

ЕФЕКТИВНІСТЬ ГЕНЕТИЧНОГО КОНТРОЛЮ ДОСТОВІРНОСТІ ПОХОДЖЕННЯ КОНЕЙ РІЗНИХ ПОРІД В УКРАЇНІ

О.В. МЕЛЬНИК, аспірантка*

В.В. ДЗІЦЮК, В.Г. СПИРИДОНОВ,

доктори сільськогосподарських наук

Досліджено популяції чистокровної верхової, української верхової та гуцульської порід коней за 12 мікросателітними локусами ДНК, рекомендованими ISAG. Для кожної популяції визначено кількість алелів на локус, фактичну та теоретично очікувану гетерозиготність, рівень інформативності кожного локусу. Виявилось, що в усіх популяціях спостерігається загальна тенденція щодо зростання кількості гомозиготних генотипів. Встановлено, що одні і ті ж самі мікросателітні локуси мають різну інформативність для різних порід коней. Найефективнішим запропонований набір мікросателітних локусів виявився для гуцульської породи, а найменш ефективним – для чистокровної верхової.

***Ключові слова:** експертиза походження, мікросателітний локус, алель, чистокровна верхова порода, українська верхова порода, гуцульська порода.*

Генетична експертиза походження є обов'язковим елементом ідентифікації для племінних коней. Відповідно до «Положення про порядок проведення генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин», вона складається з імуногенетичних досліджень, цитогенетичного контролю і тестування тварин за ДНК-маркерами [4]. Порядок проведення тестування за ДНК-маркерами у тваринництві, визначено в «Інструкції з проведення тестування племінних тварин за ДНК-маркерами» [3].

*Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук В.В. Дзіцюк

Генетична експертиза походження коней свідчить, що помилки в родоводах з різних причин зустрічаються в середньому у 1,9 – 2,8% коней.

Це суттєво впливає на їхню оцінку через хибне уявлення про генеалогічну структуру і затримує темпи удосконалення породи. Встановлено, що кожний відсоток помилкових записів у родоводах знижує ефективність селекції у 1,5 – 1,7 раза [7]. Донедавна основним методом підтвердження походження у конярстві були системи груп крові. Проте останнім часом вимоги до проведення експертизи походження племінних коней підвищилися і всі генетичні лабораторії переходять на їх тестування за мікросателітами ДНК. Дослідження Л.А. Храбрової показали, що у коней рівень поліморфізму мікросателітних локусів у понад 1,5 раза вищий, ніж поліморфних систем груп крові [8]. До панелі маркерів, які використовують для контролю походження коней, відбирають найбільш інформативні із стабільним успадкуванням та без прояву ефекта «нульових» алелів. Роботу із стандартизації панелі мікросателітних локусів ДНК для експертизи походження коней під наглядом Міжнародного товариства генетики тварин (ISAG) було розпочато у 1996 році. До стандартної панелі увійшло 9 маркерів: АНТ04, АНТ05, АSB02, НMS03, НMS06, НMS07, НTG10, НTG04, VHL20. З 1 січня 2011 року до цього переліку було додано ще три додаткові мікросателітні локуси: АSB17, АSB23, НMS02. Проте комерційний набір реактивів для контролю походження коней StockMarks for Horses (Applied Biosystems) включає ще п'ять мікросателітів [8]. Таким чином, загальна кількість мікросателітних локусів ДНК у розширеній панелі становить 17.

В Українській лабораторії якості і безпеки продукції АПК, з 2003 року, розпочато дослідження коней за мікросателітними локусами ДНК, рекомендованими ISAG [5, 6, 2].

Мета дослідження – вивчити ефективність використання мікросателітних локусів ДНК для проведення генетичної експертизи «Наукові доповіді НУБіП» 2013-4 (40) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2013_4/9.pdf

походження коней української верхової, чистокровної верхової та гуцульської порід та визначити найбільш ефективні локуси для кожної з них.

Матеріал і методика досліджень. Роботу проводили на базі науково-дослідного відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК у 2012 – 2013 роках. Матеріалом слугували 143 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 із консервантом EDTA. Геномну ДНК виділяли, використовуючи набори «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Росія) згідно з інструкцією виробника. Для здійснення генетичного аналізу використали 12 мікросателітних локусів ДНК, які входять до переліку рекомендованих ISAG для індивідуальної ідентифікації та підтвердження достовірності походження коней: АНТ04, АНТ05, ASB17, ASB23, СА425, HMS03, HMS06, HMS07, НТГ04, НТГ06, НТГ07, VHL20. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за стандартних умов [1]. 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.

Кількість алелів на локус (N_a) визначали прямим підрахунком отриманих даних, фактичну (N_o) та теоретично очікувану (N_e) гетерозиготність, вірогідність виключення випадкового збігу алелів (P_E) обраховували, використовуючи програмне забезпечення Cervus 3.0.3 [11] та PowerStatsV12 (Promega).

Результати дослідження та їх обговорення. Ефективність генетичної експертизи походження коней залежить від кількості використовуваних локусів та рівня поліморфності кожного з них. У результаті проведених досліджень було ідентифіковано 287 алелів, при цьому в кожній породі їх кількість

«Наукові доповіді НУБіП» 2013-4 (40) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2013_4/9.pdf

виявилась майже однаковою: в чистокровній верхової – 94, української верхової – 98, гуцульської – 95 (табл. 1). Кількість виявлених алелів у коней гуцульської породи коливалася від 6 (ASB17, HMS07) до 10 (АНТ05) і в середньому становила 7,917. У чистокровній верхової породи середня кількість алелів на локус була дещо нижчою (7,883), ніж у гуцульської (7,917), проте вищою порівняно з українською верховою породою (6,556). Найбільш поліморфними в коней чистокровній верхової та української верхової породи виявилися локуси ASB23 (13 алелів) та ASB17 (11 алелів), а найменш поліморфними – локуси НТG04 (5 алелів), ASB23, HMS07 та НТG04 (6 алелів).

1. Кількість виявлених алелів (Na), фактична (Ho) та теоретично очікувана (He) гетерозиготність коней чистокровній верхової, української верхової та гуцульської порід

Локус	Порода								
	Чистокровна верхова			Українська верхова			Гуцульська		
	Na	Ho	He	Na	Ho	He	Na	Ho	He
АНТ04	9	0,765	0,858	9	0,706	0,765	9	0,868	0,827
АНТ05	6	0,647	0,750	7	0,735	0,783	10	0,816	0,791
ASB17	8	0,706	0,808	11	0,882	0,863	6	0,816	0,696
ASB23	13	0,824	0,841	6	0,735	0,776	8	0,816	0,833
CA425	7	0,314	0,483	9	0,529	0,631	7	0,789	0,786
HMS03	10	0,588	0,710	8	0,676	0,814	8	0,553	0,785
HMS06	7	0,647	0,620	8	0,794	0,833	9	0,947	0,850
HMS07	8	0,765	0,826	6	0,794	0,802	6	0,553	0,675
НТG04	5	0,588	0,673	6	0,618	0,687	8	0,842	0,834
НТG06	7	0,608	0,557	8	0,676	0,696	9	0,711	0,718
НТG07	7	0,647	0,725	7	0,471	0,792	7	0,526	0,766
VHL20	7	0,725	0,760	13	0,882	0,877	8	0,842	0,850
Середнє значення	7,833 ± 0,601	0,652 ± 0,038	0,718 ± 0,034	6,556 ± 0,444	0,708 ± 0,036	0,777 ± 0,021	7,917 ± 0,358	0,757 ± 0,040	0,784 ± 0,017

У чистокровній верхової породи значення фактичної гетерозиготності коливалася в межах 0,314 (CA425) – 0,824 (ASB23), а теоретично очікуваної

гетерозиготності – від 0,483 (СА425) до 0,858 (АНТ04). В української верхової та гуцульської порід максимальний показник H_o був зафіксований за локусами ASB17, VHL20 (0,882) та HMS06 (0,947). Мінімальні значення H_o для цих же порід відзначали за НТG07 – відповідно 0,471 та 0,526. Теоретично очікувана гетерозиготність в української верхової породи була в межах 0,631 (СА425) – 0,877 (VHL20), а в гуцульської – 0,675 (HMS07) – 0,850 (HMS06 та VHL20).

Порівняння середніх показників фактичної та теоретично очікуваної гетерозиготності дозволило проаналізувати генетичні процеси, що відбуваються в популяціях. З'ясовано, що в усіх досліджуваних популяціях спостерігається переважання гомозиготних генотипів над гетерозиготними, що, з одного боку, може сприяти консолідації породи, а з другого – зменшенню її генетичної різноманітності.

На основі інформативності розраховали ефективність контролю походження за Jamison [10] для кожного локусу. Найменш ефективним при підтвердженні достовірності походження коней виявився локус НТG07 (0,242), а найбільш ефективним – VHL20 (0,636).

Загалом усі досліджувані мікросателітні локуси за середнім значенням вірогідності виключення випадкового збігу алелів (CPE) можна умовно розділити на три групи, в яких цей показник поступово зростає (рис. 1). До першої групи (найменш ефективних) увійшли локуси НТG07, СА425, HMS03 (0,242 – 0,303), до другої групи (середня ефективність) – НТG06, HMS07, НТG04, АНТ05 (0,379 – 0,485), до третьої групи (найефективніших) – АНТ04, ASB23, ASB17, HMS06, VHL20 (0,568 – 0,636).

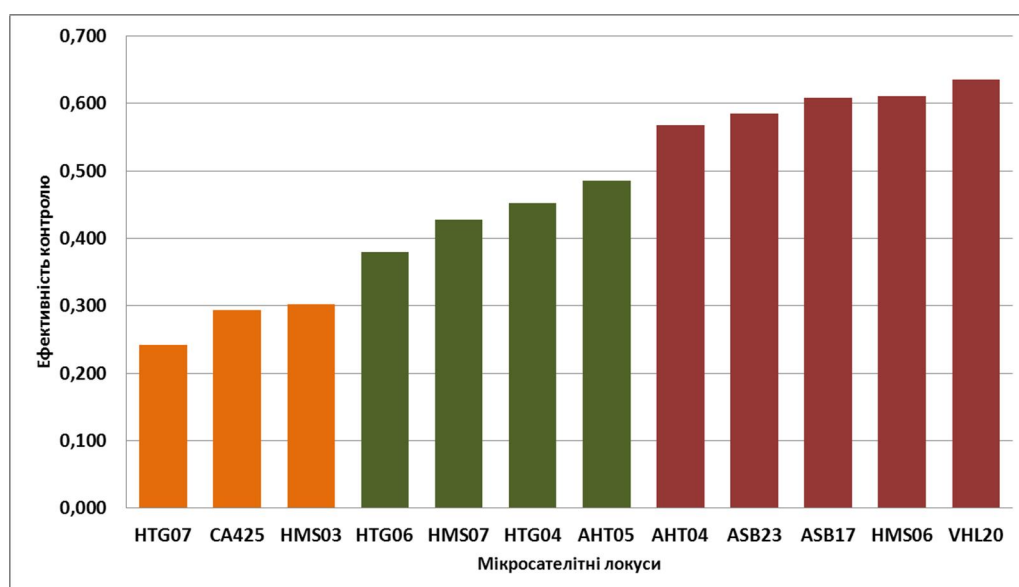


Рис. 1. Середні значення ефективності контролю походження досліджуваного поголів'я коней за 12 мікросателітними локусами ДНК

Для кожної породи коней виявили специфічні особливості певних мікросателітних локусів при проведенні контролю походження (табл. 2).

2. Ефективність контролю походження (PE) досліджуваних порід коней за 12 мікросателітними локусами ДНК

Локус	Чистокровна верхова	Українська верхова	Гуцульська
АНТ04	0,535	0,437	0,731
АНТ05	0,342	0,485	0,629
ASB17	0,437	0,760	0,629
ASB23	0,643	0,485	0,629
CA425	0,114	0,188	0,580
HMS03	0,277	0,393	0,238
HMS06	0,351	0,588	0,893
HMS07	0,535	0,510	0,238
HTG04	0,277	0,313	0,769
HTG06	0,300	0,393	0,445
HTG07	0,351	0,163	0,212
VHL20	0,469	0,760	0,679
Ефективність контролю для 12 локусів (CPE)	0,997927	0,999701	0,999988

Для чистокровної верхової породи найбільш інформативним виявився локус ASB23 (0,643), дещо нижчий рівень мали одразу два локуси – АНТ04 та HMS7 (0,535). В українській верховій породі найбільшу ефективність при проведенні експертизи походження показали локуси ASB17 та VHL20 (0,760), дещо нижчим цей рівень був для HMS06. Проте у коней гуцульської породи він виявився найінформативнішим (ефективність контролю походження 0,893). У чистокровної верхової та української верхової порід найменш ефективним був локус СА425 (0,114 та 0,188, відповідно), а в гуцульських коней – НТГ07 (зі значенням СРЕ 0,212).

Для кожної з порід ефективність контролю за одним і тим самим локусом значно відрізнялася (рис. 2). Наприклад, інформативність локусу СА425 у гуцульської породи становила понад 0,500, а для чистокровної верхової та української верхової порід менше за 0,200. Ефективність використання локусу НТГ04 в коней гуцульської породи була майже 0,800, тоді як у двох інших досліджуваних порід до 0,300.

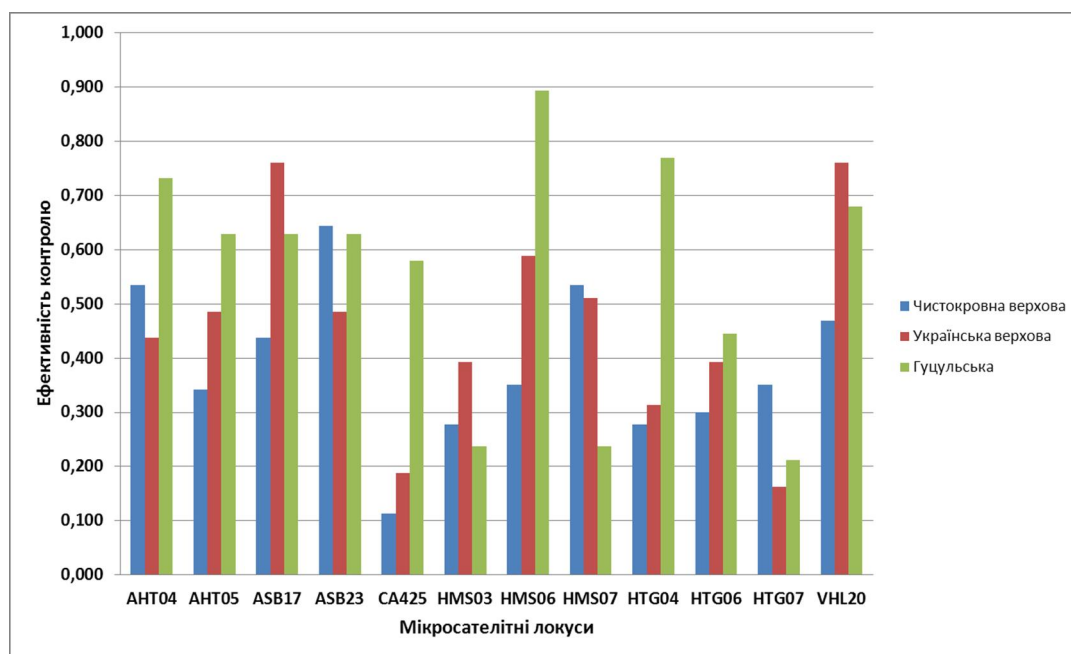


Рис. 2. Ефективність проведення експертизи походження досліджуваних порід коней за мікросателітними локусами ДНК

Аналізуючи загальну ефективність контролю походження за 12 мікросателітними локусами, встановлено, що найвищою вона виявилася для гуцульської (0,9999, або 99,99%) та української верхової (0,9997, або 99,97%) порід. Для чистокровної верхової цей показник був нижчим 99,95%, який рекомендований Міжнародним комітетом з племінних книг (ISBC) для визначення достовірності походження племінних тварин. Тобто, для кожної з порід одні й ті самі мікросателітні локуси мають різну інформативність. Для кожної породи визначили комбіновану вірогідність виключення випадкового збігу алелів за використання різної кількості локусів, починаючи з локусу з найвищим значенням PE. У коней чистокровної верхової породи найефективнішими (із значенням PE понад 0,400) при проведенні генетичного аналізу виявилось п'ять локусів: ASB23, АНТ04, HMS07, VHL20 та ASB17 (табл. 3). Проте навіть увесь використаний набір мікросателітів не забезпечив достатнього рівня достовірності генотипування.

3. Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелів у коней чистокровної верхової породи залежно від кількості локусів

Локус	Кількість локусів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ASB23	0,643	0,643	0,643	0,643	0,643	0,643	0,643	0,643	0,643	0,643	0,643	0,643
АНТ04		0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535
HMS07			0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535	0,535
VHL20				0,469	0,469	0,469	0,469	0,469	0,469	0,469	0,469	0,469
ASB17					0,437	0,437	0,437	0,437	0,437	0,437	0,437	0,437
HMS06						0,351	0,351	0,351	0,351	0,351	0,351	0,351
HTG07							0,351	0,351	0,351	0,351	0,351	0,351
АНТ05								0,342	0,342	0,342	0,342	0,342
HTG06									0,3	0,3	0,3	0,3
HMS03										0,277	0,277	0,277
HTG04											0,277	0,277
СА425												0,114
CPE	0,6430	0,8340	0,9228	0,9590	0,9769	0,9850	0,9903	0,9936	0,9955	0,9968	0,9977	0,9979

Для української верхової породи значення PE понад 0,400 мали локуси: ASB17, VHL20, HMS06, HMS07, АНТ05, ASB23 та АНТ04, які разом

забезпечили рівень достовірності генотипування 99,83%. Для досягнення рівня 99,95%, рекомендованого ISBC, необхідним виявилось використання ще трьох локусів – HMS03, HTG06 та HTG04 (табл. 4).

4. Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелів у коней української верхової породи залежно від кількості локусів

Локус	Кількість локусів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ASB17	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760
VHL20		0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760
HMS06			0,588	0,588	0,588	0,588	0,588	0,588	0,588	0,588	0,588	0,588
HMS07				0,510	0,510	0,510	0,510	0,510	0,510	0,510	0,510	0,510
АНТ05					0,485	0,485	0,485	0,485	0,485	0,485	0,485	0,485
ASB23						0,485	0,485	0,485	0,485	0,485	0,485	0,485
АНТ04							0,437	0,437	0,437	0,437	0,437	0,437
HMS03								0,393	0,393	0,393	0,393	0,393
HTG06									0,393	0,393	0,393	0,393
HTG04										0,313	0,313	0,313
CA425											0,188	0,188
HTG07												0,163
CPE	0,7600	0,9424	0,9763	0,9884	0,9940	0,9969	0,9983	0,9989	0,9994	0,9996	0,9996	0,9997

У гуцульської породи для досягнення CPE 99,97% достатнім виявилось використання лише шести локусів (HMS06, HTG04, АНТ04, VHL20, АНТ05, ASB17). Застосування решти мікросателітів майже не впливало на зростання значення цього показника (табл. 5).

5. Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелів у коней гуцульської породи залежно від кількості локусів

Локус	Кількість локусів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
HMS06	0,893	0,893	0,893	0,893	0,893	0,893	0,893	0,893	0,893	0,893	0,893	0,893
HTG04		0,769	0,769	0,769	0,769	0,769	0,769	0,769	0,769	0,769	0,769	0,769
АНТ04			0,731	0,731	0,731	0,731	0,731	0,731	0,731	0,731	0,731	0,731
VHL20				0,679	0,679	0,679	0,679	0,679	0,679	0,679	0,679	0,679
АНТ05					0,629	0,629	0,629	0,629	0,629	0,629	0,629	0,629
ASB17						0,629	0,629	0,629	0,629	0,629	0,629	0,629
ASB23							0,629	0,629	0,629	0,629	0,629	0,629
CA425								0,580	0,580	0,580	0,580	0,580

HTG06									0,445	0,445	0,445	0,445
HMS03										0,238	0,238	0,238
HMS07											0,238	0,238
HTG07												0,212
CPE	0,8930	0,9753	0,9934	0,9979	0,9992	0,9997	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

Як показали проведені дослідження, визначення найефективніших мікросателітних локусів для кожної породи коней дозволяє підвищити рівень достовірності генетичного аналізу та одночасно скоротити витрати на його проведення. У випадку з гуцульською породою зменшення кількості мікросателітних локусів до шести майже не знижує ефективності генетичної експертизи походження, проте дозволяє удвічі скоротити вартість її проведення. Надалі перспективним є дослідження більшого поголів'я коней цих порід з метою точнішого визначення найефективніших мікросателітних локусів ДНК для проведення генетичного аналізу.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що в досліджуваних популяціях спостерігається переважання гомозиготних генотипів над гетерозиготними.

2. Використання панелі з 12 мікросателітів показало, що для різних порід коней мікросателітні локуси ДНК мають різну інформативність.

3. У гуцульській породі щоб забезпечити інформативність 99,95%, рекомендованого ISBC для визначення достовірності походження племінних тварин, достатньо всього 6 локусів (АНТ04, ASB17, ASB23, HMS06, HTG04 та VHL20), для української верхової – 10 (ASB17, VHL20, HMS06, HMS07, АНТ05, ASB23 та АНТ04, HMS03, HTG06 та HTG04), у той час як для чистокровної верхової породи наявної кількості виявилось недостатньо. У подальшому перспективним є її дослідження за додатковими інформативними мікросателітними локусами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Генетична ідентифікація та експертиза походження свійських коней (*Equus caballus*) мікросателітними фрагментами дезоксирибонуклеїнової кислоти. (Методичні рекомендації) / [В.Г. Спиридонов, А.В. Шельов, К.В. Кухтіна та ін.]. – К.: Видавничий центр НУБіП України, 2010. – 20 с.
2. Генотипування коней української верхової породи з використанням панелі SSR-маркерів / Шельов А.В., Спиридонов В.Г., Парій М.Ф. [та ін.] // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2009. – Том 7, №2. – С. 257 – 261.
3. Інструкція з проведення тестування племінних тварин за ДНК-маркерами // Офіційний вісник України. – 2004. – № 24. – С. 301
4. Положення про порядок проведення генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин // Нормативні документи з проведення генетичної експертизи племінних тварин. – К.: ППНВ, 2006. – С. 24 – 36.
5. Спиридонов В.Г. Визначення достовірності походження коней української верхової породи та мікросателітний аналіз ДНК / В.Г. Спиридонов, А.В. Шельов, С.Д. Мельничук [та ін.] // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11, № 1 – 2. – С. 265 – 269.
6. Спиридонов В.Г. Генетичний аналіз гуцульських коней за мікросателітними локусами / В.Г. Спиридонов, А.В. Шельов, К.В. Кухтіна [та ін.] // Тваринництво України. – 2011. – № 4. – С. 15 – 18.
7. Храброва Л.А. Генетический метод контроля происхождения лошадей [Электронный ресурс] / Храброва Л.А. – Режим доступа: <http://www.ruhorses.ru/genetic/genetic.html>.
8. Храброва Л.А. Теоретические и практические аспекты генетического мониторинга в коневодстве: автореф. дисс. на соискание ученой степени докт. с.-х. наук спец. 06.02.07 «Разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных» / Храброва Л. А. – Дивово, 2011. – 38 с.

9. Dimsoski P. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses / P. Dimsoski // Forensic Sciences. – 2003. – Vol. 44, No. 3. – P. 332 – 335.

10. Jamison A.A. The genetics of transferrin in cattle / A.A. Jamison // Journal of Heredity. – 1965. – Vol. 20, No. 3. – P. 419 – 441

11. Kalinowski S.T. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment / S.T. Kalinowski, M.L. Taper, T.C. Marshall // Molecular Ecology. – 2007. – Vol. 16, No. 5. – P. 1099 – 1106.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ДОСТОВЕРНОСТИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЛОШАДЕЙ РАЗНЫХ ПОРОД В УКРАИНЕ

О.В. Мельник, В.В. Дзицюк, В.Г. Спиридонов

Исследованы популяции чистокровной верховой, украинской верховой и гуцульской пород лошадей по 12 микросателлитным локусам ДНК, рекомендованным ISAG. Для каждой популяции определены количество аллелей на локус, фактическая и теоретически ожидаемая гетерозиготность, уровень информативности каждого локуса. Установлено, что во всех популяциях наблюдается общая тенденция роста количества гомозиготных генотипов. Доказано, что одни и те же микросателлитные локусы имеют разную информативность для разных пород лошадей. Самым эффективным оказался предложенный набор микросателлитных локусов для гуцульской породы, а наименее эффективным – для чистокровной верховой.

***Ключевые слова:** экспертиза происхождения, микросателлитный локус, аллель, чистокровная верховая порода, украинская верховая порода, гуцульская порода.*

EFFECTIVENESS OF GENETIC CONTROL OF PARENTAGE VERIFICATION OF DIFFERENT HORSE BREEDS IN UKRAINE

O.V. Melnyk, V.V. Dzitsiuk, V.G. Spyrydonov

The populations of Thoroughbred, Ukrainian Rider and Hucul horse breeds using 12 microsatellite DNA loci recommended by ISAG were studied. For each population defined number of alleles per locus, observed and expected heterozygosity and informativeness of each locus. In all populations there was a general trend of increasing number of homozygous genotypes. The same microsatellite loci have different information content for different horse breeds. The most effective selected set of microsatellite loci was for Hucul breed and the least effective – for Thoroughbred horse.

Keywords: *parentage verification, microsatellite locus, allele, Thoroughbred breed, Ukrainian Rider breed, Hucul breed.*