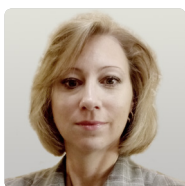


ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РУССКОЙ РЫСИСТОЙ ПОРОДЫ ЛОШАДЕЙ ПО ЛОКУСАМ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ ДНК

© Гавриличева И.С.



Ирина Сергеевна Гавриличева

Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства
Российская Федерация, 391105, Рязанская обл., Рыбновский р-н,
пос. Институт коневодства

E-mail: labgenetics79@gmail.com

ORCID: 0000-0002-6957-1157; ResearcherID: F-7616-2019

Цель исследований – изучение генетических особенностей современной популяции лошадей русской рысистой породы с использованием ДНК-маркеров. Данное исследование выявило редкие, а также наиболее характерные аллели, присущие представителям этой породы. В дальнейшем при условии накопления достаточного количества данных станет возможным построить генетические профили трех заводских призовых пород (американской, французской и русской рысистых пород) на современном этапе. Русская рысистая порода лошадей – наиболее распространенная из всех заводских пород России. В нынешних условиях из-за усилившейся ориентации на беговой спорт отбор по работоспособности приобретает все большее значение в совершенствовании русской рысистой породы лошадей. Призовая работоспособность – это обусловленный действием всего генотипа сложный количественный признак. Так, в разведении русских рысаков скрещивание с представителями американской стандартбредной породы, а в последние годы и с французской рысистой достигло серьезных масштабов, результаты этой работы требуют тщательного анализа. По итогам ДНК-тестирования 926 голов лошадей русской рысистой породы был проведен популяционно-генетический анализ по следующим показателям: частота встречаемости типов и аллелей 17 исследуемых локусов микросателлитов ДНК, уровень полиморфности (Ae), степень наблюдаемой (Ho) и ожидаемой (He) гетерозиготности. Были определены эффективное число аллелей в каждом локусе и коэффициент инбридинга субпопуляций (Fis). При генотипировании лошадей русской рысистой породы по 17 панельным STR-локусам было установлено 144 аллеля. При этом число аллелей в локусах варьировало от 4 (HTG7) до 14 (ASB17). Среднее значение числа эффективных аллелей на локус составило 3,79. Из всего обследованного поголовья 67% лошадей оказались носителями генотипа HTG7 OO. Проведенный анализ продемонстрировал стабильность генетической структуры и высокий уровень консолидации аллелофонда.

Лошади, русская рысистая порода, призовые породы рысаков, генетический мониторинг, генетический маркер, микросателлиты ДНК, аллель, локус.

Самой распространенной среди всех заводских конских пород России, а также самой молодой из четырех рысистых пород является русская рысистая порода, которая была утверждена в 1949 году. История создания и совершенствования данной породы делится на три периода. Первый период (1927–1948 гг.) – целенаправленная работа с орлово-американскими помесями для получения новой породы. Вторым (1949–1962 гг.) – чистопородное разведение и улучшение спортивных и племенных качеств лошадей русской рыистой породы. Третий (по настоящее время) – повышение резвости породы путем вторичного «прилития крови» американского рысака [1].

В последнее время особенно возрос интерес частных владельцев и к чистопородному разведению американского рысака, что стало причиной роста импорта лошадей этой породы из разных стран Европы и США. Также увеличился объем импорта французских рысаков, отличающихся выдающимися стайерскими способностями. Среди всех европейских рысаков французский является самым мощным, став соперником «американцу».

К сожалению, в последнее время в погоне за резвостью в русской рыистой породе все чаще прибегают к безудержному, нарастающему, порой бессмысленному использованию рысаков американской стандартбредной породы, что очень часто не соответствует требованиям плана племенной работы с породой. В итоге порода русских рысаков, созданная одаренными зоотехниками-селекционерами, теряет свое консолидированное происхождение и становится обычной высококровной американской помесью. В разведении русских рысаков использование скрещивания с представителями американской стандартбредной породы, а в последние годы и с французской рыистой достигло существенных масштабов. Результаты этой работы требуют тщательного анализа.

В нынешних условиях из-за усилившейся ориентации на беговой спорт отбор по работоспособности приобретает все большее значение в совершенствовании русской рыистой породы лошадей. Призовая работоспособность – это обусловленный действием всего генотипа сложный количественный признак. К тому же на ее проявление значительное влияние оказывают факторы внешней среды. Поэтому, чтобы увеличить эффективность отбора животных в производящий состав по данному признаку, нужна максимально возможная точность его оценки.

В области прикладной и фундаментальной генетики животных есть направление, получившее название «маркер-вспомогательная селекция». Генетические маркеры – незаменимый материал для выявления широты популяционной и видовой изменчивости, изучения филогенеза, степени генетического сходства и дальнейшей микроэволюции пород животных.

Внедрение системы генетического контроля происхождения в практику коннозаводства позволило сформировать фундаментальную базу данных генетических маркеров лошадей разных пород, что обусловило необходимость исследования возможностей применения маркерной селекции в коневодстве. В связи с этим мониторинг генетического разнообразия конских пород и изучение процессов формирования аллелофондов селекционируемых популяций на основе полученной генотипической информации приобретают высокую значимость [2].

Исследования аллелофонда русской рыистой породы лошадей по полиморфным системам крови, проводимые в разные годы российскими учеными, показали, что она характеризуется высоким уровнем полиморфизма [3; 4], но при этом у породы сохраняется своя генетическая структура.

В конце двадцатого века стало понятно, что выборка из десятка полиморфных мар-

керов групп крови и белков недостаточна для характеристики генома в целом. Начался поиск новых маркеров, увеличилось количество исследуемых популяций для получения более целостной картины.

Одним из современных и эффективных способов изучения генетических особенностей популяций является метод, основанный на использовании различных ДНК-маркеров. Наиболее часто в генетике применяются микросателлиты ДНК, или STR-маркеры (Short Tandem Repeats – короткие tandemные повторы). Микросателлиты состоят из небольших участков ДНК длиной 1–6 пар оснований, которые tandemно повторяются много раз. В научной литературе первое описание микросателлитной ДНК у лошади появилось в начале 90-х годов XX века [5]. На сегодняшний день в геноме лошади идентифицировано более 24 тыс. микросателлитных локусов. Многие из этих локусов имеют десятки аллелей, отличающихся друг от друга числом tandemных повторов [6; 7]. В первую очередь этот тип маркеров применяется при индивидуальной идентификации и при контроле происхождения, также при составлении генетических карт для характеристики генетической структуры популяций, оценки межпородного и внутривидового генетического разнообразия.

В связи с малочисленностью представителей целого ряда пород задача рационального использования и сохранения генетических ресурсов, осуществляемая путем ведения постоянного генетического мониторинга, особенно актуальна в российском коневодстве.

Проведенные у нас в стране и за рубежом исследования последних лет [8–13], показали наличие типичных породных особенностей полиморфизма микросателлитной ДНК. Известно, что в породах лошадей, как правило, существует определенная генетическая дифференциация на уровне субпопуляций и линейной структуры. В отличие

от крупномасштабной селекции в других отраслях животноводства практикуемая в племенном коневодстве индивидуальная система подбора и отбора, само собой, способствует поддержанию генетической дифференциации представителей разных линий и сложившейся генеалогической структуры в целом.

Современные ДНК-технологии дают возможность выявления особенностей геномов как отдельных особей, так и родственных групп сельскохозяйственных животных непосредственно по полиморфизму последовательности ДНК [14].

Целью данной работы являлось изучение генетических особенностей современного поголовья отечественной популяции лошадей русской рысистой породы с использованием ДНК-маркеров, что дало возможность выявить редкие, а также наиболее типичные аллели, присущие представителям этой породы. При условии накопления достаточного количества данных о генотипах лошадей отечественной популяции еще двух призовых пород (американской стандартбредной и французской рысистой пород) станет возможным обнаружить редкие аллели, характерные для каждой из пород, и построить генетический профиль пород.

Материал и методика исследований

Материалом для научных исследований стали данные ДНК-генотипирования 926 голов лошадей русской рысистой породы.

Исследования были проведены в лаборатории генетики ФГБНУ «ВНИИ коневодства». В работе использовались автоматический 4-капиллярный генетический анализатор ABI 3130 фирмы Applied Biosystems, набор стандартных праймеров, стандартное лабораторное оборудование лаборатории генетики ВНИИ коневодства. Генотипирование осуществлялось по 17 локусам ДНК: VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1, CA425.

ДНК выделялась из волосяных луковиц и цельной крови с помощью наборов «ExtraGene™ DNA Prep 200» и «Diatom™ DNA Prep 200» (ООО «Лаборатория Изоген», Москва). Амплификация STR-участков ДНК проводилась с использованием 17-плексного набора для генотипирования лошадей российского производства – Equine-STR (ООО «ГорДиз», г. Москва), оптимизированного для работы на автоматизированном лабораторном оборудовании. Разделение и детекция продуктов амплификации была проведена методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе AB 3130 (Applied Biosystems). После сбора данных электрофореза с помощью программы GeneMapper™ V.4 рассчитывались размеры амплифицированных фрагментов ДНК. Интерпретация результатов осуществлялась с использованием профиля контрольной ДНК с известным генотипом и данных международных сравнительных испытаний (Horse Comparison Tests), проводимых ISAG. Для обозначения аллелей применялся международный алфавитный код.

При изучении генетических характеристик представителей русской рысистой породы был проведен популяционно-генетический анализ по показателям частот встречаемости типов и аллелей 17 исследуемых локусов микросателлитов, уровню полиморфности (Ae), степени наблюдаемой (Ho) и ожидаемой (He) гетерозиготности. Также было рассчитано эффективное число аллелей в каждом локусе и коэффициент инбридинга субпопуляций (Fis). Математическую обработку проводили при помощи компьютерной программы MS Excel 2010.

Результаты исследований

Русские рысаки отличаются высоким уровнем генетического разнообразия микросателлитных локусов. При генотипиро-

вании лошадей русской рысистой породы по 17 панельным STR-локусам было найдено 144 аллеля, при этом число аллелей в локусах варьировало от 4 (HTG7) до 14 (ASB17) (табл. 1). Для генетической структуры русской рысистой породы характерна сравнительно высокая частота встречаемости аллелей АНТ4 О (0,554), HMS7 L (0,498), HTG6 J (0,483), АНТ5 J (0,399), HTG10 I (0,549), HTG7 О (0,818), HMS3 Р (0,469) (рис.).

Таблица 1. Аллели, идентифицированные у лошадей русской рысистой породы

№	Локус	Количество аллелей	Аллели
1	VHL20	7	I, L, M, N , <i>O, P, R</i>
2	HTG4	7	K , L, M, N, <i>O, P, Q</i>
3	АНТ4	9	H, I, J, K, L, M, N, O , P
4	HMS7	8	J, K, L, M, N , <i>O, P, Q</i>
5	HTG6	7	G, <i>I, J</i> , M, N, <i>O, P</i>
6	АНТ5	7	<i>I, J, L</i> , M, N, O
7	HMS6	6	K, L, M, N, O , P
8	ASB23	10	<i>G, I, J, K, L, N, R, S, T, U</i>
9	ASB2	10	<i>B, I, K, L, M, N, O, P, Q, R</i>
10	HTG10	11	<i>H, I, K, L, M, N, O, P, Q, R, S</i>
11	HTG7	4	<i>K, M, N, O</i>
12	HMS3	9	<i>I, L, M, N, O, P, Q, R, S</i>
13	HMS2	11	<i>H, I, J, K, L, M, O, P, Q, R, S</i>
14	ASB17	14	<i>F, G, H, I, J, K, L, M, O, P, Q, R, S</i>
15	LEX3	9	F, H, <i>I, K, L, M</i> , N, O, P
16	HMS1	8	<i>G, I, J, K, L, M, N, Q</i>
17	CA425	7	F, <i>I, J</i> , K, M, N , O

Примечание: жирным шрифтом отмечены аллели с частотой встречаемости более 0,20; курсивом отмечены редкие аллели с частотой встречаемости менее 0,05.
Составлено по: результаты собственных исследований.

При оценке разнообразия генетической структуры популяции важный показатель – количество и частота встречаемости генотипов в том или ином STR-локусе. Самыми часто встречающимися представителями в русской рысистой породе являются лошади с генотипом HTG7 OO (67%). Данный локус насчитывает только 10 вариаций полимор-

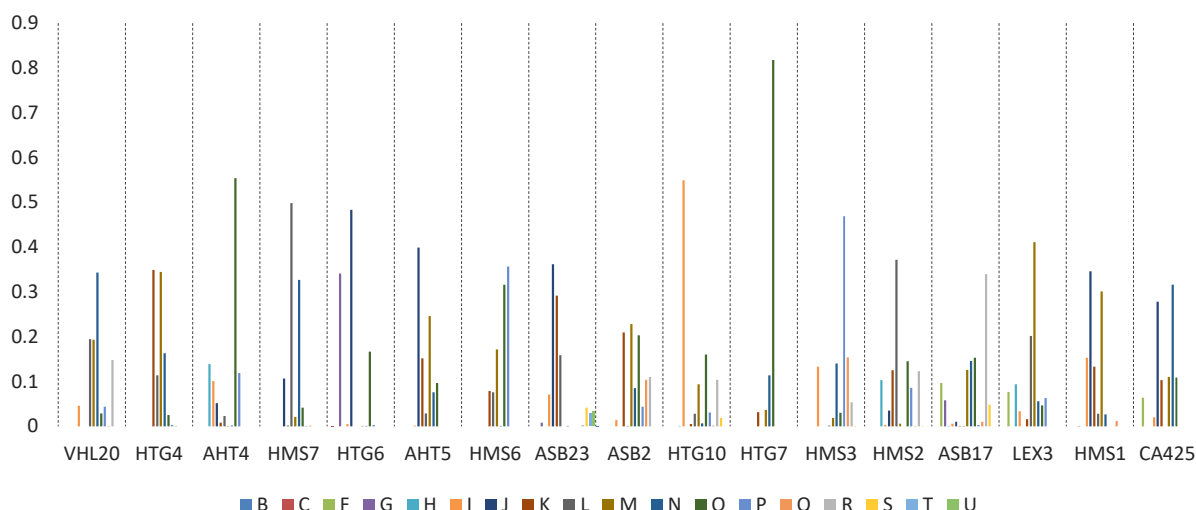


Рис. Частота встречаемости аллелей 17 локусов микросателлитов ДНК у лошадей русской рысистой породы

Составлено по: результаты собственных исследований.

физма. Самым большим количеством генотипов отличился локус ASB17 (54 генотипа). Также в обследованной популяции рысаков отмечены такие часто встречающиеся генотипы, как GJ (33%) и JJ (23%) – в локусе HTG6, HMS7 LN (31%), HTG10 (31%), HTG4 KM (34%), HMS3 PP (22%), HMS6 OP (21%), AHT5 JM (21%).

Наибольший интерес представляет исследование полиморфности локуса LEX3, который расположен на X-хромосоме и характеризует разнообразие популяции по материнской линии. Тестирование лошадей русской рысистой породы в этом локусе выявило 9 аллелей из 12 входящих в международный номенклатурный перечень [15]. Самая большая частота встречаемости отмечена у аллеля LEX3 M (0,411), при этом 1/5 часть изученного поголовья лошадей имеет генотип LEX3 LM.

С точки зрения сохранения генетического внутривидового разнообразия наибольший интерес представляет среднее число эффективных аллелей по всем изученным локусам или средний уровень полиморфности (NV). В русской рысистой породе среднее значение числа эффективных аллелей на локус составило 3,79, при этом уровень полиморфности тестируемых

локусов (Ae) менялся в широком диапазоне от 1,46 (HTG7) до 5,98 (ASB2). В этих же локусах была зарегистрирована минимальная 0,318 (HTG7) и максимальная 0,839 (ASB2) степень наблюдаемой (Ho) гетерозиготности. В целом по породе был определен близкий к нулю показатель внутривидового инбридинга Fis (0,002), который означает небольшой дефицит гетерозиготных генотипов (табл. 2). Это указывает на стабильность генетической структуры данной популяции.

Выводы

1. Мониторинг динамики генетических характеристик в русской рысистой породе, проведенный на базе типирования 925 голов лошадей по 17 локусам микросателлитов ДНК, продемонстрировал высокий уровень генетической вариабельности в популяции.

2. Было выявлено большое количество (144) аллелей, при этом число аллелей в локусах варьировало от 4 (HTG7) до 14 (ASB17).

3. Наибольшую часть обследованного поголовья рысаков (67%) составляют носители гена HTG7 OO, пятая часть лошадей имеет генотип LEX3 LM.

Таблица 2. Генетическая характеристика полиморфизма лошадей русской рысистой породы по 17 микросателлитам ДНК

Локус	Уровень полиморфности	Степень гетерозиготности		Индекс фиксации Fis
		наблюдаемая H_o	ожидаемая H_e	
VHL20	4,5310	0,7957	0,7793	-0,0210
HTG4	3,5555	0,7632	0,7187	-0,0619
ANT4	2,8168	0,6432	0,6450	0,0027
HMS7	2,7139	0,6086	0,6315	0,0362
HTG6	2,6490	0,6195	0,6225	0,0049
ANT5	3,8706	0,7405	0,7416	0,0015
HMS6	3,7275	0,7304	0,7317	0,0018
ASB23	3,9843	0,7459	0,7490	0,0041
ASB2	5,9059	0,8385	0,8307	-0,0094
HTG10	2,8590	0,6497	0,6502	0,0008
HTG7	1,4609	0,3184	0,3155	-0,0092
HMS3	3,5185	0,7183	0,7158	-0,0035
HMS2	4,7689	0,7716	0,7903	0,0237
ASB17	5,2185	0,7306	0,8084	0,0963
LEX3	4,2534	0,7695	0,7649	-0,0060
HMS1	3,9528	0,7744	0,7470	-0,0367
CA425	4,6257	0,7819	0,7838	0,0025
В среднем	3,7890	0,7059	0,7074	0,0016

Составлено по: результаты собственных исследований.

A_e – уровень полиморфности;

N_V – среднее количество аллелей в исследуемых локусах;

H_o – степень наблюдаемой гетерозиготности;

H_e – степень ожидаемой гетерозиготности;

Fis – показатель внутривидового инбридинга.

4. В целом по породе был определен близкий к нулю показатель внутривидового инбридинга Fis (0,002), что указывает на стабильность генетической структуры данной популяции.

Полученные данные в дальнейшем будут использованы при сравнении с аллело-

фондом американской стандартбредной и французской рысистой пород, генетическая база данных по которым в настоящее время пополняется. А также полученные результаты будут применены при расчете доли «примеси крови» данных пород (американской и французской рысистых) к исходной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гавриличева И.С. Генетическая характеристика отечественной популяции призовых рысаков // Проблемы и перспективы развития животноводства: мат-лы Междунар. науч.-практ. конф., посв. 85-летию биотехнол. фак. Витебск: ВГАВМ, 2018. URL: <http://www.vsavm.by>
2. Храброва Л.А. Теоретические и практические аспекты генетического мониторинга в коневодстве: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.02.07. Дивово, 2011. 38 с.

3. Дубровская Р.М., Стародумов И.М., Банникова Л.В. Генетическая дифференциация пород лошадей по полиморфным локусам белков в крови // Генетика. 1992. Т. 28. № 4. С. 152–165.
4. Николаева Н. Влияние американского рысака на формирование генетической структуры и выраженность хозяйственно-полезных признаков у лошадей русской рысистой породы: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.02.01. ВНИИК Рязанской обл., 2004. 16 с.
5. Ellegren H. [et al.]. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Animal Genetics*, 1992, no. 23, pp. 133–142.
6. Chowdhary B.P. *Equine genomics*. Wiley-Blackwell, 2013. 36 p.
7. Bailey E.F., Bailey S.A. *Horse genetics*. Brooks. CABI, 2013. 272 p.
8. Долматова И.Ю. Нияштин Ф.И., Уразбазбахтин Р.Ф. Популяционно-генетическая характеристика лошадей башкирской породы по микросателлитам ДНК // Коневодство и конный спорт. 2017. № 4. С. 18–19.
9. Разработка методических подходов оценки уровня обмена генетическим материалом при анализе орловской рысистой породы по микросателлитам ДНК / А.М. Зайцев [и др.] // Коневодство и конный спорт. 2012. № 5. С. 8–9.
10. Полиморфизм микросателлитной ДНК у лошадей заводских и локальных пород / В.В. Калашников [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 2. С. 41–45.
11. Генетическая характеристика якутской лошади / Л.В. Калинкова [и др.] // Коневодство и конный спорт. 2015. № 1. С. 22–23.
12. Оценка генетического разнообразия микросателлитных локусов у лошадей тяжелоупряжных пород / Н.В. Блохина [и др.] // Генетика и разведение животных. 2018. № 2. С. 39–43.
13. Seo J.-H. [et al.]. Genetic diversity of Halla horses using microsatellite markers. *Journal of Animal Science and Technology*, 2016, vol. 58, no. 40.
14. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. М.: РАСХН, 2008. 501 с.
15. Van de Goor L.H.P., Panneman H., Van Haeringen W.A. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci. *Animal Genetics*, 2010, no. 41 (2), pp. 122–127 (6).

Сведения об авторе

Ирина Сергеевна Гавриличева – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства». Российская Федерация, 391105, Рязанская обл., Рыбновский р-н, пос. Институт коневодства; e-mail: labgenetics79@gmail.com

GENETIC AND POPULATION CHARACTERISTICS OF RUSSIAN TROTTING HORSE BREED BY DNA MICROSATELLITE LOCI

Gavrilicheva I.S.

The aim of the research is to study the genetic characteristics of the modern population of Russian trotting horses using DNA markers. The study revealed rare and also the most characteristic alleles inherent for the representatives of this breed. In the future, if the sufficient data is accumulated, it will be possible to construct genetic profiles of the three factory prize breeds (American, French and Russian trotting breeds) at the present stage. Russian trotting breed is the most common of all factory breeds in Russia. In the current conditions, due to the increased focus on race sports, the selection by performance is becoming increasingly important in improving the Russian trotting breed of horses. Prize performance is a complex quantitative trait caused by the action of the whole genotype. So, in breeding Russian trotters, crossing with the representatives of the American standardbred breed, and in recent years with the French trotter, has acquired a serious scale; the results of the work require careful analysis. Based on the results of 926 Russian trotting breed horses' DNA testing, the population-genetic analysis was carried out on the following indicators, the frequency of types and alleles of 17 studied DNA microsatellites loci, the level of polymorphism (A_e), the degree of observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity. The effective number of alleles at each locus and the subpopulation inbreeding coefficient (F_{is}) were determined. When genotyping Russian trotting breed horses on 17 panel STR-loci 144 alleles were established. The number of alleles in the loci varied from 4 (HTG7) to 14 (ASB17). The average number of effective alleles per locus was 3.79. 67% of horses of the total surveyed livestock appeared to be the carriers of the HTG7 OO genotype. The analysis demonstrated the stability of the genetic structure and a high level of consolidation of the allelofund.

Horses, Russian trotting breed, prize breeds of trotters, genetic monitoring, genetic marker, DNA microsatellites, allele, locus.

Information about the author

Irina S. Gavrilicheva – Ph.D. in Agricultural Science, Senior Research Associate, Federal State Budgetary Scientific Institution “All-Russian Research Institute of Horse Breeding”. Institute of Horse Breeding, Rybnovsky District, Ryazan Oblast, 391105, Russian Federation; e-mail: labgenetics79@gmail.com