

ДНК-МИКРОСАТЕЛИТЕН АНАЛИЗ НА ПОПУЛАЦИЯТА ЧИСТОКРЪВНА АНГЛИЙСКА ПОРОДА КОНЕ В БЪЛГАРИЯ. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БРОЯ И ЧЕСТОТАТА НА АЛЕЛИТЕ ПО ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЛОКУСИ

РАДКА ВЛАЕВА

Тракийски университет, Аграрен факултет – Стара Загора

В съвременния етап ДНК маркерите се използват за молекулярно–генетична характеристика на популациите животни в различни направления. Основните насоки, в които тези маркери намират широко приложение са анализ на генетичното разнообразие вътре в популациите, генетични сходства и различия между отделни популации и генетични връзки между тях. В частност доказването на произхода при конете от Чистокръвна английска порода чрез ДНК маркерите е задължително изискване в световен мащаб.

Едни от най-популярните маркери при изследване на генетичните характеристики на популациите домашни животни са микросателитите (Sunnucks, 2001; Georgieva et al., 2013). Високата им скорост на мутиране и кодоминантен характер на унаследяване са основната причина за тяхната актуалност. Генетичното разнообразие в редица проучвания при популациите коне е най-често срещаната тема на проучване при редица автори. Така например чрез отчитане броя на алелите и тяхната честота по локуси **Bowling et al.** (2003) анализират генетичното разнообразие на коне Пржевалски и ги сравняват с десет културни породи коне. **Leroy et al.** (2009) проучват генетичното разнообразие и структурата на породи коне, отглеждани във Франция. Подобни проучвания при коне от Чистокръвна английска порода правят и **Georgescu & Costache** (2012) в Румъния, **Silva et al.** (2012) - в Бразилия, **Zabek et al.** (2003) - в област Силезия, **Lee et al.** (2006, 2010) - в Корея, **Jakabova et al.** (2002) - в Словакия, **Choi**

et al. (2012) - отново в Корея. Особено актуално е проучването на **Bower et al.** (2011), които чрез анализ на ДНК маркерите отхвърлят тезата за източен произход на кобилите основоположнички на фамилии при създаването на Чистокръвната английска порода. У нас **Barzev et al.** (2010) изследват генетичното разнообразие при Чистокръвна английска порода по 13 микросателитни локуса. Детайлно проучване на броя на наблюдаваните алели и алелни честоти по основните линии в породата не е провеждано у нас.

Целта на настоящото проучване бе да се установят броя алели и алелни честоти по локуси в популацията коне от Чистокръвна английска порода в страната ни. В тази връзка бяха отчетени наблюдавания и ефективен брой алели и техните честоти по локуси при пет от основните линии в популацията.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването обхваща 157 броя коне от Чистокръвна английска порода, включени в племенната книга и регистъра на породата. От всяко животно бе взета проба косми от гривата. Изолирането на ДНК и микросателитния анализ бяха извършени в лабораторията Gene Control GmbH в град Груб, близо до Мюнхен, Германия от екипа на проф. д-р М. Форстер.

Използваните 13 микросателитни локуса са както следва: АНТ4, АНТ5, АSB2, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, НТG4, НТG6, НТG7, НТG10 и VHL20. Честотите на алелите

и генотиповете бяха изчислени с програмата POPGENE v. 1.31.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В популацията от Чистокръвна английска порода у нас установихме общо 72 броя алели във всички изследвани 13 локуса. Броят на установените алели по отделните локуси варира от 3 (HMS1, HTG7) до 9 (ASB2).

При други проучвания в локус АНТ4 се съобщава за 11 отделни алела, а при нашето проучване на популацията от чистокръвни английски коне у нас по този локус открихме само 5 от тях. В локус АНТ5 от общо 9 алела, а при нашата популация установихме 6 от тях. При локус ASB2 са наблюдавани 9 алела от всичко 15. При локус HMS1 са наблюдавани само 3 алела от общо 8, а в локус HMS2 наблюдаваните алели са 7 от 12. В локусите HMS3 и HMS6 са наблюдавани по 5 алела от съответно 10 и

7. При HMS7 от общо 8 алела при популацията у нас са наблюдавани 6 от тях. В локусите HTG4 и HTG6 са наблюдавани 5 и 4 алела от съответно 7 и 9. При HTG7 от общо 5 алела в нашата популация се срещат 3 от тях. В локусите HTG10 и VHL20 са наблюдавани по 7 алела от съответно 13 и 10. Данните за броя на алелите по проучваните 13 SSR локуса за цялата изследвана популация са представени в табл.1. Анализът на получените резултати показва вариране в броя на наблюдаваните алели от 3 в локусите HMS1 и HTG7 до 9 броя в локус ASB2, което го определя като най-високо полиморфен локус в популацията. Освен в локус ASB2 висока полиморфност се установява и в локуси HMS2, HTG10 и VHL20 с по 7 броя наблюдавани алели, АНТ5 и HMS7 с по 6 броя наблюдавани алели. Средната стойност за броя на наблюдаваните алели за проучваната популация от Чистокръвна английска порода коне у нас е 5.6154. Значително вариране се

Таблица 1. Брой алели в изследваните 13 SSR локуси в популацията коне от Чистокръвна английска порода

Table 1. Number of alleles in the studied 13 SSR loci in the Thoroughbred horse population

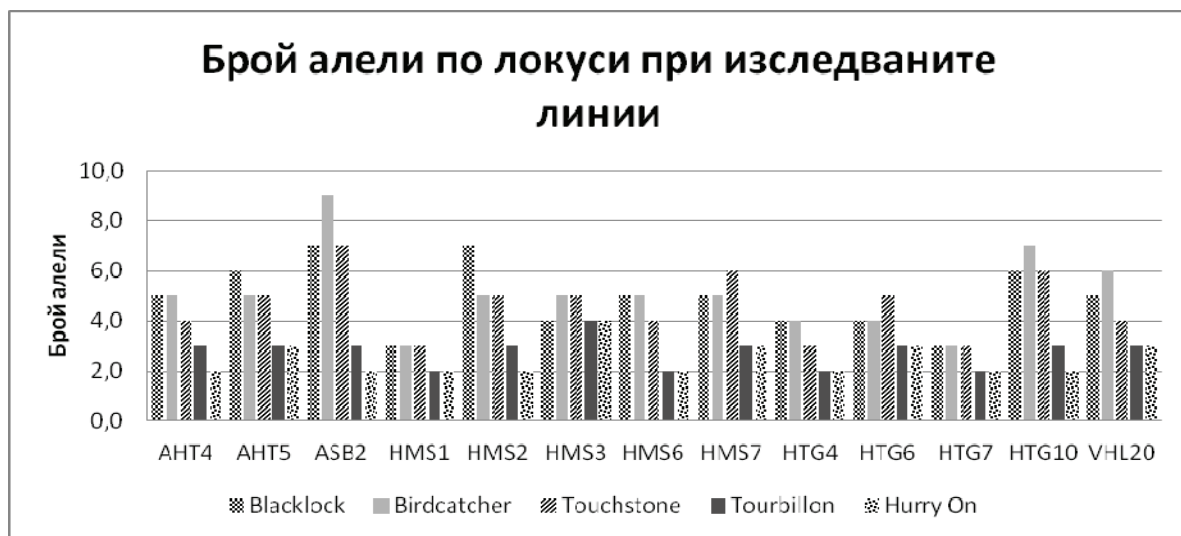
Локус	Наблюдаван брой алели (na)	Ефективен брой алели (ne)	Индекс на Шанън (I)*
АНТ4	5.000	3.3753	1.3202
АНТ5	6.000	3.7327	1.4147
ASB2	9.000	5.4108	1.8630
HMS1	3.000	2.4583	0.9780
HMS2	7.000	2.8658	1.3028
HMS3	5.000	3.6650	1.4250
HMS6	5.000	2.7217	1.1881
HMS7	6.000	4.6777	1.5889
HTG4	5.000	2.3441	0.9958
HTG6	5.000	2.9576	1.1906
HTG7	3.000	2.7398	1.0499
HTG10	7.000	3.6047	1.5393
VHL20	7.000	3.4036	1.3582
Mean	5.6154	3.3813	1.3242
St. Dev	1.6602	0.8791	0.2527

* Индексът на Шанън (I) е мярка за вътрешнопородното генетично разнообразие и е индикатор за информативността на маркерите. От представените в таблицата данни се вижда, че той варира от 0.9780 до 1.8630, със средна стойност 1.3242.

Таблица 2. Честота на алелите от микросателитния ДНК полиморфизъм по локуси за цялата изследвана популация

Table 2. Allele frequencies of microsatellite DNA polymorphism across loci for the whole studied population

Локус	Брой алели	Алели / Честоти									
АНТ4	5	H (0.1378)	I (0.0064)	J (0.1635)	K (0.2724)	O (0.4199)					
АНТ5	6	J (0.2548)	K (0.3758)	L (0.0032)	M (0.1975)	N (0.1497)	O (0.0191)				
ASB2	9	B (0.0096)	I (0.0032)	K (0.3248)	M (0.1083)	N (0.0987)	O (0.1051)	P (0.0924)	Q (0.1783)	R (0.0796)	
HMS1	3	I (0.1338)	J (0.3503)	M (0.5159)							
HMS2	7	H (0.1401)	J (0.0605)	K (0.2166)	L (0.5255)	M (0.0510)	O (0.0032)	R (0.0032)			
HMS3	5	I (0.4076)	M (0.1783)	N (0.0478)	O (0.1306)	P (0.2357)					
HMS6	5	K (0.1083)	L (0.0732)	M (0.2898)	O (0.0127)	P (0.5159)					
HMS7	6	J (0.1274)	K (0.0032)	L (0.1847)	M (0.1752)	N (0.2930)	O (0.2166)				
HTG4	5	K (0.4427)	L (0.0127)	M (0.4777)	N (0.0287)	P (0.0382)					
HTG6	5	G (0.3726)	J (0.4108)	M (0.0446)	O (0.1688)	P (0.0032)					
HTG7	3	K (0.2070)	N (0.3344)	O (0.4586)							
HTG10	7	I (0.4618)	K (0.0637)	L (0.0860)	M (0.1656)	O (0.1338)	P (0.0032)	R (0.0860)			
VHL20	7	I (0.1943)	J (0.0064)	L (0.1465)	M (0.4363)	N (0.2102)	O (0.0032)	R (0.0032)			



Фиг.1. Разпределение на броя алели по локуси при изследваните линии

Fig. 1. Allele distribution across loci in the studied sirelines

установява и при броя на ефективните алели от 2.3441 при локус HTG4 до 5.4108 при най-полиморфния локус ASB2. Средната стойност за броя на ефективните алели за популацията като цяло е 3.3813.

Установените от нас алели в изследваните 13 локуса значително варират между отделните линии (фиг.1). Най-близки резултати са установени при линиите на жребците Блеклок и Бърдкечър. Това са линиите с най-голям брой представители в популацията коне от Чистокръвна английска порода в България. И при двете линии общия брой установени алели по всички 13 локуса е 64 броя. На следващо място по брой установени алели се нарежда линията на Тъчстоун (60 алела), следвана от линията на Турбийон с 36 установени алела и тази на Хъри Он с 32 алела.

В локус АНТ4 установените 5 броя алели напълно съвпадат (Н, I, J, K, O) при линиите на Блеклок и Бърдкечър. При линията на Тъчстоун алелът I не е установен и броят на алелите в този локус е 4. При линията на Турбийон в този локус присъстват само алели J, K и O, а при тази на Хъри Он само алели K и O. Локус АНТ5 е най-високо полиморфен при линията на Блеклок с 6 установени алела (J, K, L, M, N, O). Броят на алелите при линиите на Бърдкечър и Тъчстоун е 5, като при тези две линии алел L не е открит.

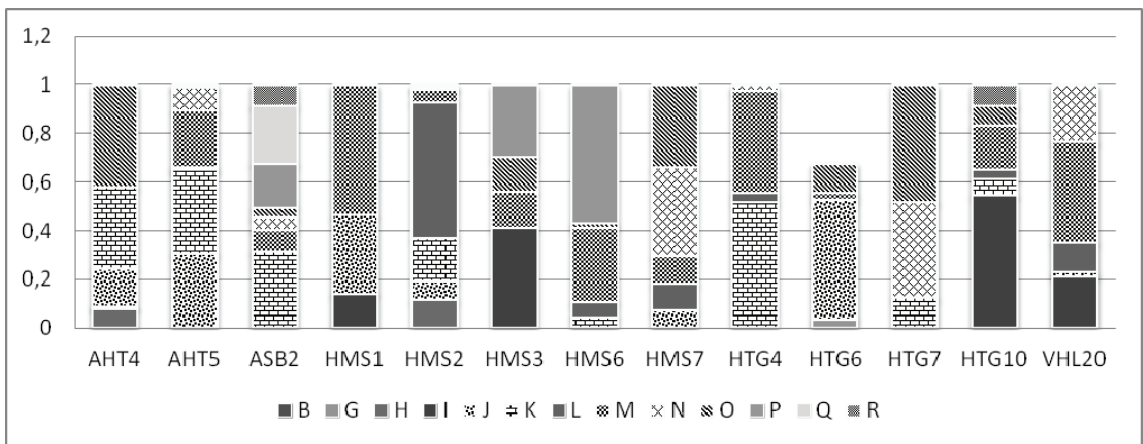
При линията на Турбийон по този локус са налични само алелите K, M и N, а при линията на Хъри Он трите установени алела са J, K и M. При линиите на Блеклок и Тъчстоун в локус ASB2 са наблюдавани по 7 алела (K, M, N, O, P, Q, R). В линията на Бърдкечър освен посочените седем алела са отчетени още два, които не се срещат при другите линии, а именно алели V и I. При линията на Турбийон в този локус алелите са 3 (N, Q и R), а при тази на Хъри Он са установени само два алела – N и Q. В локус HMS1 при линиите на Блеклок, Бърдкечър и Тъчстоун са установени по три идентични алела (I, J и M), докато при линията на Турбийон са отчетени само алели I и M, а при тази на Хъри Он – J и M. В локус HMS2 най-голям брой алели са установени при представителите на линията на Блеклок, това са алели H, J, K, L, M, O и R. При линиите на Бърдкечър и Тъчстоун това са алелите H, J, K, L и M, алелите O и R при представителите на тези две линии не се наблюдават. Само два са откритите алела в този локус при линията на Хъри Он (K и L), а при линията на Турбийон са установени три алела – H, K и L. Локус HMS3 е представен с най-голям брой алели (5 броя) при линиите на Бърдкечър и Тъчстоун. Това са алелите I, M, N, O и P. Останалите три линии, включени в нашето проучване са представени в този локус от

по 4 алела, които варират в отделните линии. За линията на Блеклок това са алелите I, M, O и P, за линията на Турбийон - алели I, M, N и O, а за линията на Хъри Он това са I, N, O и P. Наблюдаваният брой алели при линиите на жребците Блеклок и Бърдкечър при локус HMS6 съвпадат напълно. Това са петте алела K, L, M, O и P. При линията на Тъчстоун алел O не е наличен, а са установени само 4 от горепосочените 5 алела, наблюдавани при другите две линии. При линиите на Турбийон и Хъри Он в този локус са налични само два алела – M и P. В локус HMS7 най-висок брой от шест алела (J, K, L, M, N, и O) е установен при линията на Тъчстоун. Алел K не е наблюдаван при никоя от другите 4 линии. При линиите на Блеклок и Бърдкечър са установени по 5 алела, които съвпадат с установените при линията на Тъчстоун с изключение на алел K. При представителите на линията на Турбийон са установени алелите J, L и M, а за линията на Хъри Он трите наблюдавани алела са L, M и N. В локус HTG4 при линията на Блеклок установените алели са K, L, M и N. При линията на Бърдкечър наблюдаваните алели са също 4 на брой, но алел L не е наличен, а е отчетен допълнителен алел P. При линията на Тъчстоун са установени алелите K, M, и N, а при линиите на Турбийон и Хъри Он само алели K и M. Най-голям брой установени алели в локус HTG6 има при линията на Тъчстоун, това са петте алела G, J, M, O и R. Алел R е установен само при представителите на тази линия. Линиите на Блеклок и Бърдкечър в този локус имат само по 4 алела (G, J, M и O). При линията на Турбийон са наблюдавани само алелите G, J и M, а при тази на Хъри Он G, M и O. В локус HTG7 при три от линиите, тези на Блеклок, Бърдкечър и Тъчстоун са установени трите алела K, N и O. При другите две линии – на Турбийон и Хъри Он в този локус са установени само двата алела N и O. В локус HTG10 най-голям брой алели е наблюдаван при линията на Бърдкечър – I, K, L, M, O, P и R. При линиите на Блеклок и Тъчстоун са установени 6 от посочените по-горе 7 алела, като алел P не е наблюдаван. При линията на Турбийон в този локус са отчетени три алела –

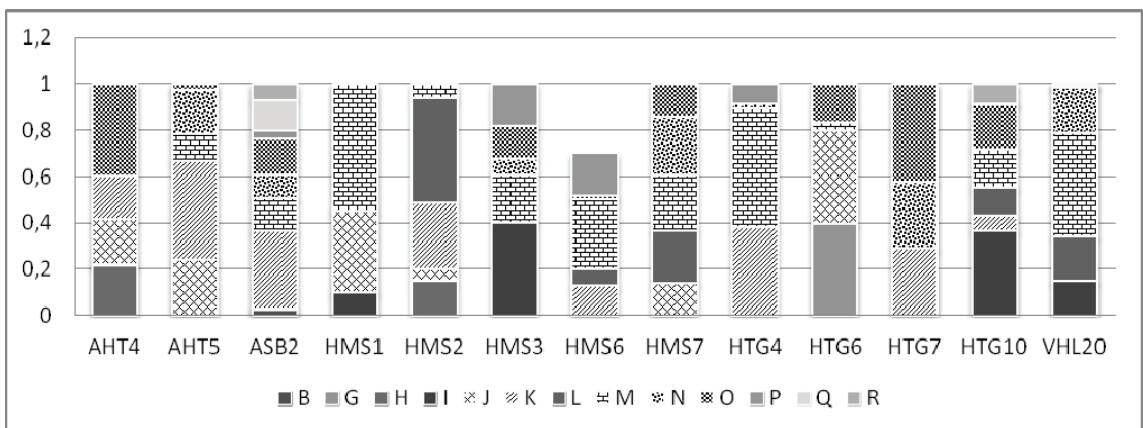
I, L и R, а при линията на Хъри Он единствено двата алела I и M. Локус VHL20 е най-високо-полиморфен при представителите на линията на Бърдкечър с шест установени алела (I, L, M, N, O, R). При линията на Блеклок наблюдаваните алели са 5 броя (I, J, L, M, N). За линията на Тъчстоун са установени алелите I, L, M и N, а за тази на Турбийон I, L и M. В този локус при представителите на линията на Хъри Он са наблюдавани само алелите I, M и N.

Броят на алелите и алелните честоти по всички проучвани локуси за цялата популация е представен в табл. 2. По установената висока полиморфност при по-голяма част от локусите съдим за наличието на значително високо генетично разнообразие в изследваната популация от Чистокръвна английска порода коне в страната ни. Относно честотите на алелите най-високи стойности са установени при 11 алела в 10 отделни локуса. Най-високата стойност (0.5255) е наблюдавана в алел L от локус HMS2, следван от алел M от локус HMS1 и алел P от локус HMS6 (0.5159), алел M от локус HTG4 (0.4777), алел I от локус HTG10 (0.4618), алел O от локус HTG7 (0.4586), алел K от локус HTG4 (0.4427), алел M от локус VHL20 (0.4363), алел O от локус АНТ4 (0.4199), алел J от локус HTG6 (0.4108) и алел I от локус HMS3 (0.4076). Най-ниска алелна честота (0.0032) е установена при 10 алела в 7 локуса: алел L от локус АНТ5, алел I от локус ASB2, алели O и R от локус HMS2, алел K от локус HMS7, алел P от локус HTG6, алел P от локус HTG10 и алелите O и R от локус VHL20. При алели I от локус АНТ4 и J от локус VHL20 е наблюдавана следващата най-ниска честота (0.0064), както и при алел V от локус ASB2 (0.0096). Най-широко вариране в стойностите на алелните честоти както при някой от линиите самостоятелно, така и за популацията като цяло има при локус HMS2 – от 0.0032 до 0.5255.

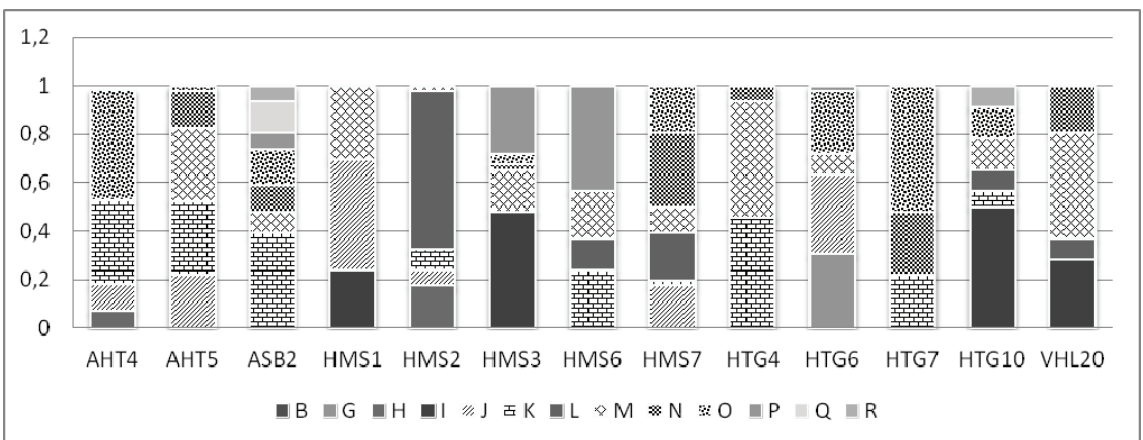
На фиг. 2, 3 и 4 са представени алелните честоти по всеки от изследваните локуси при трите линии с най-голям брой представители в популация у нас. Анализът на данните показва, че при линията на Блеклок с най-висока честота са: алел P от локус HMS6 (0.5702); алел L от



Фиг. 2. Честота на алелите по локуси при линията на Блеклок
 Fig. 2. Allele frequencies across loci in the Blacklock sireline



Фиг. 3. Честота на алелите по локуси при линията на Бърдкечър
 Fig. 3. Allele frequencies across loci in the Birdcatcher sireline



Фиг. 4. Честота на алелите по локуси при линията на Тъчстоун
 Fig. 4. Allele frequencies across loci in the Touchstone sireline

локус HMS2 (0.5614); алел I от локус HTG10 (0.5439); алел M от локус HMS1 (0.5351); алел K от локус HTG4 (0.5175). С най-ниска честота, 0.0088 са алелите I от локус АНТ4; L и O от локус АНТ5 и O и R от локус HMS2. В този локус (HMS2) се наблюдава най-високото вариране на алелните честоти – от 0.0088 до 0.5614. При линията на Бърдкечър най-високи честоти има при седем алела в седем отделни локуса: алел M от локус HMS1 (0.5493); алел M от локус HTG4 (0.5141); алел P от локус HMS6 (0.4859); алел L от локус HMS2 (0.4507); алел M от локус VHL20 (0.4507); алел O от локус HTG7 (0.4225) и алел K от локус АНТ5 (0.4296). Най-ниските стойности, отнасящи се до честотите на алелите са установени при алели I от локус ASB2; P от локус HTG10; O и R от локус VHL20 (0.0070) и при алел I от локус АНТ4 (0.0071). При линията на Тъчстоун с най-високи честоти са наблюдавани при осем алела в осем отделни локуса. Най-силно вариране на алелните честоти се установява при локус HMS2 – от 0.0217 до 0.6522, като тези стойности представят съответно най-ниската и най-високата стойност за линията като цяло. При алел O от локус HTG7 се наблюдава следващата по големина алелна честота (0.5217), следвана от алел I от локус HTG10 (0.5000), алели I и M от локусите HMS3 и HTG4 (0.4783) и алели O, J и K от локуси АНТ4, HMS1 и HTG4 (0.4565). С най-ниска алелна честота 0.0217 са алелите O от локус АНТ5, M от локус HMS2, N от локус HMS3, K от локус HMS7 и алел P от локус HTG6.

ИЗВОДИ

Броят на наблюдаваните алели по изследваните 13 локуса варира от 3 до 9. Най-високо полиморфен е локус ASB2 с 9 броя алели, следван от локусите HMS2, HTG10 и VHL20 с по 7 броя, а с най-нисък брой са локусите HMS1 и HTG7 с по 3 броя алели.

Установеният по линии наблюдаван брой алели варира значително, което показва наличието на генетично разнообразие в популацията от Чистокръвна английска порода коне у

нас. С най-висока честота са алелите L от локус HMS2, следван от алел M от локус HMS1 и алел P от локус HMS6. Най-широко вариране по алелни честоти както в популацията като цяло, така и при отделните линии има при локус HMS2 – от 0.0217 до 0.6522.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barzev, G., E. Zhelyazkov, V. Barzeva, D. Hristova, Zh. Sabev, 2010. Genetic diversity in Bulgarian Thoroughbred using microsatellite DNA markers.- *Agricultural science and technology* 2 (3), 116-120.

2. Bower, M. A., M. G. Campana, M. Whitten, C. J. Edwards, H. Jones, E. Barrett, R. Cassidy, R. E. R. Nisbet, E. W. Hill, C. J. Howe, M. Binns, 2011. The cosmopolitan maternal heritage of the Thoroughbred racehorse breed shows a significant contribution from British and Irish native mares. *Biol. Lett.* 7, 316-320.

3. Bowling, A. T., W. Zimmermann, O. Ryder, C. Penado, S. Peto, L. Chemnick, N. Yasinetskaya, T. Zharkikh, 2003. Genetic variation in Przewalski's horses, with special focus on the last wild caught mare, 231 Orlitza III.- *Cytogenet Genome Res.* 102(1-4), 226-234.

4. Choi, S. K., S. Y. Lee, G. J. Cho, 2012. Individual identification and parentage verification of Thoroughbred horses and the Korean native horses based on microsatellite loci in Korea.- *J. Anim. Vet. Adv.* 11 (15), 2647-2651.

5. Georgescu, S. E., M. Costache, 2012. Genetic characterization of Romanian local breeds using microsatellite markers.- *Analysis of Genetic Variation in Animals*, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0093-5, InTech, DOI:10.5772/32960.

6. Georgieva, S., E. Todorovska, D. Hristova, I. Dimitrova, N. Stancheva, Ts. Yablanski, 2013. Genetic diversity and distance between two Bulgarian local sheep breeds assessed by microsatellite markers. – *Agricultural Science and Technology* 5 (4), 367 – 370.

7. Jakabová, D., J. Trandžík, J. Chrastina, Ľ. Hudecová, E. Zetochová, J. Bulla, A. Bugarský, F. Jakab, P. Kozlík, 2002. Effectiveness of

six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases in Thoroughbred horses in Slovakia.-Czech J. Anim. Sci., 47 (12), 497–501.

8. Lee, J. E., J. H. Shin, Y. M. Yun, K. K. Lee, H. Lee, O. K. Kweon, Y. S. Yun, J. G. Suh, N. S. Shin, J. K. Seong (2010) - Genetic polymorphism of Jeju Horses by microsatellite DNA markers in Korea.- Lab. Anim. Res. 26 (2), 219-221.

9. Lee, S. Y., G. J. Cho, 2006. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing.- J. Vet. Sci. 7(1), 63–67.

10. Leroy, G., L. Callède, E. Verrier, J. C. Mériaux, A. Ricard, C. Danchin-Burge, X. Rognon, 2009. Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by microsatellite

polymorphism.- Genetics Selection Evolution, 41 (5), doi:10.1186/1297-9686-41-5.

11. Silva, A. C. M., S. R. Paiva, M. S. M. Albuquerque, A. A. Egito, S. A. Santos, F. C. Lima, S. T. Castro, A. S. Mariante, P. S. Correa, C. M. McManus, 2012. Genetic variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers.- Genet. Mol. Res. 11 (2), 881-890.

12. Sunnucks, P., 2001. Efficient genetic markers for population biology.- Tree 15, 199–203.

13. Zabek, T., M. Duniec, M. Bugno, 2003. Genetic relationships between Silesian, Thoroughbred and Oldenburg horses based on DNA microsatellite polymorphism.- Annals of Animal Science 3 (2), 213-224.

DNA - MICROSATELLITE ANALYSIS OF THE THOROUGHBRED HORSE POPULATION IN BULGARIA. DETERMINING THE NUMBER OF ALLELES AND ALLELE FREQUENCY IN STUDIED LOCI

R. Vlaeva

Thrakia University, Faculty of Agriculture - Stara Zagora

SUMMARY

The study includes 157 Thoroughbred horses enrolled either in the Bulgarian Thoroughbred Stud Book or in the Non-Thoroughbred Register of the breed. We examined the observed number of alleles and the allele frequency in 13 loci. The results were analyzed as for the whole population as well for the most prominent lines within the population in our country. For the whole population we determined total of 72 alleles, which number varied from 3 in loci HMS1 and HTG7 to 9 in locus ASB2. Most of the loci were highly polymorphic which defines the high genetic diversity in the population. The number of observed alleles varies considerably among the sire lines. In terms of that the sire lines of Blacklock and Birdcatcher shows similar values for the number of observed alleles – 64. For the lines of Hurry On and Tourbillon the number of observed alleles is respectively: 32 and 36. Analogical are the variations of allele frequencies among the sire lines.

Key words: *Thoroughbred, microsatellites, allele number, allele frequency, genetic variation.*