

1. – С. 130-133.

8. Плешаков, В. А. Влияние сроков хранения криоконсервированной спермы быков-производителей на её качество : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.04 / Плешаков В.А. – Барнаул, 2006. – 21 с.

9. Dinnyes, A. Novel gamete storage / A. Dinnyes, J. Liu, T. L. Nedambale // Reproduction, Fertility and Development. – 2007. – № 19. – P. 719-731.

10. Плохинский, Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский. – М. : Колос, 1969. – 256 с.

(поступила 16.03.2015 г.)

УДК 636.1.082:575

О.В. МЕЛЬНИК¹, В.Г. СПИРИДОНОВ¹, В.В. ДЗИЦЮК²

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЛОШАДЕЙ ЧИСТОКРОВНОЙ ВЕРХОВОЙ ПОРОДЫ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ ДНК

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования
Украины

²Институт разведения и генетики животных имени М.В. Зубца НААН
Украины

Проведена оценка уровня полиморфизма 7 микросателлитных локусов в украинской, румынской и корейской популяциях лошадей чистокровной верховой породы. Установлено, что наиболее похожими в генетическом плане являются румынская и корейская популяции. Самый высокий уровень полиморфизма наблюдался в украинских чистокровных верховых лошадях.

Ключевые слова: чистокровная верховая порода лошадей, микросателлиты ДНК, аллель, гетерозиготность.

O.V. MELNYK¹, V.G. SPYRYDONOV¹, V.V. DZITSIUK²

GENETIC DIVERSITY EVALUATION OF HORSE POPULATIONS OF THOROUGHBRED ROADSTER BREED BY MEANS OF DNA MARKERS

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

²The Institute of Animals Breeding and Genetics named after M.V. Zubets
of National Academy of Agrarian Science of Ukraine

The evaluation of polymorphism of 7 microsatellites loci of Ukrainian, Romanian and Korean populations of Thoroughbred horses was Carried out. It was determined that the most similar from the point of view of genetics were Romanian and Korean populations. The highest level of polymorphism was determined for Ukrainian Thoroughbred horses.

Key words: thoroughbred roadster horse breed, microsatellites of DNA, allele, heterozygosity.

Введение. С каждым годом проблема сохранения генетического разнообразия разводимых животных в составе окружающей среды приобретает всё большее значение. Основными причинами сокращения разнообразия генетических ресурсов животноводства являются активная интенсификация производства, постепенное вытеснение местных пород более продуктивными, широкое использование искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов [1]. В сохранении генетического разнообразия разводимых животных особое значение приобретает рациональное использование племенных ресурсов животноводства, которое включает оценку статуса пород или популяций и необходимости их сохранения. На региональном уровне актуальными являются исследования и анализ разнообразия пород и популяций с использованием ДНК-технологий, выявление ценных генетических комплексов и т. д. [2]. Поддержка указанного генетического разнообразия является необходимым условием для творческой селекционной работы. Одной из составляющих перспективных селекционных программ сохранения является генетическое исследование популяций с целью сохранения высокого уровня генетической изменчивости и низкого уровня инбридинга [3, 4]. Так, результаты исследований Silva и др. [5] свидетельствуют о том, что потеря генетического разнообразия в пяти природных породах лошадей Бразилии стала результатом близкородственного размножения в малых популяциях и использования экзотических пород.

Чистокровная верховая порода лошадей является вершиной мирового коннозаводства. Родиной породы является Англия, где в XVII – начале XVIII вв. активно велась работа над её созданием. Родоначальниками считаются три жеребцы – Мэтчем (1748), Херод (1758) и Эклипс (1764). Весь период создания и совершенствования породы связан с постоянными испытаниями лошадей в скачках. Первый том племенной книги (студбук) был выдан в 1793 году. В него вошёл приплод от трёх указанных выше жеребцов-родоначальников и пятидесяти кобыл-родоначальниц. С этого времени порода стала закрытой, и ни одна лошадь, которая происходила от незаписанных в этот том предков, не могла считаться чистокровной верховой. Сейчас племенные книги ведут по единым правилам в каждой стране, где занимаются разведением этой породы. Эту работу контролирует Международный комитет по племенным книгам (ISBC).

Единственным методом разведения в породе является чистопородное. С одной стороны, оно позволяет закрепить ценные генетические комплексы в породе, а с другой – способствует накоплению мутантных аллелей [6]. В результате длительного использования чистопородного разведения может повышаться уровень инбридинга, что приводит к

возрастанию уровня гомозиготности. Поэтому строгий контроль происхождения лошадей и контроль за уровнем гомозиготности популяции необходимы для успешной племенной работы с чистокровной верховой породой лошадей.

В середине 80-х годов с целью генетического контроля происхождения лошадей и мониторинга генетической ситуации в популяциях в странах с развитым коневодством использовали наследственный полиморфизм белков и групп крови. На сегодня самым эффективным методом проведения генетической экспертизы происхождения является применение ДНК-технологий, в частности микросателлитов ДНК (STR), которые характеризуются кодоминантным характером наследования и высоким уровнем полиморфизма. Многочисленные исследования свидетельствуют об эффективности использования STR-маркеров не только в подтверждении подлинности происхождения, но и в генетическом анализе популяций [7]. В соответствии с рекомендациями Международного общества генетики животных (ISAG) и требованиями Международного комитета по племенным книгам (ISBC) большинство лабораторий перешло на экспертизу происхождения по микросателлитным ДНК-маркерами [8]. ISAG определено 9 основных микросателлитов (АНТ04, АНТ05, АСВ02, НМС03, НМС06, НМС07, НТГ04, НТГ10, ВНЛ20) в качестве международной стандартной панели [9, 10, 11]. Начиная с 2001 года, согласно новым требованиям ISAG и ISBC, генетические лаборатории обязаны проводить тестирование чистокровных лошадей по микросателлитным локусам ДНК.

В наши дни чистокровную верховую породу разводят во многих странах мира – США, Франции, Ирландии, Австралии, Новой Зеландии, Румынии, Словакии и других. Хотя мировым центром с разведения породы остаётся Великобритания, каждая страна имеет свои особенности работы с породой.

Целью проведения наших исследований была оценка генетического разнообразия лошадей чистокровной верховой породы украинской, румынской и корейской популяций.

Материал и методика исследований. Исследование украинской популяции чистокровной верховой породы лошадей ($n = 51$) проводили на базе отдела молекулярно-диагностических исследований Украинской лаборатории качества и безопасности продукции АПК. Периферическую кровь у животных для исследований отбирали с яремной вены с помощью вакуумной системы Vacutest (с консервантом EDTA) в количестве 6 мл.

Геномную ДНК выделяли из цельной крови, используя набор «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», Россия), согласно инструкции производителя. Согласно рекомендациям ISAG, для анализа были выбраны 7

микросателлитных локусов (HTG04, HMS06, АНТ04, VHL20, АНТ05, HMS03, HMS07). Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Veriti 96-Well (Applied Biosystems, США) при следующих параметрах: 1 этап – начальная денатурация (95 °С – 10 мин.), 2 этап – 30 циклов (95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин.). Заключительный 3 этап (72 °С) длился 60 мин. [12]. Продукты амплификации денатурировали формамидом (Sigma, США) и проводили электрофорез на автоматическом 4-капиллярном генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Размеры аллелей определяли используя размерный стандарт Genescan-LIZ 500 (Applied Biosystems, США) и программное обеспечение «Gene Mapper 3.7» (Applied Biosystem, США).

Во время проведения популяционно-генетического анализа определяли следующие показатели: частоты аллелей, количество аллелей в локусе (N_a), наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготности, индекс фиксации (F). Статистическую обработку данных проводили, используя программное обеспечение Cervus 3.0.3, GENALEX 6.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Для характеристики генетического разнообразия украинской популяции лошадей чистокровной верховой пород были использованы собственные данные, а для характеристики румынской и корейской популяций – литературные данные [13, 14].

Наибольшее количество аллелей выявили в локусе HMS03 – 10, 7 и 8, соответственно. Наиболее полиморфной среди исследованных по среднему количеству аллелей в локусе оказалась украинская популяция лошадей (в среднем 7,43 аллеля), тогда как румынская продемонстрировала максимальную консолидацию (таблица 1).

Среди трёх исследуемых популяций лошадей в состоянии, максимально приближенном к состоянию генетического равновесия согласно закона Харди-Вайнберга, по локусу АНТ04 находились румынская и корейская популяции, а по локусу VHL20 – корейская. Наибольшая разница между значениями наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности у чистокровных верховых лошадей Украины и Южной Кореи установлена по локусу HMS03, Румынии – по АНТ05.

В результате анализа индекса фиксации, который характеризует уровень инбридинга в популяции, установлено, что в украинской популяции по всем локусам, кроме HMS06, наблюдается дефицит гетерозиготных генотипов. Максимальное значение этого показателя зафиксировано по локусу HMS03 (17,2 %), в то время как у лошадей чистокровной верховой породы Румынии по этому же локусу, наоборот, наблюдали максимальный избыток гетерозигот (13,9 %). Дефицит гетерозигот способствует повышению генетической консолидации по-

пуляции и одновременно уменьшению генетического разнообразия. В украинской популяции чистокровных верховых лошадей только в локусе HMS06 наблюдали наличие избытка гетерозигот, тогда как в двух других популяциях – по четырём исследуемым локусам.

Таблица 1 – Сравнительный анализ основных популяционно-генетических показателей украинской, румынской и корейской популяций лошадей чистокровной верховой породы по микросателлитным локусам

Страна	Показатель	Локус							Среднее значение
		АНТ 04	АНТ 05	HMS 03	HMS 06	HMS 07	HTG 04	VHL 20	
Украина (n=51)	Na	9	6	10	7	8	5	7	7,43± 0,701***
	Ho	0,765	0,647	0,588	0,647	0,765	0,588	0,725	0,675± 0,0314***
	He	0,858	0,750	0,710	0,620	0,818	0,673	0,760	0,741± 0,0335***
	F	0,108	0,137	0,172	-0,044	0,065	0,126	0,046	0,087± 0,0294*
Румыния (n=80)	Na	4	5	7	4	5	4	4	4,86± 0,454***
	Ho	0,723	0,556	0,787	0,681	0,787	0,596	0,681	0,687± 0,0361***
	He	0,729	0,744	0,691	0,616	0,733	0,552	0,729	0,685± 0,0299***
	F	0,008	0,253	-0,139	-0,106	-0,074	-0,080	0,066	-0,010± 0,0533
Южная Корея (n=1224)	Na	5	5	8	5	5	5	5	5,43± 0,463***
	Ho	0,729	0,703	0,609	0,622	0,790	0,544	0,735	0,676± 0,0353***
	He	0,721	0,676	0,644	0,624	0,765	0,539	0,735	0,672± 0,0315***
	F	-0,011	-0,040	0,054	0,003	-0,033	-0,009	0	-0,005± 0,0125

Примечания: * – P<0,05, *** – P<0,001

В целом по семи исследуемым микросателлитным локусам в состоянии максимального генетического равновесия находились сразу две популяции лошадей – румынская и корейская, в которых установлен незначительный избыток гетерозиготных генотипов. В то же время в украинской популяции лошадей чистокровной верховой породы, в отличие от двух предыдущих, наоборот, наблюдали дефицит гетерозигот на уровне 8,7 %, что свидетельствует о тенденции популяции к возрастанию уровня гомозиготности.

Заключение. Результаты проведённых исследований свидетель-

ствуют о том, что среди исследованных популяций украинская популяция лошадей чистокровной верховой породы является наиболее полиморфной по количеству выявленных аллелей. В то же время, в отечественной популяции лошадей, в отличие от двух иностранных, находящихся в состоянии, близком к состоянию генетического равновесия, по большинству локусов установлен дефицит гетерозиготных генотипов. Дальнейшая работа с чистокровной верховой породой лошадей может проводиться различными путями, исходя из цели, которую перед собой ставит селекционер. Если основной задачей является консолидация породы, то целесообразно заниматься разведением породы в пределах одной страны или определённого хозяйства. Если целью является увеличение генетического разнообразия, то имеет смысл обмен племенным материалом между странами и хозяйствами.

Литература

1. Багиров, В. Генетические ресурсы животноводства / В. Багиров // Животноводство России. – 2008. – № 2. – С. 10-12.
2. Молекулярно-генетичні дослідження в галузі тваринництва / Б. С. Подоба [та ін.] ; за наук ред. акад. М. В. Зубця. – К. : Аграрна наука, 2013. – 248 с.
3. Кузнецов, В. М. Инбридинг в животноводстве: методы оценки и прогноза / В. М. Кузнецов. – Киров : НИИСХ Северо-Востока, 2000. – 66 с.
4. Frankham, R. Introduction to conservation genetics / R. Frankham, I. D. Ballou, D. A. Briscoe. – Cambridge : Cambridge University Press, 2003. – 607 p.
5. Genetic variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers / A. C. M. Silva [et al.] // Genetics and Molecular Research. – 2012. – Vol. 11, No. 2. – P. 881-890.
6. Кушнер, Х.Ф. Наследственность сельскохозяйственных животных / Х. Ф. Кушнер. – М. : Колос, 1964. – 487 с.
7. Блохина, Н. В. Молекулярно-генетические особенности субпопуляций лошадей чистокровной верховой породы / Н. В. Блохина, Л. А. Храброва // Коневодство и конный спорт. – 2012. – №4. – С. 13-15.
8. Храброва, Л. А. Эффективность контроля происхождения лошадей по полиморфным системам крови и микросателлитам ДНК / Л. А. Храброва // Коневодство и конный спорт. – 2012. – №2. – С. 7-9.
9. A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20 / H.Van Haeringen [et al.] // Animal Genetics. – 1994. – Vol. 25, № 3 – P. 207.
10. Guerin, G. Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8 / G. Guerin, M. Bertaud, Y. Amigues // Animal Genetics. – 1994. – Vol. 25, № 1. – P. 62.
11. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites / S. Marklund [et al.] // Animal Genetics. – 1994. – Vol. 25, № 1. – P. 19-23.
12. Dimsoski, P. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses / P. Dimsoski // Croatian Medical Journal. – 2003. – Vol. 44. – P. 332-335.
13. Choi, S. K. Individual identification of Thoroughbred horses and the Korean native horses based on microsatellite loci in Korea / S. K. Choi, S. Y. Lee, G. J. Cho // Journal of Animal and Veterinary Advances. – 2012. – Vol. 11 (15). – P. 2647-2651.
14. Microsatellites variations in Romanian Thoroughbred and Arabian horse populations / S. Georgescu [et al.] // Balkan scientific conference of Biology in Plovdiv (Bulgaria). – 2005. – P. 202-209.

(поступила 7.04.2015 г.)