EESTI RASKEVEOHOBUSE (ERH) POPULATSIOONIGENEETILINE ANALÜÜS

Lõpparuanne

15. detsember 2022

Töö teostajad

Texase A&M Ülikool
Veterinaar-ja biomeditsiini teaduskond
Integreeritud veterinaar- ja biomeditsiiniteaduste osakond
Molekulaartsütogeneetika ja loomageneetika laborid

Dr. Rytis Juras
Dr. Josefina Kjöllerström
Dr. E. Gus Cothran
Dr. Terje Raudsepp

1. TÖÖ EESMÄRK

Viia läbi Eesti raskeveohobuse tõu populatsioonigeneetiline esialgne analüüs eesmärgiga:

1. Selgitada välja kas Eesti raskeveohobune eristub geneetiliselt Rootsi Ardenni hobusetõust või teistest samas piirkonnas aretud raskeveohobuse tõugudest.
2. Saada riigile teaduslik alus vajalike poliitikameetmete kohaldamise jätkamiseks või nende muutmiseks.
3. Kasutada uurimise tulemusi järgnevana kavandatavas eesti raskeveohobuse kogu populatsiooni detailuuringus.
4. Saada teavet Eesti raskeveohobuse tõu geneetilisest ülesehitusest ning kasutada seda tõu kaitseks ja aretuse planeerimiseks tulevikus.

2. KASUTATUD MATERJALID JA METOODIKA

2.1. Proovid

Karvanääpsudega jõhvid koguti 31lt Eesti raskeveohobuselt (edaspidi ERH) ja 55lt Rootsi Ardenni tõugu raskeveohobuselt (edaspidi RAH). ERH proovid saadi Eestist Maaeluministeeriumi vahendusel ning RAH proovid saadi Rootsist tänu koostööle Dr. Gabriella Lindgreniga, kes on loomageneetikaprofessor Rootsi Põllumajandusülikoolis (SLU) Uppsalas. Pärast iga hobuse andmete kandmist Excel tabelisse (hobuse nimi, tõug ja mikrokiibi number), anti igale hobusele/proovile Texase A&M Ülikooli Loomageneetika labori kuuekohaline identifitseerimisnumber (Lisa 1). Seda kasutati edaspidises töös anonüümsuse tagamiseks ja kallutatuse vältimiseks.

2.2. DNA eraldamine ja genotüpiseerimine

Genoomne DNA eraldati karvanääpsudest PUREGENE® (Qiagen) DNA kiti abil järgides valmistaja juhtnööre. Kõik 86 hobust (31 ERH ja 55 RAH) genotüpiseeriti 15 autosoomse mikrosateliitse markeri (*AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, HMS6, HTG6, HMS7, HMS3, HMS2, HTG4, VHL20, HTG7, HTG10*, *LEX33*) alleelide suhtes. Kõik nimetatud mikrosateliitsed markerid on heaks kiidetud rahvusvahelise Loomageneetika Ühingu (International Society of Animal Genetics; ISAG) poolt ja soovitatud kasutamiseks vanemsuse tuvastamiseks ning hobusetõugude ja populatsioonide geneetilise parameetrite, sealhulgas varieeruvuse, hindamiseks. Mikrosatelliitsete markerite alleelide arv ja asukoht hobuse kromosoomidel on teada ja kirjanduses avaldatud (Khanshour *et al.* 2013).

Mikrosatelliitide genotüpiseerimine tehti esmalt PCRi teel, millele järgnes PCRi saaduste analüüs ja alleelide tuvastamine ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems) instrumendi abil nagu on kirjeldatud meie varasemates töödes (Juras *et al.* 2003).

Lisaks käesolevas töös määratud ERH ja RAH mikrosateliitide genotüüpidele, kasutati järgnevates analüüsides kõikehõlmava ja mitte kallutatud geneetilise võrdluse tagamiseks veel 63 hobusetõu (Lisa 2) ülegenoomsete mikrosateliitide genotüpiseerimise andmeid, mis on osa meie uurimisgrupi juba avaldatud ning ka veel avaldamata uurimistöödest. Seega kasutasime ühtekokku 65 hobusetõu mikrosatelliitmarkerite genotüpiseerimise andmeid.

2.3 Geneetilise varieeruvuse analüüs

Hobusepopulatsioonide geneetilise varieeruvuse määrad arvutati 15 mikrosatelliitse markeri alleelse varieeruvuse põhjal. Arvutatavad määrad olid järgmised:
i) täheldatud hetersügootsus *(Ho)*, mis näitab iga hobuse heterosügootsete lookuste tegelikku arvu;
ii) eeldatav heterosügootsus *(He)*, mis näitab geenisageduste põhjal eeldatavat heterosügootsete lookuste arvu;
iii) effektiivne alleelide arv *(Ae)*, mis näitab markersüsteemi mitmekesisust;
iv) alleelide üldarv *(TNV)*;
v) alleelide keskmine arv lookuse kohta (*MNA*);
vi) täheldatud madala sagedusega alleelide arv (*RA*), mis näitab nende alleelide arvu, mille sagedus on väiksem või võrdne 0.05;
vii) madala sagedusega alleelide protsentarv (*%RA*); ja
viii) hinnanguline inbriidingu tase *(Fis)*, mis on arvutatud valemiga [1− *Ho/He*].

2.4 Konsensus-sugupuu ehitamine

ERH mikrosateliitsete markerite genotüüpide-põhine geneetiline sugulus 64 ülemaailmse hobusetõuga selgitati välja maksimaalsel tõenäosusel põhineva geneetilise konsensus-sugupuu ((Inglise k. *the majority-rule consensus of restricted maximum likelihood (RML) trees*)) alusel (Joonis 1). Konsensus-sugupuu loomiseks kasutati PHYLIP v3.69 (Felsenstein 1989-2006) ning sugupuu joonistamiseks TreeView (Huson & Bryant 2006) tarkvara pakette. Lisaks kasutasime WhichRun programmi (Banks & Eichert 2000), et paigutada üksikisendid nende mikrosateliitide genotüüpide alusel populatsioonidesse.

2.5 Mitmemõõtmeline faktoriaalkomponentanalüüs

Konsensus-sugupuu selgitas ERH geneetilise suguluse maailma teiste hobusetõugudega ning aitas meil välja valida esiteks 28, seejärel 12 ning lõpuks viis geneetiliselt kõige sarnasemat raskeveohobuse tõugu (ERH sealhulgas) (Lisa 1) üksikasjalikuks mitmemõõtmeliseks faktoriaalkomponentanalüüsiks (FCA) GENETIX (Belkhir K. 1996-2004) programmi abil.

2.6 Geneetilise struktuuri analüüs

Pärast mitmemõõtmelist faktoriaalkomponentanalüüsi, hindasime ERH geneetilise segunemise (inglise k. *admixture*) määra ERHle nelja kõige lähedasemas suguluses oleva raskeveohobuse tõuga. Selleks kasutasime programmipaketti STRUCTURE (Pritchard 2000) ning optimaalse geneetiliste klasterite arv arvutati Evanno Delta K (ΔK) mudeli alusel (Evanno *et al.* 2005).

3. TULEMUSED

3.1. DNA kvaliteet

Genotüpiseerimiseks sobiliku kvaliteediga esialgne, puhastamata DNA õnnestus saada kõigist 31st ERH ja 55st RAH karvanääpsudest. Lõplik, puhastatud, hea kvaliteedi ja kogusega DNA

saadi kõigist 55st RAH proovist, kuid vaid 25st ERH proovist. Viie ERH DNA kogus ei ole piisav kordusanalüüsiks ega ka plaanitavaks genotüpiseerimiseks hobuse tihedal geenikiibil. Ühe ERH proovidest puhast lõplikku DNAd ei saadudki. Lisa 1 annab ülevaate ERH DNA kogustest ja kvaliteedist ning märgib ära need ERH isendid, kelle edasiseks uurimiseks on vaja koguda uued proovid.

3.2. Eesti raskeveohobuse populatsiooni geneetiline varieeruvus

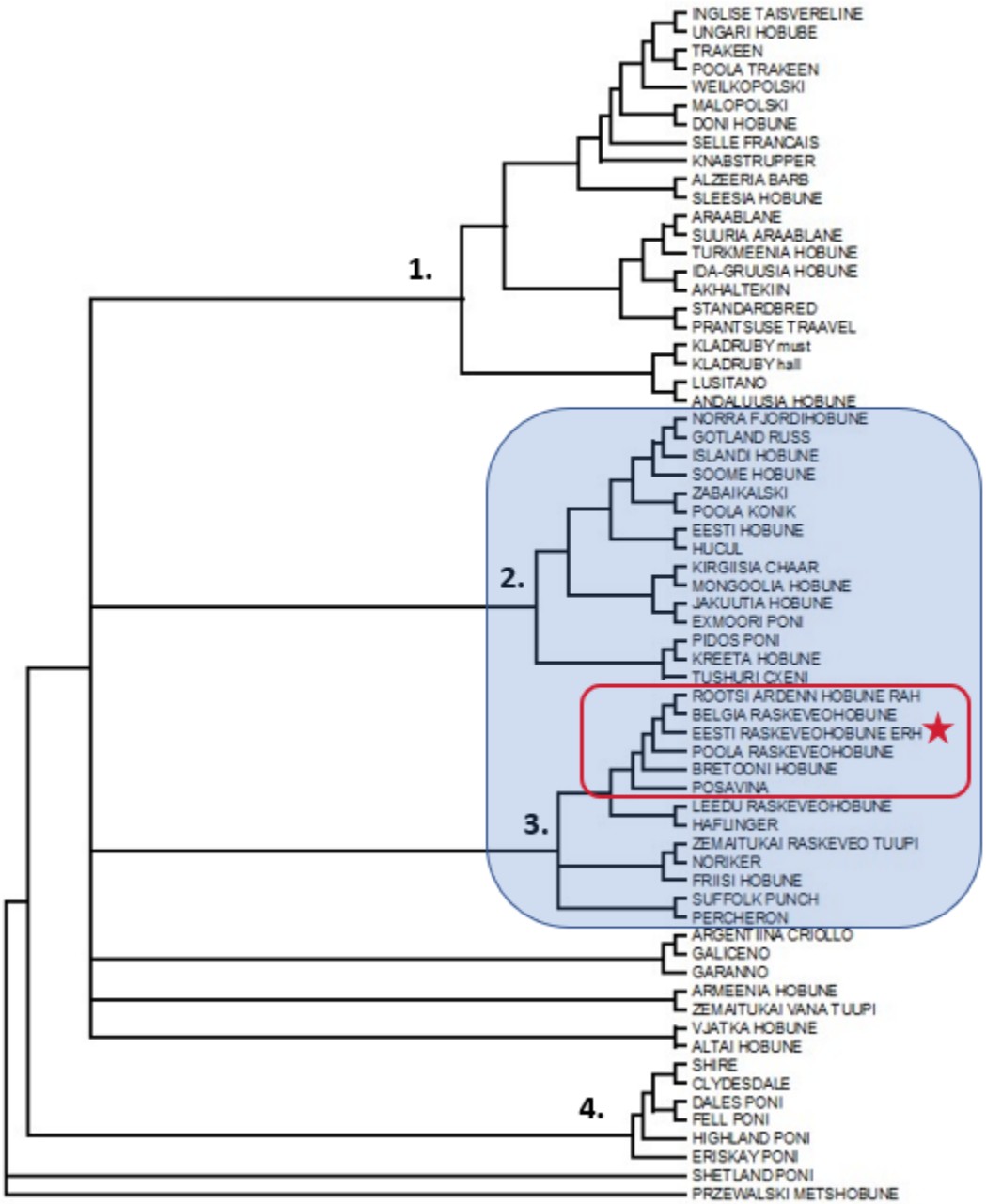
ERH 15 autosoomse mikrosatelliitse markeri genotüübid on esitatud Lisas 1. Kõik 15 lookust osutusid varieeruvateks (polümorfseteks) ning alleelide sagedus oli kooskõlas Hardy-Weinbergi geneetilise tasakaalu seadusega. ERH ja RAH geneetilise varieeruvuse näitajad on esitatud Tabelis 1 ning võrdluseks on toodud samad näitajad valitud raskeveotõugude ja mõnede tuntud mitte raskeveotõugude kohta. Me ei täheldanud, et ERHl oleks geneetilisi variante (allele), mida pole leitud teistel hobusetõugudel. Ühtekokku tuvastasime ERH populatsioonis 89 alleeli, milline arv on suurem hobusetõugude keskmisest. Alleele sagedusega alla 0.05% oli ERHl 29, milline arv on samuti suurem hobusetõugude keskmisest ja tähendab seda, et ERHl on suur risk neid madala sagedusega alleele kaotada geneetilise triivi või muude populatsiooni geneetilist tasakaalut mõjutavate tegurite tõttu. See omakorda mõjutab negatiivselt heterosügootsust ning teisi geneetilise varieeruvuse näitajaid. Suur madala esinemissagedusega alleelide arv võib olla ka seotud outbriidinguga. Hetkel on ERH täheldatud ja eeldatud heterosügootsususe näidud pisut madalamad kui koduhobuse keskmine ning sama võib öelda effektiivsete alleelide arvu kohta.

3.3. Eesti raskeveohobuse geneetiline sugulus 64 ülemaailmse hobusetõuga

Selleks, et selgitada ERH geneetilist sugulust teiste hobusetõugudega ning eriti nendega, kes on ajalooliselt suure tõenäosusega oluliselt panustanud ERH geneetikasse, ehitasime mikrosatelliitide genotüüpidest lähtudes maksimaalsel tõenäosusel põhineva geneetilise konsensus-sugupuu (Joonis 1). Hobuse- ja ponitõud jaotusid geneetilisel puul mitmetesse põhiharudesse: ***Haru #1*** koondas hobusetõud milledesse on olulise geneetilise panuse andnud Inglise täisvereline hobune. Siia kuuluvad ka Ibeeria poolsaare päritoluga hobusetõud ning enamik uurimuses kasutatud soojaverelisi tõuge. ***Haru #2*** koondas mitmed kohaliku tähtsusega hobuse-ja ponitõud, sealhulgas ka Eesti hobuse; ***Haru #3*** koondas endasse mitmed raskeveotõud, sealhulgas ERH ja RAH, mis kuuluvad haru #3 alamharusse koos Belgia raskeveohobuse, Poola raskeveohobuse, Bretooni hobuse ja Posavina hobusega (Posavac; Kroaatiast). Konsensus-sugupuu alusel on ERHle geneetiliselt kõige lähedasemad tõud Poola raskeveohobune ja Belgia raskeveohobune ning RAH jääb pisut kaugemale, ehkki on geneetiliselt ERHle samuti väga lähedane.

Tabel 1. ERH ja RAH geneetilise varieeruvuse näitajad võrreldes teiste valitud raskeveohobuste tõugudega ja mõnede tuntud soojavereliste hobusetõugudega; ***N*** – uuritud isendite arv; ***Ho*** - täheldatud hetersügootsus; ***He*** - eeldatav heterosügootsus; ***Fis*** - hinnanguline inbriidingu tase; ***Ae*** - effektiivne alleelide arv; ***TNV*** - alleelide üldarv; ***MNA*** - alleelide keskmine arv lookuse kohta; ***Ra*** - täheldatud madala sagedusega alleelide arv; ***%Ra*** – madala sagedusega alleelide protsentarv

HOBUSETÕUG	***N***	***Ho***	***He***	***Fis***	***Ae***	***TNV***	***MNA***	***Ra***	***%Ra***
EESTI RASKEVEOHOBUNE	31	0.705	0.680	-0.037	3.573	89	5.933	29	0.326
ROOTSI ARDENNI HOBUNE	55	0.662	0.668	0.009	3.529	90	6.000	29	0.322
Valik raskeveo hobusetõuge									
AMEERIKA KOLLANE (*CREAM*) RASKEVEOHOBUNE	25	0.725	0.711	-0.020	3.735	92	6.133	24	0.261
BELGIA RASKEVEOHOBUNE	20	0.653	0.656	0.004	3.419	83	5.533	21	0.253
BOULONNAIS	38	0.658	0.614	-0.071	3.023	74	4.933	15	0.203
BRETOONI RASKEVEOHOBUNE	26	0.731	0.657	-0.112	3.415	77	5.133	16	0.208
CLYDESDALE	32	0.602	0.582	-0.035	2.563	66	4.400	17	0.258
FRIISI HOBUNE	304	0.55	0.54	-0.01	2.56	70	5.83	28	0.400
HAFLINGER	46	0.658	0.660	0.004	3.388	85	5.667	22	0.259
IIRI RASKEVEOHOBUNE	135	0.8	0.8	-0	5.19	102	8.50	28	0.275
LEEDU RASKEVEOHOBUNE	50	0.761	0.715	-0.064	4.052	90	6.000	22	0.244
NORIKER	69	0.675	0.686	0.016	3.448	97	6.467	28	0.289
PERCHERON	38	0.684	0.683	-0.002	3.546	98	6.533	33	0.337
POOLA RASKEVEOHOBUNE	69	0.758	0.719	-0.055	3.953	101	6.733	25	0.248
POSAVINA	27	0.743	0.713	-0.043	4.063	98	6.533	25	0.255
SHIRE	32	0.685	0.654	-0.047	3.134	81	5.400	26	0.321
SUFFOLK (INGLISMAA)	29	0.641	0.652	0.017	3.089	65	4.333	8	0.123
SUFFOLK PUNCH	50	0.735	0.704	-0.044	3.796	82	5.467	14	0.171
VJATKA HOBUNE	40	0.737	0.714	-0.032	4.105	102	6.800	33	0.324
ZEMAITUKAI RASKEVEO TÜÜP	50	0.731	0.682	-0.071	3.512	91	6.067	30	0.330
Valik tuntud soojaverelisi hobusetõuge									
Ameerika Saddlebred	576	0.740	0.75	0.007	4.25	102	8.50	42	0.412
Andaluusia hobune	52	0.72	0.75	0.041	4.26	79	6.58	21	0.266
Araabia hobune	47	0.660	0.73	0.092	3.81	86	7.17	30	0.349
Inglise täisvereline	1195	0.73	0.73	-0.01	3.92	69	5.75	18	0.261



Joonis 1. Maksimaalsel tõenäosusel põhinev geneetiline konsensus-sugupuu, mis näitab 65 hobusetõu geneetilist sarnasust; punane täht märgib ERH asukohta Harus #3; punase joonega ümbritsetud hobusetõud rühmituvad ERHga ning on viimasega geneetiliselt kõige lähedasemad; siniseks varjutatud ala näitab neid 28 hobusetõugu, keda kasutati detailseks mitmemõõtmeliseks faktoriaalkomponentanalüüsiks

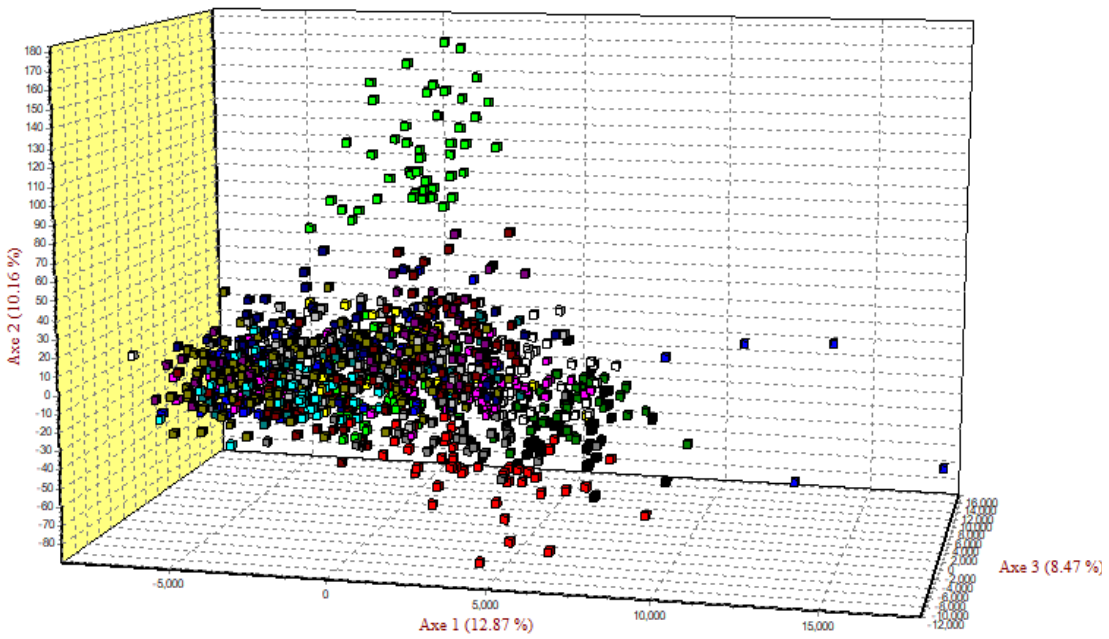
3.4. Mitmemõõtmeline faktoriaalkomponentanalüüs (FCA)

Geneetilise konsensus-sugupuu põhjal valisime edasiseks analüüsiks 65st hobusetõust järk-järgult esiteks 28 tõugu, seejärel 12 tõugu ning lõpuks viis geneetiliselt kõige sarnasemat tõugu (ERH sealhulgas). Esimese 28 tõu hulka kuulusid kõik tõud konsensuspuu harudest #2 ja #3 (Joonis 1, Tabel 2). ERH geneetilist sarnasust teiste tõugudega uuriti mitmemõõtmelise faktoriaalkomponentanalüüsi teel (Joonised 2 a-f), mis indiviidide geneetilist profiili arvesse võttes võimaldab näidata üksikisendite geneetilist distantsi üksteise suhtes. See tähendab, et geneetiliselt sarnasemad indiviidid on kolmemõõtmelises ruumis üksteisele lähemal ja geneetiliselt erinevamad indiviidid on üksteisest kaugemal.

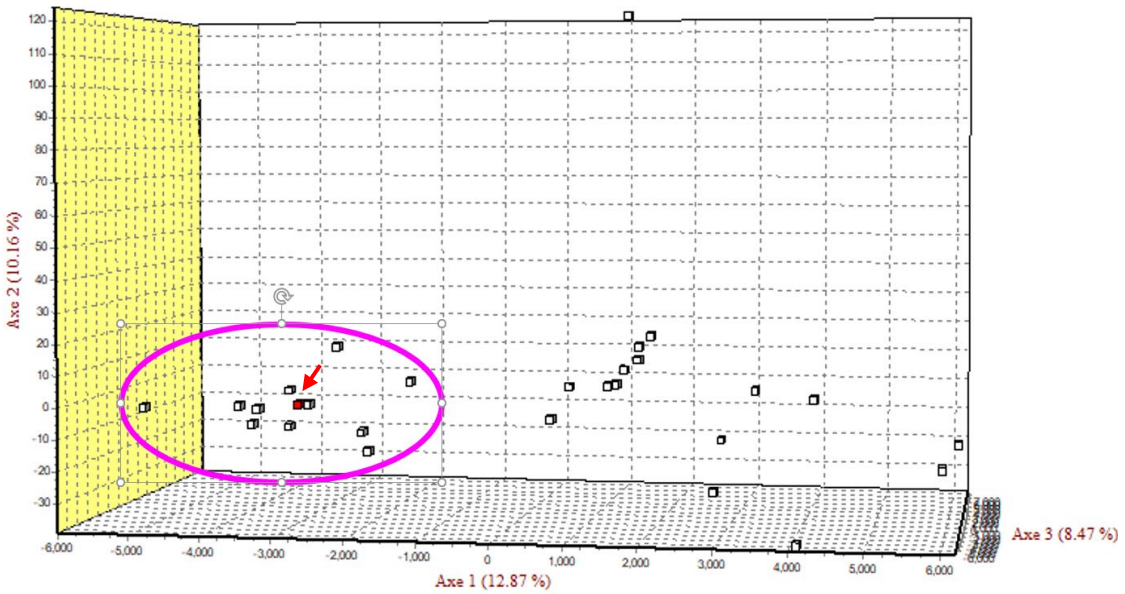
Mitmemõõtmelise faktoriaalkomponentanalüüsi tulemused oli peaaegu identsed konsensus-sugupuuga (Joonis 1) ning kinnitasid, et ERHle on geneetiliselt kõige lähedasemad Poola raskeveohobune, Belgia raskeveohobune ja RAH. Sellele vaatamata, moodustasid kõik ERHd oma väikese populatsiooni ning eristusid selgelt lähitõugudest. Erandiks olid kaks ERH indiviidi (ID #143025 ja #143040; Lisa 1), kelle geneetiline päritolu on tõenäoliselt rikkalikum ja segasem.

Tabel 2. 28 hobusetõugu, keda kasutati mitmemõõtmelise faktoriaalkomponentanalüüsi esimesel etapil

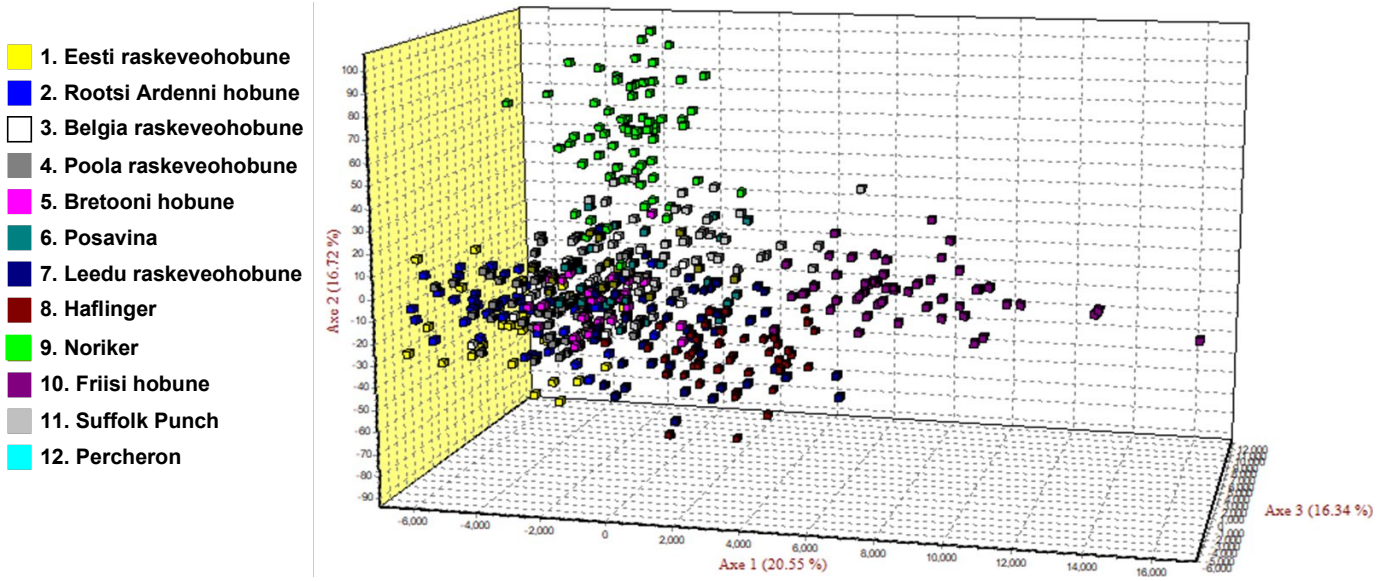
Number	Lühend	Hobusetõug	Isendite arv
1	ES72	EESTI RASKEVEOHOBUNE (ERH)	31
2	AD58	ROOTSI ARDENNI HOBUNE (RAH)	55
3	BE42	BELGIA RASKEVEOHOBUNE	26
4	PH69	POOLA RASKEVEOHOBUNE	69
5	BR23	BRETOONI HOBUNE	26
6	PV26	POSAVINA	27
7	ZD74	LEEDU RASKEVEOHOBUNE	50
8	HF16	HAFLINGER	46
9	ZH73	ZEMAITUKAI RASKEVEO TÜÜPI	50
10	NK47	NORIKER	67
11	FR15	FRIESIAN	12
12	SU39	SUFFOLK PUNCH	50
13	PC27	PERCHERON	38
14	FJ 4	NORRA FJORDIHOBUNE	48
15	GT48	GOTLANDI RUSS	43
16	IC75	ISLANDI HOBUNE	38
17	FH35	SOOME HOBUNE	25
18	ZB 7	ZABAIKALSKY	31
19	PO45	POOLA KONIK	53
20	ES27	EESTI HOBUNE	33
21	HU47	HUCUL	45
22	KZ51	KIRGIISIA CHAAR	30
23	MO60	MONGOOLIA HOBUNE	38
24	YK55	JAKUUTIA HOBUNE	66
25	EX32	EXMOORI PONI	46
26	PD22	PINDOSI PONI	43
27	CH53	KREETA HOBUNE	30
28	TC 6	TUSHURI CXENI	25



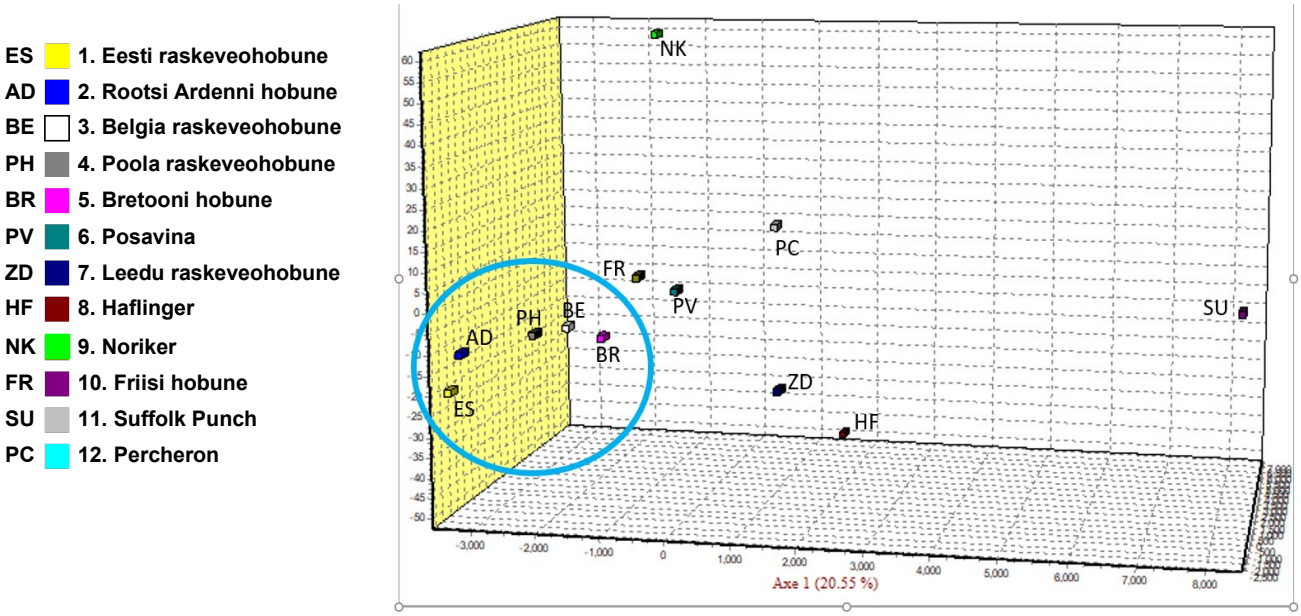
Joonis 2a. Mitmemõõtmeline faktoriaalkomponentanalüüs 28 hobusetõuga. Iga värv esindab tõugu/populatsiooni, iga punkt vastab isendile. Ükski tõug, sealhulgas ERH, pole teadlikult identifitseeritud, sest joonise eesmärgiks on näidata, et kõik 28 tõugu on geneetiliselt väga lähedased. Esimene faktoriaalkomponent kirjeldab 12,87%, teine 10,16% ja kolmas 8,47% hobustevahelisest geneetilisest varieeruvusest



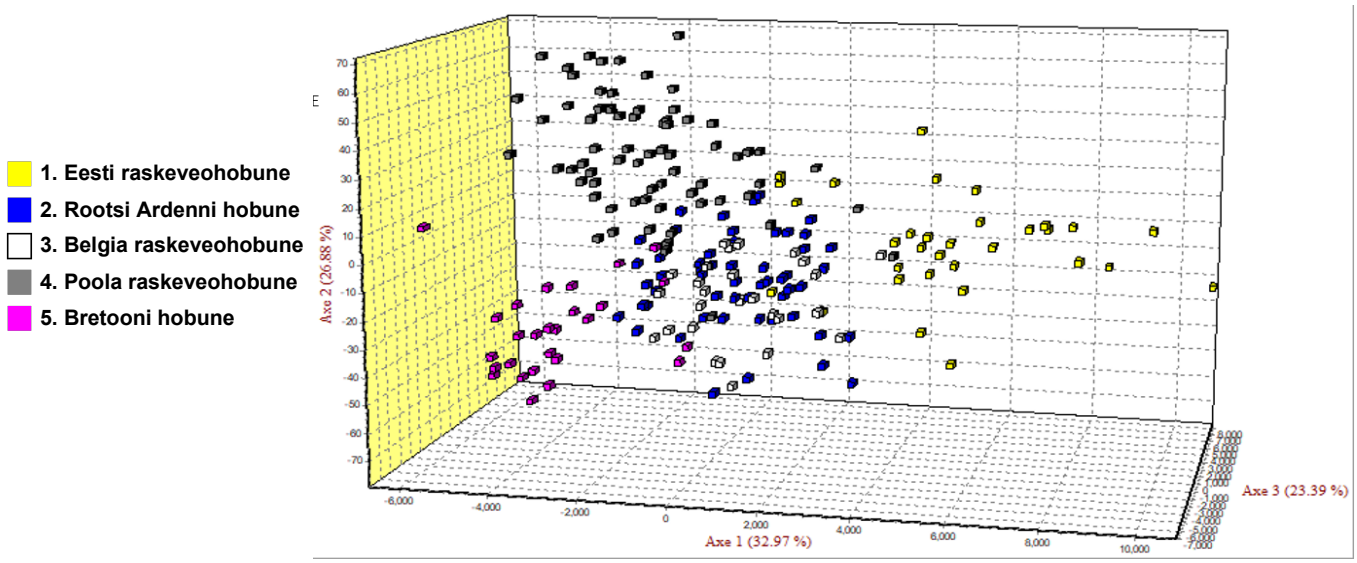
Joonis 2b. Mitmemõõtmeline faktoriaalkomponentanalüüs 28 hobusetõuga. Iga punkt vastab ühele tõule, ERH on punast värvi (vaata noolt). Roosa ellips hõlmab ERHd ja 11 ERHle geneetiliselt kõige sarnasemat tõugu. Edasine analüüs hõlmab vaid neid 12 tõugu ning roosast ellipsist väljaspoole jäävad tõud eemaldati järgnevatest analüüsi etappidest.



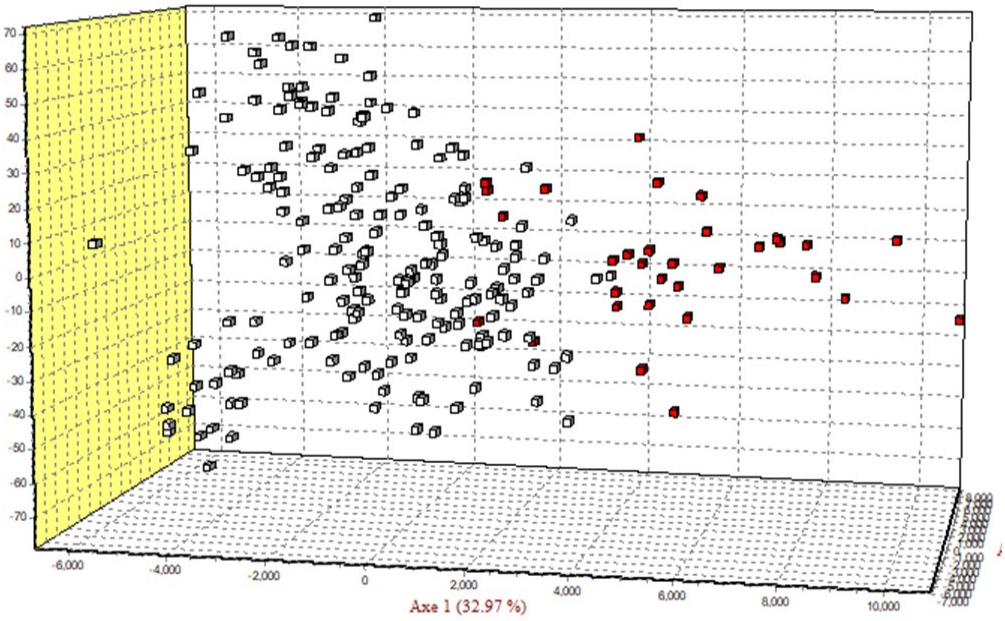
Joonis 2c. Mitmemõõtmeline faktoriaalkomponentanalüüs 12 raskeveohobuse tõuga. Iga punkt vastab indiviidile ja iga värv vastab tõule; ERH on kollane. Enamus 12st tõust paigutuvad väga lähestikku, ehkki mõned tõud nagu Noriker (roheline) eristuvad teistest selgemini



Joonis 2d. Mitmemõõtmeline faktoriaalkomponentanalüüs 12 raskeveohobuse tõuga. Iga värvipunkt vastab tõule; ERH on kollane. Sinine ring ümbritseb ERHd ja nelja ERHle geneetiliselt kõige sarnasema tõugu ning on identne tõugude klasterdumisega Joonisel 1 esitatud konsensus-sugupuul. Edasine analüüs hõlmab vaid neid 5 raskeveo hobuse tõugu



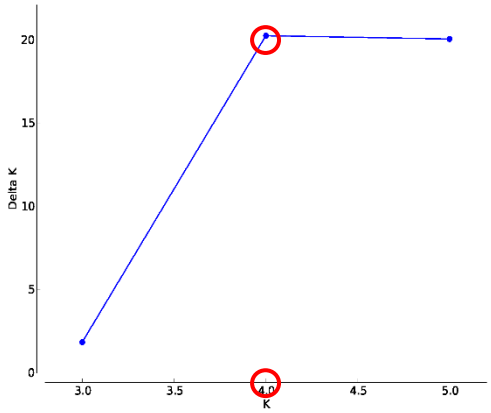
Joonis 2e. Mitmemõõtmeline faktoriaalkomponentanalüüs viie raskeveohobuse tõuga. Joonisel on ERH ja neli talle geneetiliselt kõige sarnasemat tõugu. Iga värv vastab tõule, iga punkt vastab indiviidile (kokku 207 indiviidi). Juhime tähelepanu asjaolule, et enamik ERH, Bretooni ja Poola hobuste indiviide klasterduvad eradi oma tõugruppi, kuid RAH ja Belgia raskeveohobused on omavahel segamini



Joonis 2d. Mitmemõõtmeline faktoriaalkomponentanalüüs viie raskeveo hobuse tõuga. Sama, mis Joonis 2e, kuid ERH on paremaks märkamiseks esitatud punaste punktidena ning ülejääanud neli tõugu on värvmata. Enamik ERH indiviide eristuvad selgelt ülejäänud nelja hobusetõu indiviididest

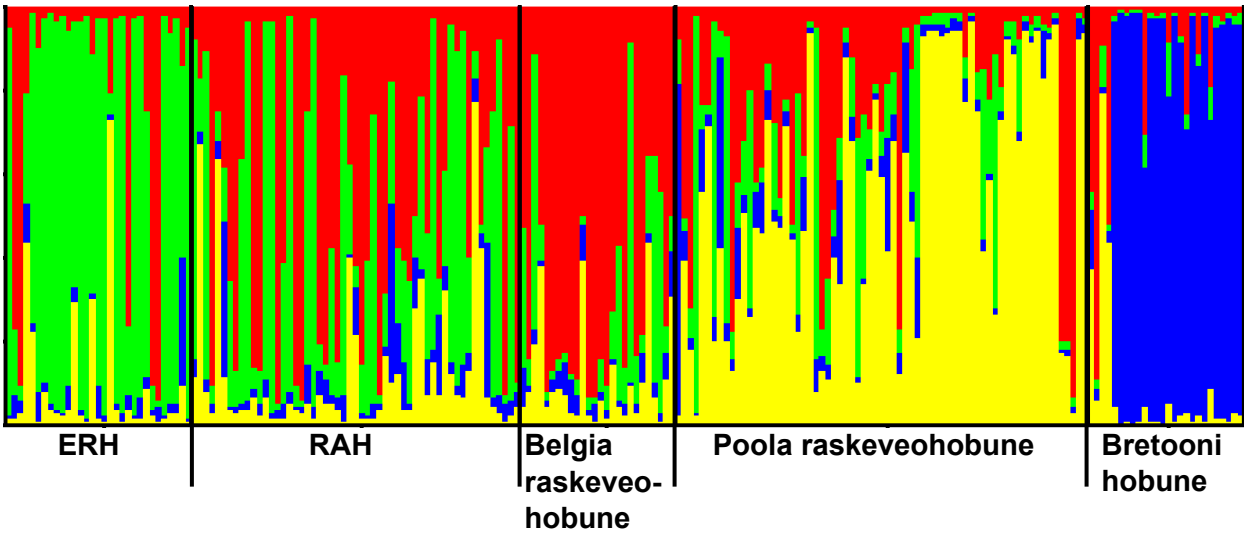
3.5 ERH geneetilise segunemise hindamine

Kasutasime mikrosateliitsete markerite genotüpiseerimisandmeid ERH ja nelja temaga lähedases suguluses olevate raskeveohobuste populatsioonide geneetilise struktuuri määramiseks. Eesmärgiks oli selgitada ERH, RAH, Belgia raskeveohobuse, Poola raskeveohobuse ja Bretooni hobuse geneetilise segunemise (ingl. k. *admixture*) määr. Esmalt selgitasime delta K mudeli arvutuste alusel (10 x korduses), et optimaalne geneetiliste klastrite arv kirjeldamaks nimetatud viit hobusetõugu on K=4 (Joonis 3).



Joonis 3. Optimaalse arvu geneetiliste klastrite selgitamine delta K mudeli alusel. Optimaalne geneetiliste klastrite arv viie hobusetõu geneetilise struktuuri analüüsiks on 4 (K=4)

Need neli geneetilist klastrit näitavad tõugude ja indiviidide lõikes erinevat geneetilist panust (Joonis 4). Kõige selgemini eristuvad Bretooni hobused (valdavalt sinine geenikomponent ja Poola raskeveohobused (valdavalt kollane geenikomponent). RAH ja Belgia raskeveohobused on geneetiliselt struktuurilt väga sarnased ning indiviidid ei eristu tõu alusel. Eesti raskeveohobune on geneetiliselt struktuurilt sarnane RAHga, kuid sellele vaatamata eristuvad enamik ERH indiviide geneetiliste klatrite osakaalu alusel omaette rühmaks (valdavalt rohelise geenikomponendiga rühm joonisel 4).

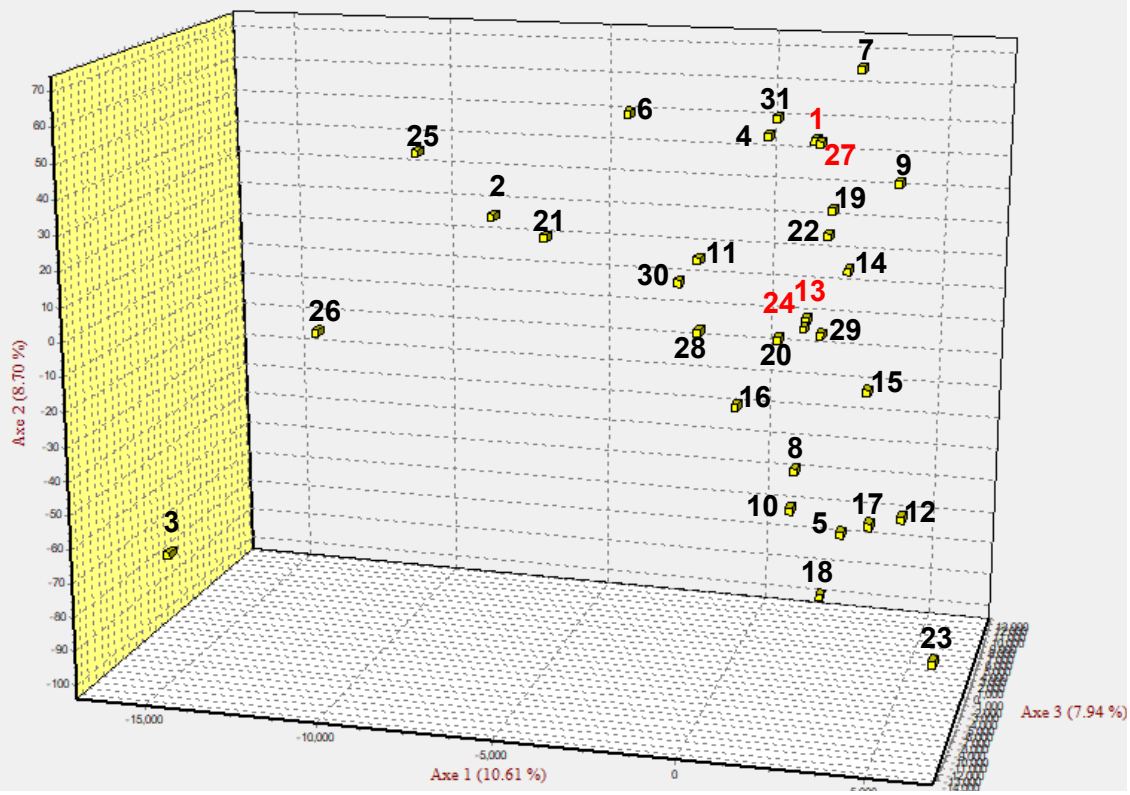


Joonis 4. ERH ja nelja geneetiliselt kõige sarnasema raskeveohobuse tõu geneetilise struktuuri analüüs. Iga vertikaalne tulp esindab indiviidi. Neli värvi (roheline, punane, kollane

ja sinine) esindavad nelja geneetilist klastrit (K=4) ning nende suhtelist osa iga indiviidi geneetilises ülesehituses. Horisontaalteljel on indiviidid kogutud viide rühma tõugude alusel

3.6 ERH tõusisene geneetiline sarnasus

Mikrosatelliitide ülegenoomsete genotüüpide alusel oli võimalik võrrelda ka ERH hobuseid omavahel ning näidata mitmemõõtmelise faktoriaalkomponentanalüüsi teel, millised indiviidid on geneetiliselt sarnasemad ning millised indiviidid on geneetiliselt erinevamad (Joonis 5). Näiteks on geneetiliselt väga sarnased hobused #1 ja #27 ning hobused #13 ja #24 (punased numbrid Joonisel 5), sest neid esindavad punktid osaliselt kattuvad. Samas aga eristuvad hobused #3 ja #26 geneetiliselt nii üksteisest kui ka ülejäänud tõukaaslastest. Tuleb rõhutada, et ERH indiviidide geneetilise sarnasuse analüüs põhines vaid mikrosatelliitide genotüüpidel ning töö tegijatel ei olnud kasutada ERH tõuraamatu andmeid.



Joonis 5. Mitmemõõtmeline faktoriaalkomponentanalüüs Eesti raskeveohobuste omavahelise geneetilise sarnasuse tuvastamiseks. Joonisel on näidatud 31 Eesti raskeveohobust. Iga kollane nummerdatud punkt vastab indiviidile. Numbrite vastavus hobuste tõuraamatu-põhistele identifitseerimisnumbritele on esitatud Lisas 1. Mida sarnasemad on indiviidid geneetiliselt, seda lähemal asuvad nad 3D ruumis. Punased numbrid tähistavad geneetiliselt kõige sarnasemaid indiviidide paare.

4. KOKKUVÕTE

Selles töös kasutasime hobuse varieeruvate mikrosatelliitsete markerite genotüüpe, et kirjeldada ERH populatsiooni geneetilisi parameetried, võrrelda ERH geneetilist ülesehitust 64 ülemaailmse hobusetõuga ning paigutada ERH maailma hobuste geneetilisele konsensus-sugupuule. Asjaolu, et töös kasutati nii suure arvu hobusetõugude geneetilist teavet, teeb analüüsi põjalikuks ja laiaulatuslikuks ning tulemused usaldusväärseks. Seejärel uurisime ERH geneetikat mitmemõõtmelise faktoriaalkomponentanalüüsi teel, mida teostasime kolmes järgus. Esiteks võrdlesime ERHd 27 temale kõige lähedasema hobusetõuga, seejärel vähendasime sugulustõugude arvu 11ni ning lõpuks neljani. Neid nelja tõugu ja ERHd kasutasime ka geneetilise segunemise hindamiseks struktuuranalüüsi teel. Lõpuks kasutasime mitmemõõtmelist faktoriaalkomponentanalüüsi ERH tõusisese geneetilise läheduse hindamiseks ning näitasime, kes töös kasutatud 31st ERHst on geneetiliselt kõige sarnasemad või kõige erinevamad.

5. JÄRELDUSED

Meie järeldused on sellised:

- ERH populatsiooni geneetiline varieeruvus on rahuldav, ehhki jääb alla koduhobuse geneetilise varieeruvuse keskmisele. Erilist tähelepanu tuleks pöörata madala sagedusega alleelide säilitamisele.
- ERHle geneetiliselt kõige lähedasemad hobusetõud on Poola ja Belgia raskeveohobused ja RAH.
- Geneetilisele sarnasusele vaatamata, eristub ERH populatsioon selgelt talle geneetiliselt kõige lähedasematest hobusetõugudest.
- Soovitame kasutada ERH tõusisese geneetilise läheduse analüüsi andmeid aretusprogrammide kavandamisel.

6. KASUTATUD KIRJANDUS

Banks M.A. & Eichert W. (2000) WHICHRUN (version 3.2): a computer program for population assignment of individuals based on multilocus genotype data. *J Hered* **91**, 87-9.

Belkhir K. B.P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Institut des Sciences de l'Evolution, University of Montpellier II, Montpellier (France).

Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* **14**, 2611-20.

Felsenstein J. (1989-2006) PHYLIP (phylogeny inference package).

Huson D.H. & Bryant D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* **23**, 254-67.

Juras R., Cothran E.G. & Klimas R. (2003) Genetic Analysis of Three Lithuanian Native Horse Breeds. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science* **53**, 180-5.

Khanshour A.M., Juras R. & Cothran E.G. (2013) Microsatellite analysis of genetic variability in Waler horses from Australia. *Australian Journal of Zoology* **61**.

Pritchard J.K., Stephens, (2000) Ingerence of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* **155**, 945-59.

Lisa 1. 31 Eesti raskeveohobuse 15 mikrosatelliidi genotüübid ja karvanääpsudest eraldatud DNA kogus ja kvaliteet

Texas A&M Labori ID	Joonis 5 ID	Hobuse nimi	Mikrokiip	Tõug	AHT4	AHT5	ASB17	ASB2	ASB23	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	HTG10	HTG4	HTG6	HTG7	LEX33	VHL20	DNA kogus ng/µl	Spectrofotomeetri näit 260/280	Spectrofotomeetri näit 260/230
143023	**1**	HEIGO	UELN 233002300212414	ERH	IM	JN	OP	N	SU	H	NP	OP	JN	N	MP	O	KM	L	MP	**828.09**	1.98	1.94
143024	**2**	HERVO	UELN 233002300666801	ERH	IJ	JK	KR	MN	LS	H	PQ	LO	MN	NO	LM	O	M	GO	MO	**33.43**	1.62	0.95
143025	**3**	EGI	UELN 2460031ER003220	ERH	HN	KM	NR	Q	SU	HL	Q	MP	KL	RT	LO	GO	KM	GO	OP	**33.28**	1.69	1.38
143026	**4**	KELLI	UELN 233002300508702	ERH	IJ	JN	MQ	IN	LU	H	PQ	L	NO	MO	LM	O	KM	GQ	MQ	**890.89**	1.85	1.65
143027	**5**	KULLAKALLI	UELN 233002300242419	ERH	JO	JO	NQ	NO	LU	K	PR	MP	JL	NO	O	GO	M	L	R	**236.2**	1.82	1.46
143028	**6**	NHESSE	UELN 233002300291616	ERH	I	JM	KN	MQ	IL	HK	PQ	LO	LO	MN	OP	O	KM	L	MP	**925.09**	1.96	1.95
143029	**7**	NIIKA	UELN 233002300249219	ERH	O	NO	NP	MN	KU	HK	MN	LO	O	MO	O	O	O	LQ	P	**582.91**	1.84	1.88
143030	**8**	VAGABOND	UELN 24600100K071001	ERH	O	O	N	IO	LS	HK	PQ	OP	LM	MR	MO	O	KM	LR	R	**255.13**	1.92	1.88
143031	**9**	VALLI	UELN 233002800693801	ERH	JO	JN	NP	N	U	H	MP	OP	LO	MO	KO	O	MO	L	NP	**1292.31**	1.89	1.68
143032	**10**	VEENUS	UELN 233002300275815	ERH	HO	MO	N	IO	SU	HK	P	P	L	OR	O	O	M	L	PR	**832.47**	1.91	1.58
143033	**11**	KAUNIS KAROLA	UELN 2460031ER000616	ERH	IJ	JO	NS	IN	LU	HK	NQ	LO	LM	MN	LO	O	KM	KL	OR	**862.96**	2	1.75
143034	**12**	NAPOLEON	233002300842407	ERH	JP	J	MN	IN	U	HK	QR	P	L	KM	MP	O	MO	GK	IN	**1242**	1.94	1.82
143035	**13**	NERRA	UELN 233002300282618	ERH	LO	J	P	IK	SU	K	PQ	LO	LN	OR	OP	O	MO	G	PQ	**162.6**	1.85	1.4
143036	**14**	EKSTRA	UELN 233002300056210	ERH	O	J	P	IK	LU	HK	MP	O	LN	NR	LO	O	O	GL	Q	**669.73**	2	1.89
143037	**15**	EQUITY	UELN 233002300963909	ERH	KO	J	M	IN	SU	HK	P	OP	LN	NO	O	GO	KO	GL	NQ	**1027.09**	1.98	1.74
143038	**16**	SAHKRI WESKI VIRK	UELN 233002300290021	ERH	KO	JK	NP	IQ	LU	K	NQ	OP	LN	NR	L	O	O	G	QR			
143039	**17**	VIDEL	UELN 233002300286321	ERH	JL	JN	GM	KR	LS	K	P	LP	L	N	LO	O	M	LM	QR	**490.95**	1.9	1.85
143040	**18**	HELLUS	233002300612804	ERH	KO	JL	NR	NO	S	H	P	P	N	IK	MO	GO	KO	GR	NR	**430.4**	1.94	1.97
143041	**19**	NERA	UELN 233002300271720	ERH	IO	MO	M	IN	LU	HK	NP	O	MN	MN	LO	JO	KO	GL	PQ	**997.59**	1.98	2
143042	**20**	VANILLA	UELN 233002300269420	ERH	MO	MN	N	IK	SU	H	Q	OP	L	MR	MO	O	MO	L	P	**338.73**	1.87	1.57
143043	**21**	ESTA	UELN 2460031ER003020	ERH	NO	JM	NP	KQ	KS	HL	PQ	LO	MN	M	LM	O	KM	GL	MP	**293.22**	1.93	1.93
143044	**22**	NIABI	UELN 233002300273020	ERH	IJ	JM	NP	IN	U	H	NP	OP	JN	NO	OP	O	KO	GL	NP	**1106.96**	1.98	1.83
143045	**23**	NORMANDIA	UELN 233002300109711	ERH	MP	MO	GN	IR	KL	IK	PQ	P	L	MO	LM	O	M	LM	NQ	**1298.41**	1.99	1.92
143046	**24**	SAHKRIWESKI HERMOON	233002300275720	ERH	JO	J	MR	I	U	H	PQ	OP	JN	NO	LM	O	KO	GL	N	**324.67**	1.94	1.94
143047	**25**	KINNA	UELN 233002300169913	ERH	IN	J	FP	KQ	LS	HL	PQ	L	M	MN	MO	O	K	KL	MO	**802.26**	1.97	1.67
143048	**26**	HANORA ODOSTR	UELN 233002300085011	ERH	JN	JK	R	M	SU	HL	Q	LP	KN	N	LO	O	KM	GL	O	**421.92**	1.92	1.74
143049	**27**	VALMET	UELN 233002300531203	ERH	IO	N	P	N	LS	HK	MP	OP	LM	MO	LO	O	MO	GL	MP	**32.35**	1.8	0.78
143050	**28**	VINLANDIA	UELN 2460031ER001917	ERH	O	JO	PR	IM	LS	HK	PQ	OP	LM	MN	LM	O	KM	KR	MR	**940.44**	1.95	1.64
143051	**29**	LIIVA NORA	UELN 233002300280016	ERH	O	J	NP	NP	KL	H	NQ	P	JL	MN	LP	GO	M	GL	NP	**555.77**	1.92	1.92
143052	**30**	VILONA	UELN 233002300155512	ERH	O	MO	NP	MN	SU	HK	MQ	LP	LN	MO	L	O	MO	GL	O	**18.64**	1.74	0.67
143053	**31**	VILDA	233002300153212	ERH	I	NO	PR	IN	LS	H	MP	OP	JL	MO	MO	O	KM	LQ	M	**502.25**	1.9	1.88

halb puhastatud DNA kogus ja kvaliteet
puhastatud DNAd ei saadud

Lisa 1: 65 hobuseõugu, mille põhjal ehitati geneetiline konsensus-sugupuu

AKHALTEKIIN
ALTAI HOBUNE
ALZEERIA BARB
ANDALUUSIA HOBUNE
ARAABLANE
ARGENTIINA CRIOLLO
ARMEENIA HOBUNE
BELGIA RASKEVEOHOBUNE*
BRETOONI HOBUNE*
CLYDESDALE
DALES PONI
DONI HOBUNE
EESTI HOBUNE*
EESTI RASKEVEOHOBUNE (ERH)*
ERISKAY PONI
EXMOORI PONI*
FELL PONI
FRIISI HOBUNE*
GALICENO
GARANNO
GOTLAND RUSS*
HAFLINGER*
HIGHLAND PONI
HUCUL*
IDA-GRUUSIA HOBUNE
INGLISE TÄISVERELINE
ISLANDI HOBUNE*
JAKUUTIA HOBUNE*
KIRGIISIA CHAAR*
KLADRUBY hall
KLADRUBY must
KNABSTRUPPER
KREETA HOBUNE*
LEEDU RASKEVEOHOBUNE*
LUSITANO
MALOPOLSKI
MONGOOLIA HOBUNE*
NORIKER*
NORRA FJORDIHOBUNE*
PERCHERON*
PIDOS PONI*
POOLA KONIK*
POOLA RASKEVEOHOBUNE*
POOLA TRAKEEN
POSAVINA*
PRANTSUSE TRAAVEL
PRZEWALSKI METSHOBUNE
ROOTSI ARDENNI HOBUNE (RAH)*
SELLE FRANCAIS
SHETLAND PONI
SHIRE
SLEESIA HOBUNE
SOOME HOBUNE*
STANDARDBRED
SUFFOLK PUNCH*
SÜÜRIA ARAABLANE
TRAKEEN
TURKMEENIA HOBUNE
TUSHURI CXENI*
UNGARI HOBUBE
VJATKA HOBUNE
WEILKOPOLSKI
ZABAIKALSKI*
ZEMAITUKAI RASKEVEO TÜÜPI*
ZEMAITUKAI VANA TÜÜPI

*28 tõugu mida kasutati üksikasjalikuks faktoriaalkomponentanalüüsiks