

ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТАРПАНОВИДНИХ КОНЕЙ ПОРОДИ КОНИК ПОЛЬСЬКИЙ ТА ВСТАНОВЛЕННЯ ФІЛОГЕНЕТИЧНИХ ЗВ'ЯЗКІВ ІЗ ДРЕВНІМИ ЕКВІДАМИ

В. В. ДЗІЦЮК, доктор сільськогосподарських наук, професор
<https://orcid.org/0000-0001-9697-4165>

Л. Ф. СТАРОДУБ, доктор сільськогосподарських наук, старший науковий
співробітник

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН
E-mail: Starodublf@gmail.com

Т. М. ДИМАНЬ, доктор сільськогосподарських наук, професор

Білоцерківський національний аграрний університет, Біла Церква

[https://doi.org/10.31548/dopovid1\(101\).2023.002](https://doi.org/10.31548/dopovid1(101).2023.002)

Анотація. Сучасні підходи до генотипування сільськогосподарських тварин з використанням ДНК-маркерів нині з успіхом застосовуються для визначення походження свійських коней і особливостей їх генетичної структури.

Метою нашої роботи є виявлення внутрішньовидової генетичної мінливості тарпановидних коней породи коник польський та встановлення філогенетичних зв'язків між древніми еквідами (плейстоценовий кінь, справжній тарпан) з використанням ISSR-PCR. Для досліджень використали коней породи коник польський з Яворівського національного природного парку та викопні рештки кісток коней плейстоценового періоду (близько 10 тис. р. до нашої ери). Генетичну структуру і міжпородну диференціацію провели за використання восьми ISSR-маркерних систем.

Отримані результати досліджень свідчать про високу ступінь консолідації коней породи коник польський на основі виявленого значення частки поліморфних локусів (P) і індексу інформаційного змісту поліморфізму (PIC).

Полілокусні спектри продуктів ампліфікації ділянки ISSR-PCR виявилися породоспецифічними для досліджених коней. За методом Нея (Nei, 1978) з використанням ISSR-маркерів розрахували генетичні відстані і встановили філогенетичні зв'язки між плейстоценовим конем, справжнім тарпаном та коником польським. Встановлено, що генетична відстань між коником польським і плейстоценовим конем становить $D_N = 0,0881$, а між коником польським і справжнім тарпаном – $D_N = 0,0845$, що свідчить про наявність філогенетичних зв'язків сучасних коней з древніми еквідами. У коня свійського (*Equus caballus*) виявлені видоспецифічні міжмікросателітні ділянки ДНК з розміром 380-400 пн та 500-520 пн.

Отже, генотипування спектрів продуктів ампліфікації з використанням міжмікросателітних праймерів дає змогу достатньо надійно виявляти міжпородні відмінності коней та встановлювати філогенетичні зв'язки між ними.

Ключові слова: *ISSR-PCR маркери, міжмікросателітні фрагменти ДНК, тарпановидні коні, філогенетичні зв'язки.*

Актуальність. У розвитку людського суспільства кінь відіграє важливу роль. Він став складовою частиною господарського та інтелектуального розвитку древніх поселень людей, символом перетворення наступних великих епох. Останнім диким конем, що дожив на території України до кінця XIX ст., на думку багатьох палеонтологів, був тарпан (Крохмальна Т., 1999). Проте, це твердження дотепер ставиться під сумнів. Походження свійського коня та історія виникнення більшості сучасних порід залишається нез'ясованою до нинішнього часу. Пояснюється це тим, що кістки диких коней та одомашнених, практично, однакові. Відсутність діагностичних, анатомічних і біометричних критеріїв не дає можливість визначати археозоологічні рештки коня (Курзенков М., 2018). Для розв'язання цих питань використовують молекулярно-генетичний аналіз ДНК коня. З використанням молекулярних маркерів з'явилися нові можливості вивчення генетичного різноманіття видів тварин, а також визначення філогенетичних зв'язків як на внутрішньо-, так і на міжвидовому рівні. Одним з методів молекулярного аналізу генетичної структури популяцій поліморфізму є метод

ISSR-PCR - дослідження міжмікросателітних фрагментів ДНК.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Одним із методів, який дає змогу провести аналіз генетичної структури і оцінити генетичну різноманітність популяцій є ISSR-PCR – дослідження міжмікросателітних фрагментів ДНК, що знаходяться між двома двома близько розташованими послідовностями, які вважаються унікальними. У результаті одержують значну кількість видоспецифічних паттернів ПЦР-продуктів, представлених дискретними смугами на електрофореграмі. Маркери ISSR-PCR нині отримали широке застосування для таксономічного і філогенетичного порівняння завдяки високій відтворюваності. Методом ISSR-PCR отримані фінгерпринти ДНК ряду ссавців, птахів, риб, рептилій і рослин (Костенко С. О. та ін., 2017).

Мета. Метою роботи є виявлення внутрішньовидової генетичної мінливості тарпановидних коней породи коник польський та встановлення філогенетичних зв'язків між древніми еквідами (плейстоценовий кінь, справжній тарпан) з використанням ISSR-PCR..

Методи. У дослідженнях використовували коней породи коник польський (10 гол., Яворівський

Дзіцюк В. В., Стародуб Л. Ф., Димань Т. М.

національний природний парк, Львівська область) та викопні рештки кісток коней плейстоценового періоду (близько 10 тис. р. до нашої ери), зокрема кістку п'ястку (os. tarsicentral), яка знайдена П. І. Борисовським у 1935 році під час будівельних робіт в кар'єрі в м. Новгород-Сіверський (Чернігівська обл.).

Для дослідження ДНК польських коників відібрали зразки крові з яремної вени (по 5 мл). У дикого коня тарпана (4,5 тис. р. до н. е.) було використано зуб, знайдений В. М. Даниленком 1959 році під час розкопок в с. Скибниця

Тростянецького району Вінницької області. Палеонтологічний матеріал для наших досліджень наданий Київським національним науково-природничим музеєм НААН України (Мохначова Н. та ін. 2020).

Виділення ДНК із викопних кісток проводили після ретельного подрібнення і додавання лізуючих речовин (протеїнази К і дитіоеритритолу) з наступним використанням комерційного набору «ДНК Сорб-В».

Для ампліфікації фрагментів ДНК використовували праймери, підбір яких проводили емпірично (таблиця 1).

1. Характеристика використаних праймерів

Послідовність (5'-3')	Температура відпалу	Мотив
AGAGAGAGAGAGAGAGAGC	58°	(AG) ₉ C
GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	58°	(GA) ₉ C
ACCACCACCACCACCACCG	60°	(ACC) ₆ G
GAGGAGGAGGAGGAGGAGC	60°	(GAG) ₆ C
AGAGAGAGAGAGAGAGCA	54°	(AG) ₈ CA
GAGAGAGAGAGAGACC	44°	(GA) ₆ CC
AGAGAGAGAGAGAGAGCG	56°	(AG) ₈ CG
CTCCTCCTCCTCCTCCTC	64°	(CTC) ₆ C

ПЛР здійснювали на ампліфікаторі «Терцик» з використанням реакційної суміші, яка містила: бідистильованої води – 4,6 мкл, буферу для ДНК полімерази – 2 мкл, суміші трифосфатів («Амплісенс») – 1 мкл, праймерів – 80 пмоль (1,0 мкл/реакцію), ДНК-полімерази («Fermentas», Литва) – 0,83 од.акт. (0,2 мкл). Геномна ДНК

додавалась у кількості 1,2 мкл (25 нг). Загальний об'єм ПЛР-суміші становив 10 мкл.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації здійснювали у 2% агарозному гелі з додаванням бромистого етидію (0,5 мкг/мл). Візуалізацію проводили на транслюмінаторі в УФ-світлі з фотографуванням електрофореграм

Дзіцюк В. В., Стародуб Л. Ф., Димань Т. М.

цифровою камерою. Розмір продуктів ампліфікації визначали з використанням маркеру молекулярних мас Gene Ruler 100 bp ("Fermentas", Литва).

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали стандартними методами (Кандиба Н.М., 2017). Генетичні дистанції визначали на основі даних щодо наявності/відсутності амплікона відповідної довжини у коней породи коник польський, плейстоценового коня та тарпана. Кластерний аналіз та побудова дендрограми виконані із використанням методу математичного усереднення. Розмір ампліфікованих фрагментів визначали з використанням

програмного забезпечення (TotalLab, 2021, GelQuest, 2021).

Результати (Results).

Застосування методу ISSR-PCR дозволяє одержувати мультилокусні спектри, поліморфізм яких відображає специфіку генофонду тварин певної породи (Гиль М.І., 2015). Для виявлення внутрішньопородної мінливості поліморфізму фрагментів ДНК у коней породи коник польський, були проведені дослідження полілокусних спектрів. Для цього використовували ПЛР реакцію, в якості праймерів якої були ди і тринуклеотидні мікросателітні повтори, що відрізнялися коровими мотивами (ISSR-PCR маркери) (рис. 1, табл. 2).

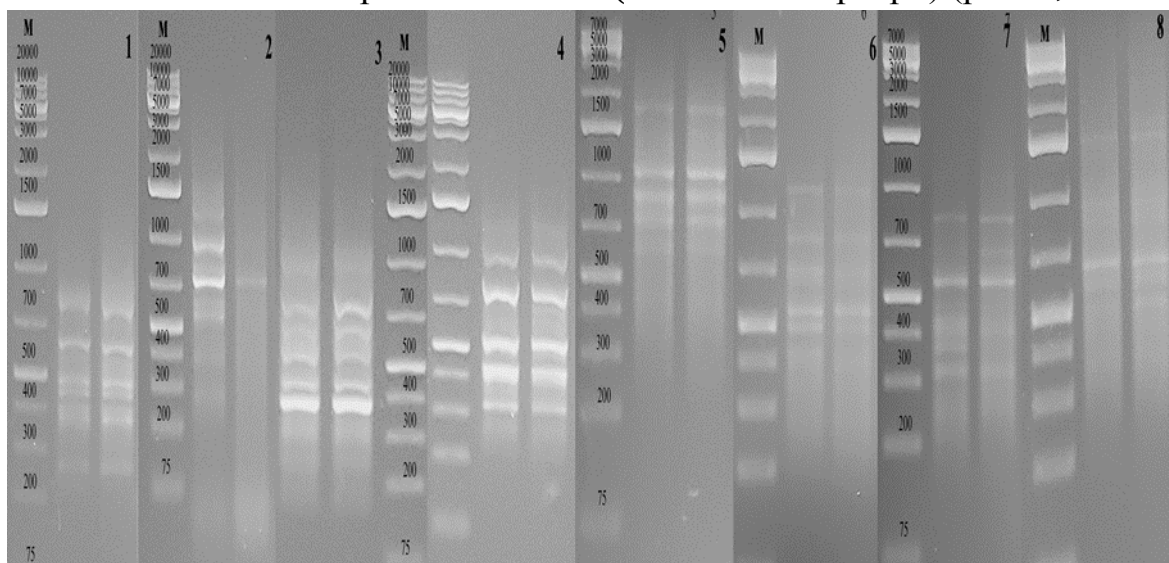


Рис. 1. Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней породи коник польський з праймерами: 1- (GA)₉C; 2 - (ACC)₆G; 3 - (GAG)₆C, 4 - (AG)₉C; 5 - (CTC)₆C; 6 - (AG)₈CA; 7 - (AG)₈CG; 8 - (GA)₆CC.

У результаті проведених досліджень з використанням 8-ми ISSR-маркерів у коника польського виявлено 56 локусів, 14 з яких були поліморфними.

У протестованих коней отримані амплікони довжиною 680-710 п.н. семи ISSR-праймерів, які є найбільш консервативними (за праймером (GA)₉C фрагмент ДНК – відсутній). Також достатньо консервативними

Дзіцюк В. В., Стародуб Л. Ф., Димань Т. М.

фрагментами, що належали трьом і більше праймерам є амплікони в районі довжин 300-310, 380-400, 500-520, 600-630, 820-870 пар нуклеотидів. При застосуванні праймерів $(AG)_8CG$, $(GAG)_6C$, $(CTC)_6C$ спостерігалася повна відсутність поліморфізму продуктів

ампліфікації. Найбільшу кількість поліморфних локусів (6 із 7) знайдено з використанням $(ACC)_6G$ праймера ($PIC=0,36$, $P=85,4\%$) та 4 з 9 поліморфних локусів з використанням $(AG)_9C$ праймера при $PIC=0,21$, а $P=44,4\%$.

2. Основні параметри спектрів ампліфікації ISSR-PCR маркерів коней породи коник польський (n=10)

Прай мер	$(GA)_9C$	$(AG)_9C$	$(AG)_8CA$	$(AG)_8C$	$(GA)_6C$	$(ACC)_6G$	$(GAG)_6C$	$(CTC)_6C$	В сумі за 8 прай мерами
Кількість локусів	6	9	6	7	6	8	9	5	56
Межі довжин	360-870	240-1290	380-1350	300-1290	500-1550	380-1450	240-1050	600-1750	240-1750
Кількість поліморфних локусів	1	4	1	0	1	7	0	0	14
PIС	0,08	0,21	0,07	0	0,04	0,36	0	0	0,09
P, %	16,6	44,4	16,6	0	16,6	85,4	0	0	22,4

Ці локуси помірно та низько поліморфні (локуси зі значенням PIC в межах 0,250-0,500 – помірно поліморфні, при $PIC<0,25$ – низько поліморфні). У спектрах праймерів $(GA)_9C$, $(AG)_8CA$, $(GA)_6CC$ знайдено лише по одному поліморфному локусу. Межі величин $PIC=0,04-0,08$ та $P=16,6\%$ вказують на те, що ці локуси – низько поліморфні. Одержане низьке значення частки поліморфних локусів (P) і індексу PIC свідчить про високу ступінь генетичної консолідації коней породи

коник польський та можливу репродуктивну ізоляцію популяції.

Для встановлення філогенетичних зв'язків між кінськими породами коник польський та давніми еквідами досліджено полілокусні спектри плейстоценового коня та справжнього тарпану із ДНК викопних кісток з використанням в якості праймерів динуклеотидних та тринуклеотидних мікрсателітних повторів $(GA)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$, $(ACC)_6G$ (рис.2, табл. 3).

Дзіцюк В. В., Стародуб Л. Ф., Димань Т. М.

3. Основні параметри спектрів ампліфікації ISSR-PCR маркерів молекули ДНК викопних кісток плейстоценового коня і справжнього тарпана

Праймер	(GA) ₉ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ CG	(GA) ₆ CC	(ACC) ₆ G	В сумі за 5 праймерами
Кількість локусів: плейстоценовий кінь;	4	4	5	8	8	29
справжній тарпан	10	4	7	11	4	36
Межі довжин: плейстоценовий кінь;	340-520	380-550	300-550	320-870	260-590	260-870
справжній тарпан	260-1050	300-590	240-550	320-1050	340-870	240-1050

У спектрах ампліфікації ISSR-PCR маркерів ДНК викопних кісток плейстоценового коня за 5 праймерами знайдено 29, а для викопних кісток справжнього

тарпана – 36 локусів. Межі довжин ампліконів плейстоценового коня становили 260-870 пн, в справжнього тарпана – 240 – 1050 пн.

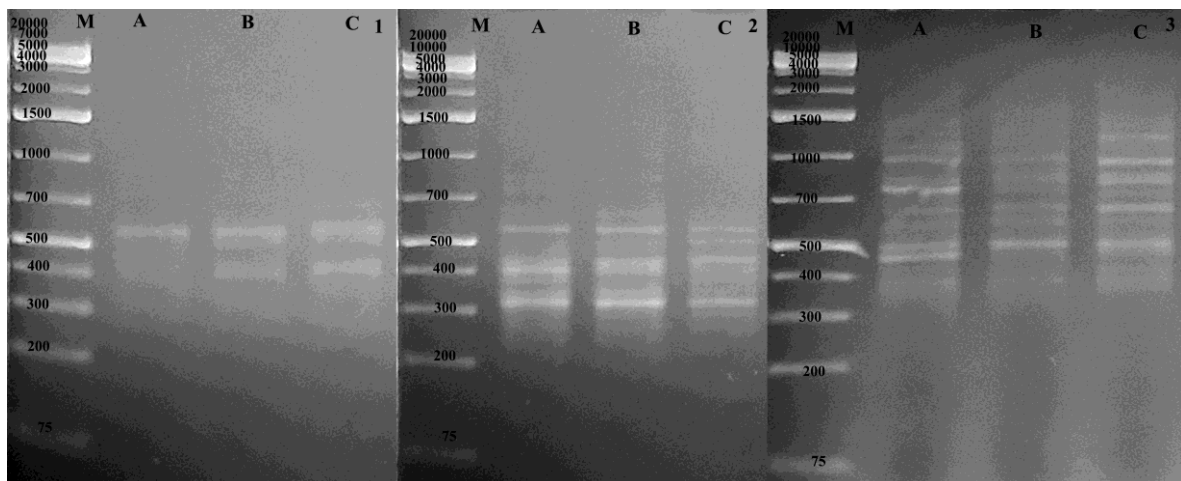


Рис. 2. Спектри фрагментів ампліфікації ДНК викопних кісток плейстоценового коня та справжнього тарпана з праймерами: 1-(AG)₈CA; 2-(AG)₈CG; 3-(GA)₆CC.

Примітка: А, В – плейстоценовий кінь; С – справжній тарпан

Дзіцюк В. В., Стародуб Л. Ф., Димань Т. М.

Для розв'язання питання походження, видової та породної приналежності досліджуваних коней, проведено полілокусне генотипування із використанням оцінки довжин фрагментів ДНК. Одержані спектри продуктів ампліфікації коней породи коника польського та спектри продуктів ампліфікації викопних решток плейстоценового коня і справжнього тарпана, на 97% за універсальною шкалою розмірності ISSR – фрагментів в пн (Гиль М.І., 2015) належали до «легких» (А-35 – А-25) та «середніх» (А-25 – А-13), що можна віднести до специфічної характеристики виду *E. caballus*.

Фрагменти розміром 380-400 п. н. та 500-520 п. н. були присутні у спектрах продуктів ампліфікації всіх представників виду *Equus caballus* та *Equus ferus* досліджених нами, не менше як за 3 праймерами. Отже, ці фрагменти є видоспецифічними спектрами ПЛР-продуктів, одержані методом ISSR-PCR для підроду *Equus* (Супрун І.О., Куриленко Ю.Ф., 2014).

Спектри продуктів ампліфікації розміром 680-710 п. н. за 5 праймерами (праймер (GA)₉C відсутній) притаманні коням породи коник польський, що можна віднести до породоспецифічних фрагментів. Амплікони молекули ДНК цих розмірів, одержані із викопних решток справжнього тарпана проявилися за 2 праймерами, у плейстоценового коня – за 1 праймером.

У результаті проведеної роботи встановлено, що амплікони молекули ДНК розміром 340-350 п. н. праймера (GA)₉C та 470-490 п. н. праймерів (GA)₉C і (GA)₆CC проявилися лише у викопних решток плейстоценового коня і справжнього тарпана, що свідчить про втрату алельної різноманітності у сучасних коней через їх одомашнення.

На основі даних про наявність ампліконів відповідної довжини у коней породи коник польський та плейстоценового коня і справжнього тарпана визначені генетичні дистанції та побудована дендрограма (табл.4, рис.3).

4. Генетична відстань (Nei, 1978) між кіньми породи коник польський та викопними рештками плейстоценового коня і справжнього тарпана за використанням методу усереднених відстаней даних ISSR-PCR маркерів

Види	Коні породи коник польський	Справжній тарпан	Плейстоценовий кінь
Коник польський	*****		
Справжній тарпан	0,0845±0,0220	*****	
Плейстоценовий кінь	0,0881±0,0240	0,0554±0,0253	*****

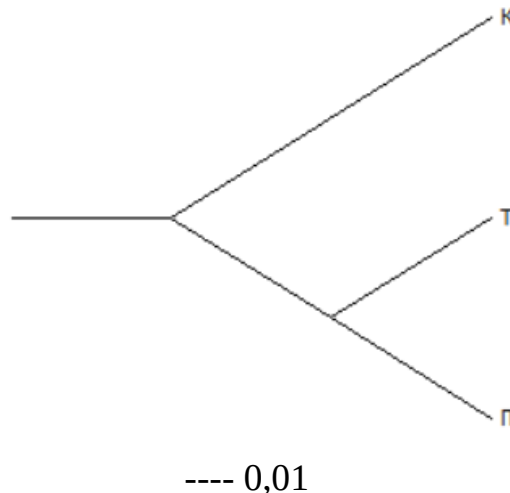


Рис. 3 Дендрограма генетичних відстаней на основі методу усереднених даних між кіньми породи коник польський, плейстоценовим конем і справжнім тарпаном за використанням $(GA)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$, $(ACC)_6G$ праймерів

Примітка: К- коні породи коник польський; Т – справжній тарпан; П – плейстоценовий кінь. Масштаб показує генетичну відстань (Nei, 1978)

Одержані результати показали, що генетична відстань за даними ISSR-PCR маркерів між кіньми породи коник польський і плейстоценовим конем становила $D_N = 0,0881$, а справднім тарпаном – $D_N = 0,0845$ із недостовірною різницею середніх величин, що свідчить про наявність філогенетичних зв'язків сучасних коней з древніми еквідами. За результатами досліджень найменша генетична відстань спостерігалася між плейстоценовим конем і справжнім тарпаном ($D_N = 0,0554$).

Висновки і перспективи (Discussion). Виявлено низьке значення частки поліморфних локусів (P) і індексу поліморфного інформаційного змісту (PIC), яке свідчить про високу ступінь

генетичної консолідації дослідженої групи коней породи коник польський та можливу репродуктивну ізоляцію популяції.

Встановлено, що генетичні відстані між ампліконами ISSR-PCR маркерів коней породи коник польський і викопними рештками плейстоценового коня становили $D_N = 0,0881$ та між рештками справжнього тарпана - $D_N = 0,0845$, що свідчить про наявність поліфілогенетичних зв'язків сучасних коней з древніми еквідами.

Застосування мультилокусного міжмікросателітного аналізу ДНК є інформаційним для проведення популяційно-генетичних досліджень та встановлення філогенетичних зв'язків сучасних порід з їх давніми предками.

Список використаних джерел

1. Крохмальна Т. К истории изучения древних Equidae Украины. Конь Пржевальского (*Equus Przewalskii*, 1881). Материалы VI Международного симпозиума, посвященного 100-летию разведения вида в заповеднике «Аскания-Нова». **Вестник зоологии**. 1999 . Окр. Додаток. №11. 240 с.
2. Курзенков М. Походження та domestикація коня у дослідженнях з молекулярної біології. Історичні і політологічні дослідження. 2018. № 2 (63). С. 11–30.
3. Костенко С. О., Джус П. П., Коновал О. В., Сидоренко О. В., Стародуб Л. Ф., Драгулян М. В. Видові особливості поліморфізму та геномної нестабільності свині свійської (*Sus scrofa*) і великої рогатої худоби (*Bos Taurus*) за цито- та ДНК маркерами. Київ: ЦП «Компринт» 2017. 243 с.
4. Мохначова Н., Стародуб Л., Добрянська М. Оптимізація методу виділення ДНК з викопних решток. Розведення і генетика тварин. 2020. № . 60. С. 110 – 115. DOI: <https://doi.org/10.31073/abg.60.01>
5. Кандиба Н. М. Генетика: курс лекцій : навч. посіб. Суми : Університетська книга, 2017. 397 с.
6. TotalLab. [http:// www.totallab.com](http://www.totallab.com) (дата звернення: 01.04.2021).
7. GelQuest. <http://www.sequentix.de/gelquest> (дата звернення: 01.04.2021).
8. Гиль М.І., Сметана О.Ю., Юлевич О.І. та ін. Молекулярна генетика та технологія дослідження генома: навч. Посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2015. 320 с.
9. Супрун І. О., Куриленко Ю. Ф. Моніторинг генетичного поліморфізму популяцій коней за використання ISSR – маркерів. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія 6 Тваринництво. Суми, 2014. Вип. 2 /1 (24). С. 181-186.
10. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978. P. 583- 590. DOI: [10.1093/genetics/89.3.583](https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583)

References

1. Krokmalna T.(1999). K istorii izucheniya drevnikh Equidae Ukrainy. [On the history of the study of the ancient Equidae of Ukraine.] *Osnovni napryamky doslidzhen', okhorony ta reintroduktsiyi u pryrodu konya Przheval's'koho*. Materialy VI Mizhnarodnoho sympoziumu. (pp. 109-114). (Kyiv-Askania Nova, October 5-8), Askaniya Nova, pp. 109-114 (in Ukrainian).
2. Kurzenkov M. (2018). Pokhodzhennya ta domestykatsiya konya u doslidzhennyakh z molekulyarnoyi biolohiyi. [The origin and domestication of the horse in research in molecular biology]. *Historical and political studies*. 2018. No. 2 (63). P. 11–30. (in Ukrainian).
3. Kostenko S. O., Dzhus P. P., & Starodub L. F. (2017) Vydovi osoblyvosti polimorfizmu ta henomnoyi nestabil'nosti svyni sviys'koyi (*Sus scrofa*) i velykoyi rohatoyi khudoby (*Bos Taurus*) za tsyto- ta DNK markeramy. [Species-specific features of polymorphism and genomic instability of domestic pig (*Sus scrofa*) and cattle (*Bos Taurus*) by cyto- and DNA markers]. Kyiv: Printing Center "Comprint" (in Ukrainian).
4. Mokhnachova N., Starodub L., Dobryanska M.(2020). Optyimizatsiya metodu vydilennya DNK z vykopnykh reshtok.[Optimization of the method of DNA extraction from fossil remains]. *Animal breeding and genetics*.no 60, pp110 – 115. DOI: <https://doi.org/10.31073/abg.60.01> (in Ukrainian).
5. Kandyba N. M. (2017) Henetyka: kurs lektsiy : navch. Posib. [Genetics: a course of lectures: teaching. Manual] Sumy: University book. (in Ukrainian).
6. TotalLab.(2020): [http:// www.totallab.com](http://www.totallab.com) (accessed: 04/01/2021).
7. GelQuest.(2017): <http://www.sequentix.de/gelquest> (accessed: 01.04.2021).
8. Gil M.I. (2015). Molekulyarna henetyka ta tekhnolohiya doslidzhennya henoma: navch. Posibnyk . [Molecular genetics and genome research technology: training. Manual. navch. Posibnyk]. Kherson : OLDI – PLYUS (in Ukrainian).
9. Suprun I. O., Kurylenko Yu. F.(2014) Monitorynh henetychnoho

Дзіцюк В. В., Стародуб Л. Ф., Димань Т. М.

polimorfizmu populyatsiy koney za vykorystannya ISSR –markeriv. Monitoring of genetic polymorphism of horse populations using ISSR markers. Bulletin of the Sumy National Agrarian University. Series 6

Livestock. Sumy, vol. 2/1 (24). pp. 181-186. (in Ukrainian).

10. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 1978. P. 583- 590. DOI: 10.1093/genetics/89.3.583.

GENETIC FEATURES OF TARPAN-LIKE HORSES OF THE POLISH PRIMITIVE (THE KONIK) BREED AND ESTABLISHMENT OF PHYLOGENETIC OF ANCIENT EGUIDS

V. V. Dzitsuik, L. F. Starodub, T. M. Dyman

Abstract. *Determining the origin of domestic horses and the features of their genetic structure is now carried out using DNA technologies.*

The aim of the work is to identify intraspecific genetic variability of tarpan horses of the Polish grasshopper breed and to establish phylogenetic relationships between ancient equids (Pleistocene horse, true tarpan) using ISSR-PCR. Horses of the Polish grasshopper breed (10 head) from the Yavoriv National Nature Park of the Lviv region were used for the research. and fossil remains of horse bones from the Pleistocene period (about 10,000 BC). Genetic structure and interbreed differentiation were carried out using eight ISSR marker systems.

The obtained results of the research indicate a high degree of consolidation of horses of the Polish grasshopper breed based on the revealed value of the share of polymorphic loci (P) and the index of information content of polymorphism (PIC).

The polylocus spectra of ISSR-PCR site amplification products were breed-specific for the studied horses. According to Nei's method (Nei, 1978) using ISSR markers, genetic distances were calculated and phylogenetic relationships between the Pleistocene horse, the true tarpan and the Polish grasshopper were established. It was established that the genetic distance between the Polish grasshopper and the Pleistocene horse is $DN = 0.0881$, and between the Polish grasshopper and the real tarpan - $DN = 0.0845$, which indicates the presence of phylogenetic connections between modern horses and ancient equids.

*Species-specific intermicrosatellite DNA regions with a size of 380-400 bp and 500-520 bp for the domestic horse (*Equus caballus*) were identified.*

Genotyping of the spectra of amplification products using inter-microsatellite primers makes it possible to reliably detect interbreed differences in horses and establish phylogenetic relationships between them.

Key words: *ISSR-PCR markers, intermicrosatellite DNA fragments, tarpan horses, phylogenetic relationships*