Foals / Siegal M. — Haper Collins, New York, 1996. — P. 126–134.

3. *Litt M.* A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene / Litt M., Luty J. A. // Am. J. Hum. Genet. — 1989. — 44. — P. 397–401.

4. *Weber J. L.* Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction / Weber J. L., May P. E. // Am. J. Hum. Genet. — 1989. — 44. — P. 388–396.

5. *Ellegren H.* Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse / Ellegren H., Johansson M., Sandberg K., Andersson L. // Anim. Genet. — 1992. — 23.— P. 133–142.

6. *Guerin G.* Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8 / Guerin G., Bertaud M., Amigues Y. // Anim. Genet. — 1994. — 25. — P. 62.

7. *Marklund S.* Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites / Marklund S., Ellegren H., Eriksson S. et all // Anim. Genet. — 1994. — 25. — P. 19–23.

8. *Van Haeringen H.* A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20 / van Haeringen H., Bowling A. T., Stott M. L. et all // Anim. Genet. — 1994. — 25. — P. 207.

9. *Marshall T. C.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations / Marshall T. C., Slate J., Kruuk L., Pemberton J. M. // Mol. Ecol. — 1998. — 7. — P. 639–655.

10. *Tozaki T.* Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci / Tozaki T., Kakoi H., Mashima S. // J. Vet. Med. Sci. — 2001. — 63. — P. 1191–1197.

Рецензент: провідний науковий співробітник лабораторії екологічної фізіології та якості продукції, кандидат біологічних наук, с. н. с. Хомин М. М.