

sturgeon aquaculture in Ukraine. *Rybohospodars'ka nauka Ukrayiny – Fisheries science of Ukraine*.4:4–22 (in Ukrainian).

8. Dudu A., S. E. Georgescu, A. Burcea, I. Florencu, and M. Costahe. 2013. Microsatellites Variation in Sterlet Sturgeon, *Acipenser ruthenus* from the Lower Danube. *J. Animal Science and Biotechnologies*. 46(1):90–94.

9. Lesyuk M. I., O. Yu. Koneva, E. A. Rovba, and A. M. Slukvin. 2012. Molekulyarno-geneticheskie issledovaniya proizvoditeley sterlyadi – Molecular genetic studies of manufacturers starlet, *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika – Molecular and Applied Genetics*. 13:110–117 (in Belarus).

10. Slukvin A. M., O. Yu. Koneva, and M. I. Lesyuk. 2009. Rezul'taty populyatsionnoy identifikatsii proizvoditeley sterlyadi (*Acipenser ruthenus*) OAO «Rybkhoz»Poles'e» (Brestskaya oblast', Belarus'), poluchennyye s pomoshch'yu mikrosatelitnogo analiza DNK – The results of the population identify manufacturers sturgeon (*Acipenser ruthenus*) JSC «Rybkhoz" Polesie "(Brest, Belarus), obtained using microsatellite DNA analysis, *Pervaya konferentsiya molodykh uchenykh NACEE. Voprosy akvakul'tury – The first conference of young scientists NACEE. Questions of aquacultur*:46–47 (in Russian).

11. Dudu A., R. Suci, M. Parashiv, S. E. Georgescu, M. Costahe, and P. Berrebi. 2011. Nuklear Markers of Danube Sturgeons Hybridization. *Melecular Sciences*. 12:6796–6809.

12. Chebanov M. S., and E. V. Galich. 2013. Rukovodstvo po iskusstvennomu vosproizvodstvu osetrovyykh ryb – Guidelines for the artificial reproduction of sturgeon, *Prodovol'stvennaya i sel'skokhozyaystvennaya organizatsiya OON – Food and Agriculture Organization of the OON*: 328.

13. May B., C. C. Krueger, H. L. Kincaid 1997. Genetic variability at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirinchus*. *Fish. Aquat Sci*. 54: 1542–1547.

14. Reznikova-Galashevich I. S., V. V. Stepura, A. V. Shelev, V. G. Spirydonov, P. P. Tabaka, S. D. Mel'nychuk, S. I. Alymov. 2011. Henetychna identyfikatsiya promyslovykh vydiv ryb: metodychni rekomendatsiyi – Genetic identification of commercial species: guidelines , *Vydavnychyy tsentr NUBiP Ukrayiny – Publishing center of NUBiP of Ukraine*:35 (in Ukrainian).

15. Marshall, T. C., J. Slate, L. Kruuk, and J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol.ecol*:639–655.



УДК УДК 636.162.082:575

ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ УКРАЇНСЬКОЇ МІКРОПОПУЛЯЦІЇ ШЕТЛЕНДСЬКИХ ПОНІ З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ДНК-МАРКЕРІВ

О. В. МЕЛЬНИК¹, В. В. ДЗІЦЮК², В. Г. СПИРИДОНОВ³

¹Національний університет біоресурсів та природокористування України (Київ, Україна)

²Інститут розведення і генетики тварин НААН (Чубинське, Україна)

³Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК (Чабани, Україна)
dzitsiuk@yandex.ua

Проведено визначення можливості використання стандартної панелі мікросателітних локусів ДНК для ідентифікації, підтвердження походження і популяційно-генетичної характеристики шетлендських поні. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили з

© О. В. Мельник, В. В. Дзіцюк, В. Г. Спиридонов, 2014

Розведення і генетика тварин. 2014. № 48

використанням 13 пар праймерів до мікросателітних локусів ДНК (AHT04, AHT05, ASB17, ASB23, CA425, HMS02, HMS03, HMS06, HMS07, HTG04, HTG06, HTG07, VHL20), рекомендованих ISAG для підтвердження достовірності походження коней. В результаті ДНК-типуювання 12 особин шетлендських поні доведена ефективність використання генетичного аналізу коней цієї породи за обраними мікросателітними маркерами. Середня кількість алелів на локус склала 4,692 і коливалася в межах від 3 (HTG07, VHL20) до 7 (ASB23). Переважна кількість локусів характеризувалася високим поліморфізмом зі значенням PIC понад 0,502, проте лише за 4 локусами (AHT04, ASB17, HTG07, VHL20) виявлено надлишок гетерозиготних генотипів. В цілому по виборці, дефіцит гетерозигот склав 13%. Встановлення генотипу тварин за 13 мікросателітними локусами забезпечило точність підтвердження походження коней із вірогідністю 99,93 %.

Ключові слова: шетлендські поні, мікросателіти, ДНК-маркери, поліморфізм, гетерозиготність

GENETIC ANALYSIS OF UKRAINIAN SUBPOPULATION OF SHETLAND PONY USING MICROSATELLITE DNA MARKERS

O. V. Melnyk¹, V. V. Dzitsiuk², V. G. Spirydonov³

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine (Kyiv, Ukraine)

²The Institute of Animals Breeding and Genetics (Chubynske, Ukraine)

³Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products (Chabany, Ukraine)

The possibility of the use of microsatellite loci of DNA for individual identification, parentage verification and population analysis of Shetland pony was determined. Polymerase chain reaction was conducted using 13 microsatellite loci of DNA (AHT04, AHT05, ASB17, ASB23, CA425, HMS02, HMS03, HMS06, HMS07, HTG04, HTG06, HTG07, VHL20), which are recommended of ISAG to conduct the parentage verification of horses. The results of DNA typing of 12 Shetland pony demonstrate the efficiency of the use of genetic analysis of this breed of horses using selected microsatellite markers. The average number of alleles per locus was 4,692 and ranged from 3 (HTG07, VHL20) to 7 (ASB23). The majority of loci were polymorphic with a value of PIC more than 0,502. Only 4 loci (AHT04, ASB17, HTG07, VHL20) found an excess of heterozygous genotypes. In general micropopulation deficit of heterozygotes was 13 %. The use of 13 microsatellite loci provided the efficiency of parentage verification 99,93 %.

Keywords: Shetland pony, microsatellites, DNA markers, polymorphism, heterozygosity

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УКРАИНСКОЙ МИКРОПОПУЛЯЦИИ ШЕТЛЕНДСКИХ ПОНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ

O. V. Melnyk¹, V. V. Dzitsiuk², V. G. Spirydonov³

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины (Киев, Украина)

²Институт разведения и генетики животных НААН (Чубинское, Украина)

³Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК (Чабаны, Украина)

Проведено определение возможности использования стандартной панели микросателлитных локусов ДНК для идентификации, подтверждения происхождения и популяционно-генетической характеристики шетлендских пони. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием 13 пар праймеров к микросателлитным локусам ДНК (AHT04, AHT05, ASB17, ASB23, CA425, HMS02, HMS03, HMS06, HMS07, HTG04, HTG06, HTG07, VHL20), рекомендованных ISAG для подтверждения достоверности происхождения коней. В результате ДНК-типирования 12 особей шетлендских пони доказана эффективность использования генетического анализа коней этой породы по

использованным микросателлитным маркерам. Среднее число аллелей на локус составило 4,692 и колебалось в пределах от 3 (HTG07, VHL20) до 7 (ASB23). Преобладающее количество локусов характеризовалось высоким полиморфизмом со значением PIC более 0,502, тогда как только по 4 локусам (AHT04, ASB17, HTG07, VHL20) выявлено избыток гетерозиготных генотипов. В целом по выборке, дефицит гетерозигот составил 13 %. Установление генотипа животных по 13 микросателлитным локусам обеспечило точность подтверждения происхождения лошадей с вероятностью 99,93 %.

Ключевые слова: шетлендские пони, микросателлиты, ДНК-маркеры, полиморфизм, гетерозиготность

Вступ. Поні (*Equus caballus*) вважаються низькорослим підвидом коней, який налічує, щонайменше, п'ять порід: шетлендські, шотландські, валійські, ексмурські поні, фалабелла. За Д. Сервер (1997) – шетлендські поні є однією з найстаріших порід коней [4]. Вважають, що вона походить з Шетлендських та Оркнейських островів, які знаходяться на північ від Шотландії. Формування цієї породи поні відбувалося в суворих умовах північного клімату та низької якості кормової бази, тому шетлендські поні є невибагливими до умов утримання та годівлі. Припускають, що ця порода походить від дрібних британських коней кельтського походження. Тривалий час шетлендські поні не користувалися попитом за межами Шетлендських островів. Виробничники звернули увагу на малих і витривалих поні лише у ХІХ столітті після заборони у 1847 році використання дитячої та жіночої праці у шахтах. З цього часу розпочався активний експорт поні шетлендської породи до Англії та інших країн. Наприкінці ХІХ століття маркіз Лондондеррі на острові Мейнленд заснував кінний завод із чистопородного розведення поні шетлендської породи. Першу племінну книгу коней цієї породи було створено у 1890 році в Англії.

Сьогодні попит на шетлендських поні пов'язаний із широким їх використанням для розваг дітей, у кінному спорті при навчанні верховій їзді, іпотерапії. Завдяки цьому спостерігається тенденція до збільшення поголів'я цієї породи. Проте, незважаючи на широке використання, у генетичному відношенні ця порода поні залишається недостатньо вивченою.

Метою досліджень було визначення можливості використання стандартної панелі микросателітних локусів ДНК, рекомендованої ISAG, для індивідуальної ідентифікації, підтвердження достовірності походження і популяційно-генетичної характеристики шетлендських поні.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для досліджень слугував біологічний матеріал від 12 голів шетлендських поні, яких розводять у навчально-науково-виробничій лабораторії конярства НУБіП України. Периферійну кров для проведення досліджень відбирали з яремної вени за допомогою вакуумної системи Vacutest. Проби крові транспортували при +4°C в термосі з льодом. Якщо виділення ДНК проводили не одразу після відбору проб, то пробірки з кров'ю заморожували та зберігали в морозильній камері за температури –20°C. Виділення геномної ДНК проводили за використання стандартного комерційного набору «ДНК сорб-В» (Амплісенс, Росія) згідно з інструкцією виробника.

Мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі Veriti 96-Well (Applied Biosystems, США) за стандартних умов, використовуючи микросателітні локуси, мічені флуоресцентною міткою, які входять до переліку рекомендованих ISAG для підтвердження достовірності походження коней: AHT04, AHT05, ASB17, ASB23, CA425, HMS02, HMS03, HMS06, HMS07, HTG04, HTG06, HTG07, VHL20 («Синтол», Росія) [3]. Електрофорез продуктів ампліфікації проводили на автоматичному 4-капілярному генетичному аналізаторі ABI Prism «3130 Genetic Analyzer» (Applied Biosystem, США). Розміри алелів визначали, використовуючи розмірний стандарт GeneScan™- 500 Liz™

(Applied Biosystems, США), програмне забезпечення Genescan[®] та GeneMapper[™] (Applied Biosystems, США).

Використовуючи програмне забезпечення MS Excel 2010, Cervus 3.0.3, GENALEX 6 [2], PowerStats V12 (Promega), визначено частоти алелів, кількість алелів на локус (Na), фактичну (No) та теоретично очікувану (Ne) гетерозиготність, індекс поліморфізму (PIC), індекс фіксації (F), ефективність контролю походження за кожним локусом (PE).

Результати досліджень. Генетичний аналіз 12 голів поні шетлендської породи проводили за 13 локусами мікросателітної ДНК. У цілому, в результаті проведеного генетичного аналізу досліджуваної мікропопуляції, було виявлено 61 алель (табл. 1).

За локусами АНТ04 та АНТ05 ідентифіковано по 4 алельні варіанти, з яких найчастіше виявляли алелі Н (АНТ04) та J (АНТ05) – з частотами 0,4167 та 0,5417, відповідно. З найменшою частотою за цими локусами (0,0417) зустрічалися алелі J (АНТ04) та О (АНТ05). Частота алелю F локусу ASB17 становила 0,3750, у той час як N та Q зустрічалися найрідше (з частотою 0,04). Локус ASB23 виявився найбільш поліморфним і був представлений 7 алельними варіантами. У чверті випадків за цим локусом ідентифікували алель V. З дещо меншою частотою виявляли алельний варіант U (0,2083). Мінімальну частоту відмічали одразу для двох алелів J та T – 0,0833.

За локусом СА425 з найбільшою частотою зустрічався алель F (0,3333). Дещо рідше ідентифікували алелі J (0,2917) та О (0,2083). Що стосується найменш поширеного алелю N

1. Частоти алелів мікросателітних локусів шетлендських поні

Алель	Локус												
	АНТ04	АНТ05	ASB17	ASB23	СА425	HMS02	HMS03	HMS06	HMS07	HTG04	HTG06	HTG07	VHL20
F	-	-	0,3750	-	0,3333	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	0,2917	-	-	-	-	-	-	-
H	0,4167	-	-	-	-	0,0417	-	-	-	-	0,2083	-	-
I	-	-	-	-	-	0,5000	-	-	-	0,0417	-	-	-
J	0,0417	0,5417	-	0,0833	0,2917	0,1667	0,1250	0,2083	-	0,0417	-	-	-
K	-	0,0833	0,2917	0,1250	-	-	-	0,0417	-	0,4167	0,0417	0,3333	-
L	0,2500	-	-	0,1250	-	-	0,1250	-	0,6250	0,3333	-	-	-
M	-	-	0,0833	-	0,1250	-	-	0,0833	0,1250	0,0417	-	0,1250	0,3750
N	0,2917	0,3333	0,0417	-	0,0417	-	-	0,1667	0,1250	-	-	-	0,4583
O	-	0,0417	-	-	0,2083	-	0,2083	0,2083	0,1250	0,1250	0,4167	0,5417	-
P	-	-	-	-	-	-	0,2083	0,2917	-	-	0,3333	-	-
Q	-	-	0,0417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1667
S	-	-	-	0,1250	-	-	0,3333	-	-	-	-	-	-
T	-	-	0,1667	0,0833	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U	-	-	-	0,2083	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	0,2500	-	-	-	-	-	-	-	-	-

за локусом СА425, його виявляли з мінімальною частотою – 0,0417. Серед 4 алельних варіантів локусу HMS02 алель I ідентифікували у половині випадків, у той же час алель H – лише з частотою 0,0417.

За локусом HMS03 найчастіше (0,3333) виявляли алель S. Частоти алелів О та Р, а також J та L становили 0,2083 та 0,1250, відповідно. Локус HMS06 був представлений 6 алелями, найчастіше з яких зустрічався алель Р (0,2917). Алельні варіанти J та О виявилися однаково поширеними у шетлендських поні та зустрічалися з частотою 0,2083. Найменш поширеним алелем виявився К, частота розповсюдження якого становила 0,0417. Під час аналізу алельного спектру локусу HMS07 було встановлено, що 3 алелі (М, N, О) зустрічалися з однаковою частотою – 0,1250. Найбільш поширеним виявився алель L, який визначали у більшості випадків (0,6250).

За локусом HTG04 було виявлено 6 алельних варіантів, з-поміж яких алель К ідентифікували найчастіше (0,4167). Алелі I, J та М зустрічалися з однаковою частотою

(0,0417). Настільки ж часто за локусом HTG06 виявляли алель К. Решта алелів за HTG06 у поні мала наступні частоти: 0,2083 (Н), 0,4167 (О) та 0,3333 (Р), відповідно.

Локус HTG07 у досліджуваній вибірці був представлений лише 3 алелями, найчастіше з яких зустрічався алель О – 0,5417, дещо рідше – алель К (0,3333), а алель М – з частотою 0,1250. Як і HTG07, локус VHL20 мав 3 алельні варіанти, з-поміж яких з максимальною частотою (0,4583) виявляли алель N, у той час як алель Q – з частотою 0,1667.

Кількість алелів на локус коливалася від 3 (HTG07, VHL20) до 7 (ASB23). Проведений генетичний аналіз показав, що локус HTG07 є найменш, а ASB23 – найбільш поліморфним. Це підтверджує індекс поліморфізму PIC, який в середньому становив 0,632. Усі локуси, за винятком HTG07, HMS07, АНТ05 та VHL20, виявилися високополіморфними. Найвище значення PIC відмічали для локусу ASB23 (0,812), а найнижчим цей показник був для HTG07 (0,502) (табл. 2).

Рівень фактичної гетерозиготності знаходився в межах 0,250 (HMS02) – 0,917 (АНТ04). Теоретично очікувана гетерозиготність коливалася від 0,587 (HMS07) до 0,870 (ASB23). Середнє значення фактичної гетерозиготності становило 0,622, у той час як теоретично очікуваної – 0,715, що свідчить про тенденцію до зростання гомозиготності у досліджуваній мікропопуляції. Достовірну різницю між рівнем фактичної і теоретично очікуваної гетерозиготності було встановлено лише за локусом HMS06.

2. Популяційно-генетична характеристика шетлендських поні за мікросателітними локусами ДНК

Локус	Na	Ho	He	χ^2	PIC	F	PE
АНТ04	4	0,917	0,707	6,080	0,614	-0,297	0,830
АНТ05	4	0,500	0,612	4,314	0,515	0,183	0,188
ASB17	6	0,833	0,768	8,239	0,694	-0,085	0,662
ASB23	7	0,833	0,870	19,920	0,812	0,042	0,662
СА425	5	0,750	0,775	5,021	0,699	0,033	0,510
HMS02	4	0,250	0,663	11,507	0,573	0,623	0,045
HMS03	5	0,667	0,804	15,097	0,735	0,171	0,379
HMS06	6	0,583	0,826	28,891*	0,760	0,294	0,271
HMS07	4	0,500	0,587	8,267	0,524	0,148	0,188
HTG04	6	0,417	0,725	13,713	0,644	0,425	0,124
HTG06	4	0,500	0,699	10,350	0,606	0,285	0,188
HTG07	3	0,667	0,605	0,537	0,502	-0,102	0,379
VHL20	3	0,667	0,649	3,119	0,543	-0,028	0,379
Середнє значення	4,692± 0,3610	0,622± 0,0543	0,715± 0,0260	-	0,632± 0,0292	0,130± 0,0702	0,999256

Примітка. * – $P < 0,05$

Визначення індексу фіксації (F) свідчить про надлишок гомозиготних генотипів за локусами HTG07, АНТ04, ASB17 та VHL20 на рівні 10,2, 29,7, 8,5 та 2,8 %, відповідно. Найбільший надлишок гомозигот відмічено для локусу HMS02 – 62,3 %. У середньому, індекс фіксації становив 13 %, що свідчить про дефіцит гетерозиготних генотипів у досліджуваних поні. Однією з причин цього може бути невелика чисельність мікропопуляції та обмежена кількість плідників, що використовуються при розведенні.

Для проведення контролю походження у шетлендських поні найбільш ефективним виявився локус АНТ04 (0,830), дещо меншим цей показник був для ASB17 та ASB23 (0,662). Найменш придатною генетичною системою для проведення контролю достовірності походження у досліджуваній мікропопуляції шетлендських поні виявився локус HMS02. У цілому, використання генетичного тестування коней за 13 мікросателітними локусами забезпечило вірогідність генетичного контролю їх походження на рівні 99,93 %.

Для порівняння зазначимо, що дослідження, проведені Iwańczyk в Польщі [1] з мікросателітного аналізу шетлендських поні (n=36) показали, що фактична гетерозиготність

виявилася дещо вищою за теоретично очікувану, згідно з законом Харді-Вайнберга (0,670 та 0,662, відповідно), тобто популяція перебувала у стані, близькому до стану генетичної рівноваги. У цілому, в польській популяції спостерігався незначний надлишок гомозиготних генотипів на рівні 1,3 %. Стосовно кількості виявлених алелів, то в середньому цей показник був вищим за отримані нами дані (6 і 4,692 алелів, відповідно), що можна пояснити невеликою вибіркою дослідженого нами поголів'я.

Висновки. Таким чином, результати проведених досліджень свідчать, що використання стандартної панелі з 13 мікросателітних локусів у шетлендських поні є придатним для ефективного проведення генетичної експертизи з вірогідністю 99,93 %. У результаті вивчення генетичного поліморфізму на популяційному рівні в досліджуваній мікропопуляції шетлендських поні встановлено дефіцит гетерозиготних генотипів на рівні 13%, однією з причиною чого є обмежена чисельність поголів'я та невелика кількість плідників, які використовуються в селекційному процесі.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Genetic structure and phylogenetic relationships of the Polish Heavy Horse / Ewa Iwańczyk, Rytis Juras, Grzegorz Cholewiński, E. Gus Cothran // *Journal of Applied Genetics*. – 2006. – Vol. 47, No 4. – P. 353–359.
2. Peakall R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / Rod Peakall, Peter E. Smouse // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – Vol. 6, No. 1. – P. 288–295.
3. Генетична ідентифікація та експертиза походження свійських коней (*Equus caballus*) мікросателітними фрагментами дезоксирибонуклеїнової кислоти: методичні рекомендації / В. Г. Спиридонов, А. В. Шельов, К. В. Кухтіна, С. Д. Мельничук, І. П. Григорюк. – К.: Видавничий центр НУБіП України, 2010. – 20 с.
4. Сервер Д. Великолепие лошади (справочник) / Д. Сервер. – Минск: Белфакс, 1997.–128 с.

REFERENCES

1. Iwańczyk, E., R. Juras, G. Cholewiński, and E. G. Cothran. 2006. Genetic structure and phylogenetic relationships of the Polish Heavy Horse. *J. Appl. Genet.* 47 (4): 353–359.
2. Peakall, R., and Smouse P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molec. Ecol. Notes*. 6 (1): 288–295.
3. Spyrydonov, V. H., A. V. Shel'ov, K. V. Kukhtina, S. D. Mel'nychuk, and I. P. Hryhoryuk. 2010. *Henetychna identyfikatsiya ta ekspertyza pokhodzhennya sviys'kykh koney (Equus caballus) mikrosatelitnymy frahmentamy dezoksyrybonukleyinovoyi kysloty: metodychni rekomendatsiyi – Genetic identification and parentage verification of domestic horses (Equus caballus) by microsatellite fragments of deoxyribonucleic acid: guidelines*. Kyiv, Publishing Center of NULES of Ukraine, 20 (in Ukrainian).
4. Server, D. 1997. *Velikolepie loshadi (spravochnik) – Greatness of the horse (Handbook)*. Minsk, 128 (in Russian).

