

**О. С. Сафронова¹, М. А. Зайцева², С. Д. Нурбаев³,
Н. А. Кикебаев¹, И. М. Брель-Киселева⁴, И. М. Тегза⁴,
М. Б. Каратаева³**

¹ТОО «Қазақ тулпары», пос. Заречный, Казахстан

²Всероссийский научно-исследовательский институт
коневодства, г. Рязань, Россия

³НИИ животноводства и кормопроизводства,
г. Алматы, Казахстан

⁴Государственный университет им. А. Байтурсынова
г. Костанай, Казахстан

ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛЕЛОФОНДА ПЛЕМЕННОГО ЯДРА ЛОШАДЕЙ КОСТАНАЙСКОЙ ПОРОДЫ ПО МИКРОСАТТЕЛИТАМ ДНК*

Аннотация. Представлены результаты генетического тестирования по 17 микросателлитным локусам ДНК лошадей ядра костанайской породы, а также группы помесных животных желательного типа для новой создаваемой породы. Современная популяция чистопородных племенных лошадей имеет генетическое разнообразие на уровне – Nv 5,765, полиморфность – Ae 3,644, гетерозиготность – Ho 68,9 %, He 69,1 %, индекс фиксации Fis 0,009, относится к кластеру верховых пород с наиболее близкой связью с английской верховой породой западноевропейской селекции, несколько меньшей – с популяцией стран СНГ. Наблюдаемая гетерозиготность массива кобыл составила 69,8 % при индексе фиксации 0,0004. Nv – 5,588 при Ae – 3,639. Уровень полиморфности варьирует от 3,046 до 3,236; наблюдаемая гетерозиготность 0,672-0,706; расчетная 0,628-0,657.

Ключевые слова: лошадь, аллель, микросателлиты, полиморфизм, генотипирование.

* Работа выполнена в рамках НИОКР по Государственной программе 212, приоритетное направление «Повышение генетического потенциала продуктивности, совершенствование технологий кормления, содержания и воспроизводства сельскохозяйственных животных, птиц, рыб и пчел в различных регионах Республики Казахстан», тематика «Генетический мониторинг отечественных пород лошадей Казахстана» № ГР 0112 РК 01653.



Түіндеме. Қостанай жылқы тұқымының ДНҚ микросателлитінің 17 локусы бойынша генетикалық тестілеу нәтижелері берілген, сонымен қатар, бір топ будан жылқылар жаңа тұқымға қажетті тип. Қостанай жылқы тұқымының осы кезгі негізгі популяциясының генетикалық ерекшеліктерінің – Nv 5,765, полиморфтілігінің – Ae 3,644 және гетерозиготтылығының – Ho 68,9 % Не 69,1 %, Fis 0,009 деңгейлері бойынша. Тұқым ішінде аллелдердің кездесу жиілігі мен түрлерінің айырмашылығы бар екені анықталды. Қостанай тұқымында аз санды тұқымдарда кездесетін генетикалық ерекшеліктердің төмендеуі және генетикалық күйзеліс анықталмады. Биелердің бақыланатын гетерозиготалық деңгейі 69,8%, фиксация индексі – 0,0004. Nv – 5,588. Ae – 3,639. Полиморфтылық деңгейі 3,046 тен 3,236 дейін өзгереді. Бақыланатын гетерозиготалық деңгейі 0,672 ден 0,706 дейін, ал есептік – 0,628 ден 0,657-ға дейін.

Түйінді сөздер: жылқы, аллель, микросателлиты, полиморфизм, генотипирование.



Abstract. The article presents the results of genetic testing on 17 microsatellite loci DNA core Kostanai breed horses, as well as groups of desired crossbred animals for new created breed. The modern population of purebred breeding horses have genetic diversity at level – Nv 5,765, 3,644 AE polymorphism, heterozygosity – But 68.9 % No 69.1 % fixation index Fis 0.009, refers to a cluster of saddle breed horse with the closest link with the English saddle breed horse of the Western selection, with a population of less with the one of countries CIS. The observed heterozygosity of array of mares was 69.8 % on the index fixation 0.0004. Nv – 5.588 at Ae – 3.639. The level of polymorphism ranged from 3.046 to 3.236; observed heterozygosity of 0.672 to 0.706; calculated one from 0.628 to 0.657.

Key words: horse, allele microsatellite polymorphism genotyping.

Введение. В настоящее время оценка генетического разнообразия стала неотъемлемой частью селекционно-племенной работы. Анализ меж- и внутривидового полиморфизма локусов ДНК проводится в большинстве пород и популяций животных с учетом континентального и регионального размещения.

Одним из наиболее информативных методов такого анализа является микросателлитное типирование, которое не только характеризует генетическую структуру популяций, пород, стад, оценивает степень их генетического сходства, но и повышает эффективность селекции путем контроля за достоверностью происхождения [1-10].

Костанайская порода лошадей выведена путем сложного воспроизводительного скрещивания казахских кобыл с калмыцкими, донскими, стрелецкими, орлово-ростопчинскими, англо-арабскими, а также высококровными и чистокровными верховыми жеребцами, в условиях конюшенно-пастбищного и культурно-табунного содержания в Костанайском и Майкульском конных заводах Казахстана и в Троицком конном заводе Челябинской области (при апробации 75 % английской верховой породы и 25 % исходных различных местных пород). Утверждена в 1951 г. Совершенствуют костанайских лошадей методом чистопородного разведения. В конце XX в. в породе сложилась критическая ситуация – имело место существенное сокращение популяционной численности, которое повысило уровень межродственного скрещивания – инбридинга, что, в свою очередь, увеличило риск инбредной депрессии и потенциально экстенсивного разведения.

В последние 15 лет принимаются меры не только по сохранению и развитию костанайской породы, но и начаты мероприятия по выведению на ее основе новой казахской верховой породы лошадей.

Цель работы: оценка современного состояния племенного ядра породы (Костанайский конный завод) по полиморфизму микросателлитных локусов ДНК.

Методы исследований. Выделение ДНК проводилось в соответствии с инструкциями производителя. Генотипирование лошадей набором StockMarks Horse по 17 локусам (АНТ4, АНТ5, ASB2, ASB23, ASB17, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, НТГ4, НТГ6, НТГ7, НТГ10, VHL20, LEX3, СА425). Идентификация продуктов амплификации выполнена на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems США) с применением капиллярного электрофореза и лазерной детекции. Расшифровка полученных графических результатов в программе GeneMapper 4.0. Для характеристики полиморфизма использовали следующие показатели: частоту аллелей (рА) и частоту генотипов (РАА), фактически наблюдаемую (H_o) и теоретически ожидаемую (H_e) гетерозиготность с учетом закона Харди – Вай-

нбергера (H_o – по М. Нею, H_e (с Sa по А. Робертсону), а также среднюю гетерозиготность по популяциям, индекс фиксации (Fis), уровень полиморфности (Ae), среднее число аллелей в локусе (Nv), коэффициент генетического сходства и стандартное генетическое расстояние (Dху).

Результаты исследований: представлена характеристика костанайской породы лошадей в контексте межпородной дифференциации. Для общей характеристики и позиционирования костанайской породы предложены следующие породы лошадей: наиболее распространенные – арабская и английская верховая (двух популяций: европейская польская (**)) и популяция стран бывшего СССР (*)), две полукровные породы – тракененская и малопольская и две местные породы – забайкальская и бурятская. Интерес представляет информация по сравнению с малопольской породой лошадей, изучением которой занимался T. Zabek et. all (2005), в некоторой степени ее выведение имеет общие черты с выводимой, на основе костанайской, казахской верховой (трехпородное скрещивание: местная верховая/английская чистокровная/арабская чистокровная).

В соответствии с данными таблицы 1 установлено, что по показателю Nv (среднее число аллелей на локус), костанайская

Таблица 1

Основные характеристики полиморфизма микросателлитных локусов лошадей разных пород

Порода	n	Nv	Ae	H_o	H_e	Fis
Костанайская	144	5,765	3,644	0,689	0,691	0,009
Чистокровная верховая	443	6,875	3,519	0,697	0,689	-0,012
Чистокровная верховая**	50	5,450	3,185	0,698	0,686	-0,018
Арабская	319	7,470	3,213	0,610	0,656	0,070
Тракененская	109	5,353	3,861	0,670	0,760	0,051
Малопольская**	50	6,500	3,717	0,747	0,731	-0,022
Забайкальская	11	5,647	4,045	0,726	0,723	0,004
Бурятская	11	5,294	3,609	0,701	0,748	-0,068

** Tomasz Zabek et. all (2005) [11].

порода стоит после арабской, чистокровной верховой и мало-польской, а по уровню полиморфности – после тракнененской, малопольской и забайкальской. Средняя степень гетерозиготности (Ho) по локусам варьирует от 0,610 у арабской до 0,747 у малопольской. Недостаток гетерозигот наблюдается в тракнененской, арабской, костанайской и забайкальской породах. Высокие результаты превышения фактически выявленных гетерозиготных животных над расчетными данными имеют чистокровная верховая польской популяции (Fis – 0,018) и малопольская (Fis – 0,022). В костанайской породе зафиксировано практически равновесное состояние.

На основании распределения аллельных частот были рассчитаны значения генетических дистанций и генетического сходства, которые представлены в табл. 2. Максимальную степень генетического сходства имеют малопольская и чистокровная** порода польской популяции – выше 90 %. Это объясняется тем, что данные чистокровные лошади интенсивно работали и продолжают использоваться для улучшения малопольской породы и соответственно расчет генетического сходства и генетических дистанций для этих пород малоинформативен. Наименьшее

Таблица 2

Генетические дистанции I (над диагональю) и генетическое сходство D (под диагональю) между верховыми породами по микросателлитным локусам ДНК

Порода	Костанайская	Чистокровная*	Чистокровная**	Малопольская	Арабская	Тракнененская	Забайкальская	Бурятская
Костанайская	-	0,2682	0,1669	0,1672	0,3861	0,2757	0,7203	0,6137
Чистокровная*	0,7648	-	0,1354	0,1269	0,5489	0,3150	0,7085	0,6020
Чистокровная**	0,8463	0,8734	-	0,0542	0,4943	0,2225	0,6850	0,6142
Малопольская	0,8461	0,8808	0,9472	-	0,3701	0,1859	0,6640	0,5638
Арабская	0,6797	0,5776	0,6100	0,6907	-	0,4072	0,7885	0,6852
Тракнененская	0,7590	0,7298	0,8005	0,8304	0,6655	-	0,7346	0,6143
Забайкальская	0,4866	0,4924	0,5041	0,5148	0,4545	0,4797	-	0,2178
Бурятская	0,5413	0,5477	0,5410	0,5690	0,5040	0,5410	0,8036	-

сходство костанайская порода имеет с верховыми породами – траккененской и арабской, а также с местными породами – забайкальской и бурятской. Дендрограмма (рис. 1), характеризующая результаты кластерного анализа генетического сходства пород, показывает наличие генетически наиболее близкой группы – малопольская и чистокровная**, с которыми имеет связь, анализируемая костанайская порода.

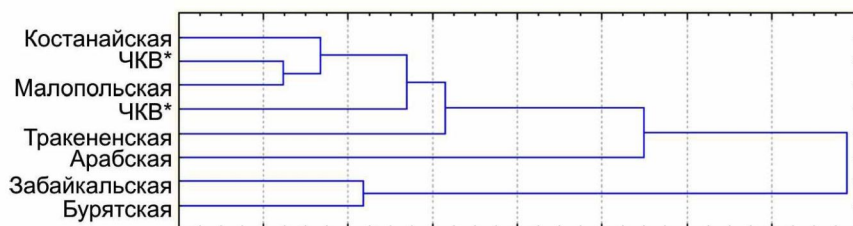


Рис. 1. Генетические взаимоотношения между 6 верховыми и 2 местными породами (в том числе английской верховой двух популяций) лошадей по локусам микросателлитов ДНК (Complete Linkage)

При этом с английской чистокровной* (популяция стран бывшего СССР) связь значительно меньше, что может быть обусловлено использованием в селекционно-племенной работе с костанайской породой большего количества жеребцов-производителей, имевших европейское и американское происхождение, чем из общей популяции стран бывшего СССР. Возможно, что определенное влияние оказало и число использованных в анализе лошадей.

Особенности полиморфизма 17 локусов микросателлитов ДНК лошадей Костанайского конного завода. Для анализа были сформированы 6 групп, в составе которых 4 основные маточные семейства, группа производителей (дополненная кроме чистопородных животных лошадьми английской верховой и арабской породы) и группа молодняка желательного типа, к которой отнесены лошади, удовлетворяющие требованиям для новой казахской верховой породы (с повышенной кровностью по англий-

ской верховой породе, соответственными резвостными характеристиками и контролируемым прилитием крови арабских жеребцов).

Полиморфность у чистопородных лошадей 5,765. При этом число эффективно действующих аллелей – 3,644, для помесных – 5,294 и 3,566 соответственно. Эффективность действующих аллелей в костанайской выборке находится на уровне 63,2 %, в выборке для новой породы – 67,4 %.

При анализе всей выборки с разделением на чистопородные и желательный тип (помесные) наибольшее распространение имеют следующие аллели: в локусе VHL20 – I (0.330), N(0.318) по чистопородной выборке и I (0.442), N(0.346)//по желательному типу; в HTG4- K (0.295), M(0.557) // K(0.231), M (0.615); в АНТ4 – J (0.273), O (0.568) // J (0.212), O (0.462); в HSM7 – J (0.239), L (0.227), N (0.273) // J (0.442), L (0.154), N (0.212); в HTG 6- G (0.307), J (0.261), O (0.284) // G (0.269), J (0.231), O (0.432); в АНТ5 – J (0.432), N (0.273), K (0.261) // J (0.231), N (0.538); в HSM6 – M (0.239), P (0.670) // P (0.712); в ASB23 – J (0.182), K (0.182), L (0.307), S (0.170) // I (0.269), J (0.115), K (0.212), S (0.269); в ASB2 – J (0.193), N (0.239) // I (0.269), P (0.154) .

Средний уровень гетерозиготности лошадей костанайской породы – 68,9 %, у помесных лошадей он выше – 70,4 %. Также данная группа лидирует по показателю число аллелей в локусе. При этом у чистопородных лошадей в 7 локусах из 17 выявлено достоверное отклонение от генетического равновесия, у желательного типа всего в 4-х и величина отклонения ниже. Вероятной причиной недостатка гетерозигот у чистопородных является уровень инбридинга, который обусловлен ограниченной численностью жеребцов-производителей.

В выборке основных маточных семейств было выявлено 95 аллелей. При этом спектр аллелей внутри семейств варьирует от 67 до 71. Наблюдаемая гетерозиготность массива составила 69,8 % при индексе фиксации 0,0004. N_v – 5,588 при A_e – 3,639. Анализ всего конепоголовья, не разделенного на группы, выявил практически равные показатели ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности с индексом фиксации 0,0001. Однако

при разделении на 17 микросателлитных локусов внутренняя вариабельность оказалась значительной. В большинстве локусов семейства проявили разный спектр и частоты встречаемости аллелей. Только в локусе HTG7 (K,N,O) полностью совпал спектр не только у семейств, но и у группы чистопородных производителей, вместе с тем наблюдаются и схожие показатели частот. В локусе ASB23 аллельный пул также весьма однороден (I,J,K,L,S), за исключением аллеля I в семействе Сибири. Уровень полиморфности варьирует от 3,046 у Ночки до 3,236 – у Сибири; наблюдаемая гетерозиготность от 0,672 – у Гренады до 0,706 – у Бретонки; расчетная от 0,628 – у Гренады до 0,657 – у Сибири. Выявлены «приватные» аллели: в семействе Бретонки в локусе ASB17 (L), в семействе Зозули в локусе HMS3 (L), в семействе Ночки CA425 (K), в семействе Сибири в локусе АНТ4 (P), HMS3 (K), ASB17 (F), у группы производителей HTG4 (P). В целом все группы показывают достаточно высокий уровень гетерозиготности- выше 60 %, внутри групп признаков замкнутости не наблюдается.

Для анализа связей между структурами в зависимости от характера распределения аллельных частот вышеуказанных групп по 17 микросателлитным локусам были рассчитаны значения генетических дистанций и генетического сходства (табл. 3). Высокий уровень генетического сходства выше 90 % имеют семейства Гренады и Бретонки. Связь между группой жеребцов и семействами значительно ниже. Основной причиной является наличие жеребцов-производителей других пород (чистокровной верховой и арабской), включение которых в анализ было необходимо для оценки группы желательного типа.

Результаты кластерного анализа (рис. 2) генетического сходства внутривидовых групп показывают наличие нескольких кластеров.

Две пары – семейства Бретонки – Сибири и семейство Гренады – Желательный тип образуют отдельный кластер. Группа жеребцов-производителей и семейство Ночки дифференцированы от этого кластера и образуют отдельные ветви.

Таблица 3

Генетические дистанции I (над диагональю) и генетическое сходство D (под диагональю)

Внутрипородные группы	Жеребцы-производители	Семейство Бретонки	Семейство Гренады	Семейство Ночки	Семейство Сибири	Желательный тип новой породы
Жеребцы-производители	-	0,1598	0,1434	0,1839	0,1630	0,1338
Семейство Бретонки	0,8523	-	0,0450	0,0783	0,0744	0,0789
Семейство Гренады	0,8664	0,9560	-	0,0902	0,0870	0,0422
Семейство Ночки	0,8320	0,9247	0,9137	-	0,1475	0,1185
Семейство Сибири	0,8496	0,9283	0,9167	0,8628	-	0,0537
Желательный тип	0,8748	0,9251	0,9587	0,8882	0,9477	-

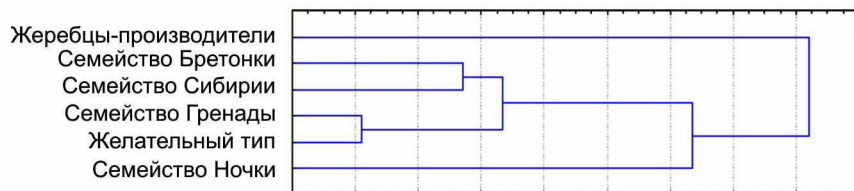


Рис. 2. Генетические взаимоотношения внутри костанайской породы лошадей по 17 локусам микросателлитов ДНК(Complete Linkage)

Обсуждение результатов. Согласно проведенному мониторингу лошадей костанайской породы современная популяция племенного ядра породы, сосредоточенная на Костанайском конном заводе «Казак тулпары», имеет внутрипородное генетическое разнообразие на уровне $N_v - 5,765$, полиморфность $A_e - 3,644$, гетерозиготность $H_o - 68,9\%$. Наименее информативными локусами для костанайской породы являются локусы HTG7 и ASB23.

Выводы. Межпородное позиционирование (5 верховых и 2 местные породы) в настоящее время подтверждает принадлежность костанайской породы к кластеру верховых пород с наиболее близкой связью с чистокровной породой (генетическое сходство (D) 0,846) западноевропейской популяции.

Внутрипородная структура (семейства) различается в аллельном спектре (в семействе Бретонки имеется приватный аллель в локусе ASB17 (L), в семействе Зозули – в локусе HMS3 (L), в семействе Ночки – CA425 (K), в семействе Сибири – в локусах АНТ4 (P), HMS3 (K), ASB17 (F), у группы производителей НТГ4 (P)). Анализ исследуемых структур костанайской породы подтвердил наличие дифференцированных групп животных. При этом следует отметить, что наиболее близкая связь у желательного типа с семейством Гренады, которая отражает направление текущего селекционного подбора (кобылы этого семейства имеют резвостные и экстерьерные характеристики выше средних по костанайской породе и оптимальны для новой создаваемой породы). Текущий этап выведения на основе верхового типа костанайской породы (с прилитием английской и арабской чистокровных пород) новой казахской породы лошадей сопровождается наличием некоторых отличий, в сравнении с чистопородными животными. Однако степень их значимости пока невысокая.

Список литературы

1 *Хлесткина Е.К.* Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4/2. – С. 1044-1054.

2 *Сулимова Г.Е.* ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – С. 260-271.

3 *Калашников В.В., Дергунова В.М.И., Зайцев А.М., Храброва Л.А., Зайцева М.А.* Дополнительные возможности метода ДНК-анализа в коневодстве // Farm Animals. – 2013. – № 3-4. – С. 72-74.

4 *Калашников В.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М.* Прикладная генетика в коневодстве // Farm Animals. – 2013. – № 2 (3). – С. 60-62.

5 *Храброва Л.А., Блохина Н.В., Устьянцева А.В.* Инбридинг и степень гомозиготности микросателлитных локусов у лошадей (*Equus caballus*) орловской рысистой породы // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 4. – С. 35-41.

6 Мельник О.В., Дзіцюк В.В., Спиридонов В.Г., Шельов А.В., Мельничук С.Д. Связь инбридинга лошадей чистокровной верховой породы со степенью гомозиготности микросателлитов ДНК // Біологічний вісник МДПУ. – 2013. – № 2. – С. 149-159.

7 Глазко В.И., Гладырь Е.А., Феофилов А.В., Бардуков Н.В., Глазко Т.Т. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы сельскохозяйственных видов млекопитающих // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 2. – С. 71-76.

8 Калашников В.В. Селекционно-генетические методы в коннозаводстве // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – № 7. – С. 46-49.

9 Khanshour A.M., Conant E.K., Juras R., Cothran E.G. Microsatellite analysis for parentage testing of the Arabian horse breed from Syria // Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. – 2013. – № 37. – P. 9-14.

10 Гладырь Е.А., Шадрина Я.Л., Горелов П.В., Даваахуу Л. и др. Характеристика якутского скота по микросателлитам // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 6. – С. 65-69.

11 Zabek T., Nogaj A., Radko A., Nogaj J., Slota E. Genetic variation of Polish endangered Bilgoraj horses and two common horse breeds in microsatellite loci. // Applied Genetic. – 2005. – № 46 (3). – P. 299-305.

Сафронова Ольга Станиславовна, кандидат сельскохозяйственных наук, зав. лабораторией генетики животных

Зайцева Марина Анатольевна, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник

Кикебаев Н.А., доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик, директор ТОО «Қазақ тұлпары»

Нурбаев Серик Долдашевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник

Брель-Киселева Инна Михайловна, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, старший преподаватель

Тегза Иван Моклошевич, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, старший преподаватель

Каратаева Молдир Балабековна, старший научный сотрудник, тел. 8-701-464-35-64

e-mail: Olga_Safronova73@mail.ru