

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЛОШАДЕЙ ЧИСТОКРОВНОЙ ВЕРХОВОЙ И УКРАИНСКОЙ ВЕРХОВОЙ ПОРОД ПО ДНК-МАРКЕРАМ

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

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

Результаты проведенного генетического анализа лошадей чистокровной верховой и украинской верховой пород по 12 микросателлитным локусам ДНК, рекомендованным ISAG, свидетельствуют об их эффективности при оценке уровня генетической дифференциации между исследованными породами.

The results of the conducted genetic analysis of Thoroughbred and Ukrainian Rider horses using 12 microsatellite loci of DNA, recommended by ISAG, showed their effectiveness in evaluation of the level of genetic differentiation between studied breeds.

Ключевые слова: генетическая дифференциация, микросателлитные локусы ДНК, чистокровная верховая порода, украинская верховая порода.

Keywords: genetic differentiation, microsatellite loci of DNA, Thoroughbred horse breed, Ukrainian Rider horse breed.

Введение. Актуальность использования генетических маркеров в коневодстве сегодня не вызывает сомнения и является залогом успешной селекционной работы. Для эффективной оценки животного комплекса фенотипически признаков зачастую недостаточно [1]. Потому все большее значение приобретает генотипическая оценка животных с использованием различных генетических маркеров. Исследования по изучению генома лошади позволили внедрить в практику коневодства современные методы селекции, основанные на оценке генотипа животного – так называемую MAS-селекцию (Marker Assisted Selection).

Генотипирование позволяет проводить не только индивидуальную идентификацию животных, но и оценивать генетическую структуру пород и породных групп, исследовать межпородную дифференциацию, тем самым позволяя проводить мониторинг в малочисленных и аборигенных породах [2, 3].

Несмотря на большое количество генетических маркеров, в коневодстве в последнее время наблюдается тенденция преимущественного использования микросателлитных последовательностей ДНК. Благодаря кодоминантному характеру наследования и высокому уровню полиморфизма микросателлиты позволяют решить достаточно широкий спектр заданий. Кроме того, этот тип генетических маркеров Международное общество генетики животных (ISAG) рекомендует для проведения генетической экспертизы происхождения лошадей. Начиная с 2001 года, в соответствии с рекомендациями ISAG и Международного комитета по племенным книгам (ISBC), а с 2009 года и Всемирной ассоциации арабских лошадей (VAHO), генетические лаборатории обязаны проводить тестирование чистокровных лошадей по ДНК-маркерам. К тому же использование локусов микросателлитной ДНК обеспечивает достоверность генетической идентификации лошадей на 99,99% [4]. В России в 2012 году Советом по племенной работе с орловской рысистой породой было принято решение об обязательном проведении ДНК-экспертизы всех племенных лошадей, начиная с молодняка 2012 года рождения. Ассоциация ахалтекинское коннозаводства также приняла подобное решение и перешла на ДНК-тестирование лошадей. Вскоре подобную процедуру генетической идентификации будут обязаны проходить лошади всех заводских пород в Российской Федерации [5].

Что касается Украины, то исследования лошадей с использованием микросателлитных локусов были начаты не так давно, потому проведение генетического анализа пород лошадей, которых разводят в Украине, является актуальным.

Целью нашего исследования было проведение генетической дифференциации двух верховых пород лошадей, которых разводят в Украине – чистокровной верховой и украинской верховой. Особенностью племенной работы с чистокровной верховой породой является то, что она более 20 поколений разводится в условиях практически полной ее изоляции от влияния генетического материала других пород. В XVIII веке был издан первый том племенной книги (студбук) чистокровной верховой породы. Начиная с этого момента ни одна лошадь, родители которой не записаны в студбук, и достоверность происхождения которой не подтверждена генетической экспертизой, не может быть отнесена к чистокровной верховой породе. Работа по выведению украинской верховой породы, которая, хотя и считается спортивной, но используется в различных сферах жизни человека, было начато после окончания Великой Отечественной войны. Значительный вклад в ее создание внесла чистокровная верховая порода. Потому для проведения генетического анализа нами были выбраны именно эти две верховые породы, одна из которых (чистокровная верховая) является сугубо спортивной, а другая (украинская верховая) – более универсальной.

Материал и методы исследований. Материалом для исследований служили образцы крови лошадей чистокровной верховой (34 гол.) и украинской верховой (34 гол.) пород, отобранных в разных хозяйствах Украины. Исследования проводили на базе научно-исследовательского отдела молекулярно-генетических исследований Украинской лаборатории качества и безопасности продукции АПК.

Периферическую кровь отбирали из яремной вены в стерильные вакуумные пробирки Vacutest с консервантом EDTA. Геномную ДНК выделяли с использованием наборов «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», Россия) согласно инструкции производителя. Генетический анализ проводили по 12 микросателлитным

локусам ДНК (АНТ04, АНТ05, ASB17, ASB23, CA425, HMS03, HMS06, HMS07, НТГ04, НТГ06, НТГ07, VHL20), которые входят в перечень рекомендуемых ISAG для индивидуальной идентификации и подтверждения происхождения лошадей. Полимеразную цепную реакцию проводили при стандартных условиях на амплификаторе Veriti 96-Well (Applied Biosystems, США) [6]. Денатурацию продуктов амплификации проводили с помощью формамида (Sigma, США) и разделяли путем капиллярного электрофореза на 4-капиллярном генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя. Используя размерный стандарт Genescan-LIZ 500 (Applied Biosystems, США), программное обеспечение «Gene Mapper 3.7» (Applied Biosystems, США) определяли размер аллелей.

В результате проведенных исследований, используя программное обеспечение GENALEX 6 [7], определяли частоты аллелей, количество аллелей на locus (Na), индекс полиморфизма (PIC), индекс фиксации (F), наблюдаемую (Ho) и ожидаемую (He) гетерозиготность. Внутри- и межпопуляционную генетическую дифференциацию исследованных пород на основе микросателлитов ДНК анализировали, используя индексы F-статистики Райта (Fis, Fit и Fst). Кроме того, для оценки генетического разнообразия каждой особи и популяции, из которой она происходила, а также для оценки вероятности отнесения особи к своей или иной популяции, был проведен assignment-тест [7].

Результаты исследований. Максимальное количество аллелей, а также эффективное число аллелей было установлено в украинской верховой породе – 8,167 и 4,632, соответственно. Одной из причин этого может быть особенность формирования украинской верховой породы, поскольку в ее выведении принимало участие большое количество различных пород. В исследованной популяции лошадей чистокровной верховой породы наиболее полиморфным оказался locus АНТ04 с количеством эффективных аллелей 6,052. В отличие от чистокровной верховой породы самым полиморфным locusом в украинской верховой породе был VHL20, количество эффективных аллелей по которому составило 7,363.

Максимальное количество аллелей в чистокровной верховой породе было зафиксировано по locusу ASB23 (13 аллелей), а минимальное – по НТГ04 (5 аллелей). В украинской верховой породе минимальное количество аллелей (6) наблюдали сразу по трем locusам – ASB23, HMS07 и НТГ04. В то же время по locusу VHL20 наблюдали максимальное количество выявленных аллелей – 13.

Анализируя значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности в чистокровной верховой породе по locusам АНТ04, ASB17, ASB23, CA425, HMS03, НТГ04 и НТГ07 было установлено достоверное преобладание гомозиготных генотипов, максимальный избыток которых был зафиксирован по locusу CA425. Об этом свидетельствует также индекс фиксации, который по CA425 составил 32,9%. Избыток гетерозигот у лошадей чистокровной верховой породы отмечали по трем locusам (HMS06, НТГ06, VHL20), причем только по двум из них различия между значениями наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности были достоверными. По locusу НТГ06 избыток гетерозигот оказался наибольшим среди всех исследованных – 10,2%.

Таблица 1 – Генетическая характеристика лошадей чистокровной верховой и украинской верховой пород лошадей по микросателлитным locusам ДНК

Лocus	Чистокровная верховая					Украинская верховая				
	Na	Ne	Ho	He	F	Na	Ne	Ho	He	F
АНТ04	9	6,052	0,735	0,847** *	0,132	9	4,056	0,706	0,765**	0,077
АНТ05	6	3,753	0,706	0,745	0,052	7	4,371	0,735	0,783*	0,061
ASB17	8	4,014	0,706	0,762**	0,074	11	6,663	0,882	0,863	-0,023
ASB23	13	6,021	0,794	0,846**	0,062	6	4,250	0,735	0,776	0,053
CA425	6	1,904	0,324	0,482**	0,329	9	2,645	0,529	0,631	0,161
HMS03	10	3,778	0,529	0,746*	0,291	8	5,059	0,676	0,814	0,169
HMS06	7	2,294	0,588	0,572**	-0,028	8	5,585	0,794	0,833	0,047
HMS07	6	5,104	0,765	0,816	0,063	6	4,757	0,794	0,802	0,009
НТГ04	5	3,014	0,529	0,678**	0,219	6	3,099	0,618	0,687** *	0,102
НТГ06	7	2,374	0,647	0,587** *	-0,102	8	3,185	0,676	0,696** *	0,028
НТГ07	6	3,112	0,618	0,689** *	0,103	7	4,551	0,471	0,792** *	0,406
VHL20	6	3,477	0,735	0,723	-0,017	13	7,363	0,882	0,877	-0,006
Средне е	7,417 ± 0,657	3,741± 0,397	0,640± 0,038	0,708± 0,033	0,098± 0,039	8,167 ± 0,613	4,632± 0,405	0,708± 0,036	0,777± 0,021	0,090± 0,035

Примечания: уровень достоверности * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

В украинской верховой породе среднее значение наблюдаемой гетерозиготности оказалось выше аналогичного показателя в чистокровной верховой породе и составило 0,708. При этом максимальный уровень наблюдаемой гетерозиготности (0,882) был зафиксирован сразу по двум locusам – ASB17 и

VHL20. Среднее значение ожидаемой гетерозиготности также превышало аналогичный показатель чистокровной верховой породы (0,708) и составил 0,777. В исследованной популяции лошадей украинской верховой породы по 10 локусам из 12 было установлено преобладание гомозиготных генотипов, хотя достоверные отклонения в сторону избытка гомозигот отмечали лишь по локусам АНТ04, АНТ05, НТГ04, НТГ06, НТГ07. Только по двум локусам (ASB17 и VHL20) наблюдали избыток гетерозигот, хотя достоверной разницы между значениями наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности установлено не было.

На основании уровней наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, а также индекса фиксации выяснилось, что чистокровная верховая и украинская верховая породы были максимально приближенными к состоянию генетического равновесия согласно закону Харди-Вайнберга по локусу VHL20, по которому наблюдали незначительный избыток гетерозигот (1,7 и 0,06%, соответственно). В то же время по локусу СА425 чистокровной верховой и по НТГ07 украинской верховой пород наблюдали максимальное отклонение от генетического равновесия (по Харди-Вайнбергу) с избытком гомозигот 32,9 и 40,6%, соответственно (таблица 1).

С целью определения степени разнообразия в исследованных породах лошадей были рассчитаны коэффициенты F-статистики Райта: Fis, Fit, Fst (таблица 2).

Таблица 2 – Коэффициенты Fis, Fit и Fst для исследуемых пород лошадей

Локус	Fis	Fit	Fst
АНТ04	0,093	0,123	0,034
АНТ05	0,042	0,050	0,008
ASB17	0,008	0,071	0,064
ASB23	0,043	0,059	0,016
СА425	0,222	0,237	0,019
HMS03	0,216	0,274	0,074
HMS06	0,002	0,070	0,068
HMS07	0,022	0,043	0,021
НТГ04	0,148	0,188	0,047
НТГ06	-0,047	-0,035	0,011
НТГ07	0,254	0,276	0,029
VHL20	-0,026	0,018	0,043
Среднее	0,081±0,030	0,114±0,030	0,036±0,007

В целом по 10 локусам из 12 отмечали положительное значение Fis, что указывает на снижение гетерозиготности животных в исследованных породах. В целом по обеим породам максимальный показатель избытка гомозигот наблюдали по локусу СА425 – 22,2%. Только по двум локусам (НТГ06 и VHL20) был установлен незначительный избыток гетерозиготных генотипов (4,7 и 2,6%, соответственно). В среднем дефицит гетерозигот исследованных лошадей относительно популяции составил 8,1%.

Дефицит гетерозиготных генотипов у вида в среднем составлял 11,4%, о чем свидетельствует коэффициент Fit. Среди всех 12 локусов только по НТГ06 был зафиксирован незначительный избыток гетерозигот (3,5%). В то же время по HMS03 наблюдали максимальный избыток гомозигот – 27,4%.

Анализ коэффициента Fst, с помощью которого оценивают уровень межпородной дифференциации, показал, что основная часть генетической изменчивости реализуется в середине популяции, и только 3,6% разделяется между популяциями. Было установлено, что самый большой вклад в межпопуляционную изменчивость вносит локус HMS03, а наименьший – локус АНТ05.

С целью оценки генетического разнообразия каждой особи и популяции, из которой она происходила, а также вероятности отнесения данной особи к своей или другой популяции, был проведен assignment-тест (рисунок 1).

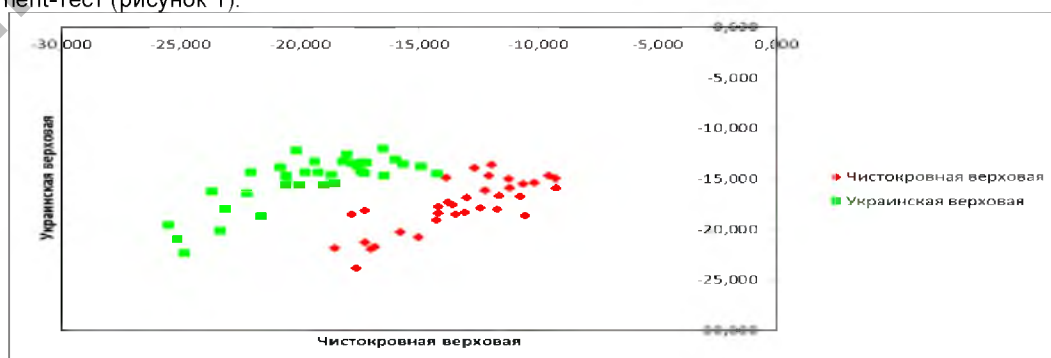


Рисунок 1 – Assignment-тест для популяций лошадей чистокровной верховой и украинской верховой пород

В целом по двум исследованным породам точность отнесения к своей популяции была достаточно высокой и составила 99%. Причем для чистокровной верховой породы точность отнесения лошадей к своей популяции наблюдалась в 100% случаев. Что касается украинской верховой породы, из 34 животных 1 лошадь не была отнесена к своей популяции. Результаты проведенного теста свидетельствуют о высоком уровне генетической консолидации обеих пород, несмотря на особенности их разведения.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что украинская верховая порода по сравнению с чистокровной верховой является более полиморфной. В обеих популяциях в среднем по 12 локусам установлен дефицит гетерозигот. Анализ коэффициентов F-статистики Райта свидетельствует о тенденции исследованных популяций к возрастанию уровня гомозиготности. В результате проведенного assignment-теста был установлен высокий уровень генетической консолидации обеих пород.

Литература. 1. Елькина М.А. IRAP-PCR-маркеры у некоторых пород сельскохозяйственных видов млекопитающих / М.А. Елькина, В.И. Глазко // Известия ТСХА. – 2012. – Вып. 2. – С. 58 – 65. 2. Храброва Л.А. Метод оценки генетического разнообразия и степени генотипического сходства лошадей заводских и местных пород / Л.А. Храброва, А.М. Зайцев, М.А. Зайцева. – Дивово, 2011. – 25 с. 3. Храброва Л.А. Мониторинг генетической структуры пород в коневодстве / Л.А. Храброва // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2008. – № 4. – С. 42 – 44. 4. Храброва Л.А. Использование генетических исследований в коневодстве / Храброва Л.А. // Коневодство и конный спорт. – 2010. – № 2. – С. 11 – 13. 5. Храброва Л.А. Генетический метод контроля происхождения лошадей [Электронный ресурс] / Храброва Л.А. – Режим доступа к журн.: <http://www.ruhorses.ru/genetic/genetic.html>. 6. Храброва Л.А. Генетический метод контроля происхождения лошадей [Электронный ресурс] / Храброва Л.А. – Режим доступа к журн.: <http://www.ruhorses.ru/genetic/genetic.html>. 7. Храброва Л.А. Генетический метод контроля происхождения лошадей [Электронный ресурс] / Храброва Л.А. – Режим доступа к журн.: <http://www.ruhorses.ru/genetic/genetic.html>. 7. Paetkau D. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power / D. Paetkau, R. Slade, M. Burdens [et al] // Molecular Ecology. – 2004. – V. 13. – P. 55 – 65.

Статья передана в печать 09.08.2013

УДК 619:639.1. 091 (476)

ЭЛЕКТРОННАЯ БАЗА ДАННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ОХОТНИЧЬИХ ХОЗЯЙСТВАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Морозов А.В.

Государственное научно-производственное объединение «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам», г. Минск

В статье приведена информация об электронной базе данных возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной этиологии в охотничьих хозяйствах Беларуси. Созданная электронная база данных позволяет формировать отчеты по различным критериям, проводить оценку эпизоотического состояния охотугодий Беларуси, получать аналитическую информацию, проследить многолетнюю динамику и делать перспективные прогнозы.

The article presents information about an electronic database of infectious diseases in the hunting areas in Belarus. The database allows generating reports on various criteria, assessing the epizootic state of hunting grounds, receiving analytical information, tracking the long-term dynamics, and making prospective forecasts.

Ключевые слова: охотничьи хозяйства, инфекционные заболевания, возбудители бактериальных инфекций, эпизоотологический мониторинг, электронная база данных

Keywords: hunting farms, infectious diseases, pathogens of bacterial infections epizootological monitoring, electronic database

Введение. Увеличение народонаселения планеты и быстрое сокращение площадей пахотных земель неизбежно приведут к глобальной проблеме лимитированности белковой продукции, к необходимости повышения биологической продуктивности естественных угодий, не вовлеченных в сельскохозяйственный оборот, и привлечения инвестиций в охотничье хозяйство, где приоритетными становятся мясодичное и трофейное направления. Немаловажно, что затраты труда на единицу продукции здесь во много раз меньше, чем в смежных отраслях.

Воздействие человека на диких животных должно быть экологически осознанным и направленным на оптимизацию численности, сокращение непроизводительных потерь, увеличение продуктивности и сохранение среды обитания [2,6].

Поэтому современные возрастающие потребности общества обуславливают увеличение как поголовья сельскохозяйственных животных, так и численности популяций охотничьих видов, что, в свою очередь, не исключает возникновение рисков распространения инфекционных заболеваний бактериальной этиологии. Для устойчивого развития охотничьих хозяйств важной составляющей является профилактика инфекционных заболеваний ресурсных видов животных на основе эпизоотологического мониторинга и оценки масштабов распространения возбудителей бактериальных инфекций в среде их обитания. Эпизоотологический мониторинг – система непрерывного слежения за эпизоотической