

УДК 636.1.082: 575

О.В. Мельник^{1,3}, В.В. Дзіцюк¹, В.Г. Спиридонов^{1,3}, А.В. Шельов², С.Д. Мельничук³
**ЗВ'ЯЗОК ІНБРИДИНГУ КОНЕЙ ЧИСТОКРОВНОЇ ВЕРХОВОЇ ПОРОДИ ЗІ
СТУПЕНЕМ ГОМОЗИГОТНОСТІ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ДНК**

¹Національний університет біоресурсів та природокористування України

²Інститут розведення та генетики тварин

³Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК

У роботі на основі даних генетичного аналізу встановлено ступінь гомозиготності 39 голів коней чистокровної верхової породи. Із використанням родоводів коней визначено ступінь їх інбридингу. Встановлено, що для визначення фактичного рівня інбридингу доцільно використовувати генетичний аналіз мікросателітних локусів ДНК.

Ключові слова: інбридинг, ступінь гомозиготності, мікросателітні локуси.

О.В. Мельник^{1,3}, В.В. Дзицюк¹, В.Г. Спиридонов^{1,3}, А.В. Шелев², С.Д. Мельничук³
**СВЯЗЬ ИНБРИДИНГА ЛОШАДЕЙ ЧИСТОКРОВНОЙ ВЕРХОВОЙ ПОРОДЫ
СО СТЕПЕНЬЮ ГОМОЗИГОТНОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ
ДНК**

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

Институт разведения и генетики животных

Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК

В работе на основе данных микросателлитного анализа установлена степень гомозиготности 39 голов лошадей чистокровной верховой породы. На основании данных родословных определено степень инбридинга. Установлено, что для определения фактического уровня инбридинга стоит использовать генетический анализ микросателлитных локусов ДНК.

Ключевые слова: инбридинг, степень гомозиготности, микросателлитные локусы.

O.V. Melnyk^{1,3}, V.V. Dzitsiuk¹, V.G. Spyrydonov^{1,3}, A.V. Shelyov², S.D. Melnychuk³
**RELATION OF INBREEDING OF HORSES OF THOROUGHBRED BREED WITH
DEGREE OF HOMOZYGOSITY OF MICROSATELLITE LOCI OF DNA**

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

²The Institute of Animals Breeding and Genetics

³Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products.

The degree of homozygosity of some 39 Thoroughbred horses was estimated from microsatellite analysis data. The power of inbreeding was detected towards horse pedigree. We suggested the use of genetic analysis of microsatellite loci of DNA for the determination of actual level of inbreeding.

Keywords: inbreeding, degree of homozygosity, microsatellite loci.



Питання інбридингу у тваринництві залишається досить актуальним, проте доцільність його використання постійно викликає суперечки в науковців. З одного боку, майже всі породи домашніх тварин було виведено з використанням тісного інбридингу, який дозволив закріпити у нащадків бажані ознаки батьків. До того ж, за допомогою використання інбридингу можна виявляти тварин-носіїв летальних рецесивних алелів і вилучати їх із селекційного процесу. З іншого боку, парування близьких родичів може призводити до інбредної депресії, яка негативно позначається на відтворних та продуктивних якостях тварин (Кушнер, 1964). Головною причиною такого впливу тісного інбридингу з точки зору генетики є збільшення гомозиготності інбредних особин, в результаті якого збільшується ймовірність переходу летальних генів у гомозиготний стан. Прояв інбредної депресії при чистопородному розведенні залежить від ступеня споріднених парувань і генетичної природи ознак. Найбільш негативна дія інбридингу проявляється за ознаками з низьким і середнім рівнем успадкування (Россоха, 1984).

Підтримка генетичного різноманіття є необхідною умовою для творчої селекційної роботи (Храброва, 2005). Низький рівень інбридингу разом зі збереженням високого рівня генетичної мінливості є однією з складових програми збереження генетичного різноманіття у популяціях (Кузнецов, 2000; Frankham, 2003). Так, результати досліджень Silva та ін. (Silva et al., 2012) свідчать про те, що втрата генетичної різноманітності у п'яти природних породах коней Бразилії стала результатом близькородинного розмноження у малих популяціях і використання екзотичних порід.

Встановлено, що інтенсивне використання інбридингу негативно впливає на відтворну здатність коней. Так, кожен відсоток зростання рівня інбридингу в кобил збільшує кількість ранніх абортів на 1,27% (Klemetsdal, 1989; Sairanen, 2009). Дослідження, проведені Головач (2002), показали, що навіть за незначного підвищення рівня інбридингу спостерігається значне зниження жеребності та плодючості. Так, при рівні інбридингу 0,1 – 2,0 жеребність та плодючість кобил знижувалися на 13,1 та 9,8%, відповідно. При цьому також спостерігалася зростання яловості та простежувалася тенденція до зростання основних промірів тіла (Головач, 2002).

Досить суперечливим питанням є метод визначення ступеня інбридингу. За досить тривалий період його використання, в тваринництві розроблено чимало способів визначення величини інбридингу. Однак, у селекційній практиці для його обрахунку зазвичай використовують формулу Райта (Антипов, 2003).

На сьогодні основним методом контролю ступеня інбридингу сільськогосподарських тварин є дані племінних записів. Останні не завжди

можуть бути достовірними, що, ускладнює селекційну роботу і може призводити до непередбачуваних наслідків. Оскільки рівень інбридингу характеризує ступінь гомозиготності тварини, то найбільш надійним методом її визначення є використання генетичних маркерів. Тривалий час для генетичного аналізу тварин використовували поліморфізм білків та ферментів крові, генетичні системи груп крові. Останнім часом, відповідно до вимог Міжнародного товариства з генетики тварин ISAG та Міжнародного комітету з племінних книг ISBC, все більше лабораторій для проведення тестування використовують мікросателітні локуси ДНК. Для чистокровних порід коней генетичний аналіз за мікросателітами є обов'язковим (Храброва, 2010а).

Дані, отримані Bowling (Bowling, 1996) на основі аналізу білкового поліморфізму, підтвердили, що чистокровна верхова порода була найбільш інбредною серед досліджуваних. Дослідження цієї ж породи за SNP-маркерами, проведені Binns та ін. (Binns et al., 2011), підтвердили зростання ступеню інбридингу. Його основною причиною було збільшення навантаження на жеребця, а отже, і зменшення кількості використання плідників у селекційному процесі.

Використання аналізу поліморфізму мікросателітних локусів є одним із найнадійніших методів визначення ступеня гомо- і гетерозиготності. Проведення генетичного аналізу за мікросателітними маркерами дозволяє провести генетичну експертизу походження і, таким чином, переконатися у достовірності даних родоводів тварини. Подібні дослідження з впливу інбридингу на ступінь гомозиготності локусів мікросателітної ДНК коней в Росії були проведені Гаврилічовою та Храбровою (Гавриличева, 2004; Храброва, 2010b). В Україні подібних досліджень у конярстві не проводили. Тому метою нашої роботи було встановлення зв'язку рівня інбридингу коней чистокровної верхової породи зі ступенем гомозиготності мікросателітних локусів ДНК.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Генетичний аналіз 39 голів коней чистокровної верхової породи з відомим родоводом проводили в Українській лабораторії якості і безпеки продукції АПК. Периферійну кров відбирали у стерильні вакуумні пробірки із консервантом EDTA. Геномну ДНК виділяли, використовуючи набори «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Росія) згідно інструкції виробника. Генетичний аналіз проводили за 12 мікросателітними локусами, які входять до переліку рекомендованих ISAG для проведення генетичної експертизи походження коней: АНТ04, АНТ05, ASB17, ASB23, СА425, HMS03, HMS06, HMS07, НТГ04, НТГ06, НТГ07, VHL20. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за стандартних умов на ампліфікаторі Veriti 96-Well (Applied Biosystems, США) за наступних параметрів: перший етап – початкова денатурація (95 °С – 10 хв.); другий етап – 30 циклів (95 °С – 30 с; 60 °С – 30 с; 72 °С – 1 хв.). Заключний третій етап тривав 60 хв. при 72 °С (Спиридонов, 2010). Продукти ампліфікації

ISSN 2225-5486 (Print), ISSN 2226-9010 (Online). Біологічний вісник МДПУ. 2013. №2



денатурували формамідом (Sigma, США) та проводили електрофорез на 4-капілярному генетичному аналізаторі ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) згідно протоколу виробника. Розмір алелів визначали, використовуючи розмірний стандарт Genescan-LIZ 500 (Applied Biosystems, США) та програмне забезпечення *Gene Mapper 3.7* (Applied Biosystem, США).

Ступінь гомозиготності мікросателітних локусів для кожної тварини визначали методом прямого підрахунку на основі отриманих даних генетичного аналізу.

На основі даних 5 рядів родоводів за формулою Райта визначали ступінь інбридингу (Wright, 1933):

$$F_x = \sum \left[\left(\frac{1}{2} \right)^{n_1 + n_2 - 1} \times (1 + F_a) \times 100 \right], \quad (1).$$

де F_x – коефіцієнт інбридингу досліджуваної тварини;

n_1 – кількість поколінь за батьківською лінією від спільного предка, включаючи і його самого;

n_2 – кількість поколінь за материнською лінією від спільного предка, включаючи і його самого;

F_a – коефіцієнт інбридингу предка.

Усе досліджуване поголів'я в залежності від величини коефіцієнту інбридингу було поділене на 4 групи: I ($F=0$; аутбредні); II ($F = 0,1-2$); III ($F = 2,1-4$); IV ($F = 4,1$ і більше). Для кожної групи визначали середнє значення рівня гомозиготності за досліджуваними мікросателітними локусами ДНК в залежності від рівня інбридингу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Середній рівень інбридингу в популяції становив 1,29%. Серед досліджуваного поголів'я найбільший відсоток (41,03%) складали тварини із рівнем інбридингу 0,1–2%. Дещо менша кількість тварин (12 гол.) у п'яти рядах родоводів спільних предків не мала і була аутбредною (табл.1).

Таблиця 1. Розподіл коней чистокровної верхової породи за рівнем інбридингу та ступенем гомозиготності

Ступінь гомозиготності	Коефіцієнт інбридингу				Всього голів
	0	0,1 – 2	2,1 – 4	4,1 і більше	
0/12 0%	0	1	0	0	1 (2,56%)
1/12 8,33%	0	2	0	0	2 (5,13%)
2/12 16,67%	1	3	0	1	5 (12,82%)
3/12	2	1	0	0	3 (7,69%)

25%					
4/12	2	2	1	1	6 (15,38%)
33,33%					
5/12	3	4	3	0	10 (25,64%)
41,67%					
6/12	3	2	1	1	7 (17,96%)
50%					
7/12	1	0	1	0	2 (5,13%)
58,33%					
8/12	0	0	1	1	2 (5,13%)
66,7%					
9/12	0	1	0	0	1 (2,56%)
75%					
Всього, гол.	12	16	7	4	39
%	30,76	41,03	17,95	10,26	100

Найбільші коливання ступеню гомозиготності спостерігалися у тварин із рівнем інбридингу 0,1 – 2% і знаходилися в межах від 0 до 75%. Ступінь гомозиготності аутбредних коней, які є 100% гетерозиготами, коливалася від 16,67 до 58,33%. Цей інтервал виявився дещо меншим, ніж за даними Храбрової (від 0 до 69,2%, Храброва (2010b)).

Переважає більшість коней (25,64%) мала ступінь гомозиготності на рівні 41,67%. Максимального значення (75%) гомозиготність мікросателітних локусів досягла при рівні інбридингу 0,1 – 2. На основі отриманого розподілу коней було визначено середні значення ступеню гомозиготності за різних рівнів інбридингу.

У ході аналізу виявилось, що рівень гомозиготності аутбредних коней знаходився на рівні 38,89%. При коефіцієнті інбридингу 0,1–2 гомозиготність знизилася і досягла значення 31,25. За рівня інбридингу 2,1–4 у коней чистокровної верхової породи спостерігалось зростання рівня гомозиготності до 47,62%. Проте, вже за рівнем інбридингу 4,1 і більше ступінь гомозиготності знижувався до 41,68% (рис. 1).

В цілому ж, при зростанні коефіцієнту інбридингу спостерігалася невелика позитивна динаміка рівня гомозиготності.

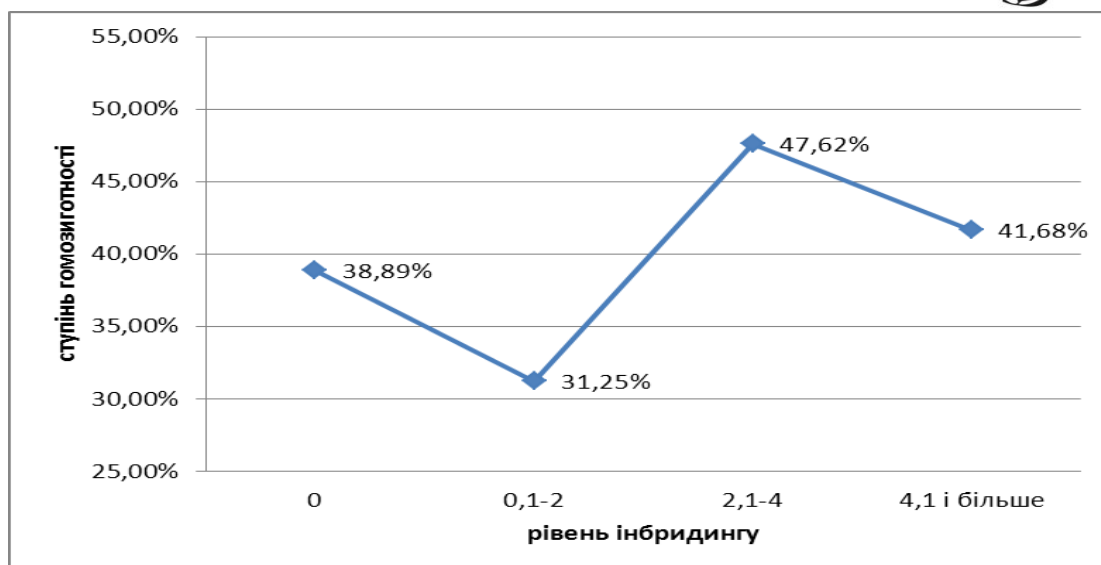


Рис. 1. Рівень гомозиготності коней із різним ступенем інбридингу

Результати досліджень із впливу рівня інбридингу на ступінь гомозиготності стандартбредних рисаків, проведені Гаврилічовою та ін. (Гаврилічева та ін., 2004), також не виявили лінійної залежності між цими показниками.

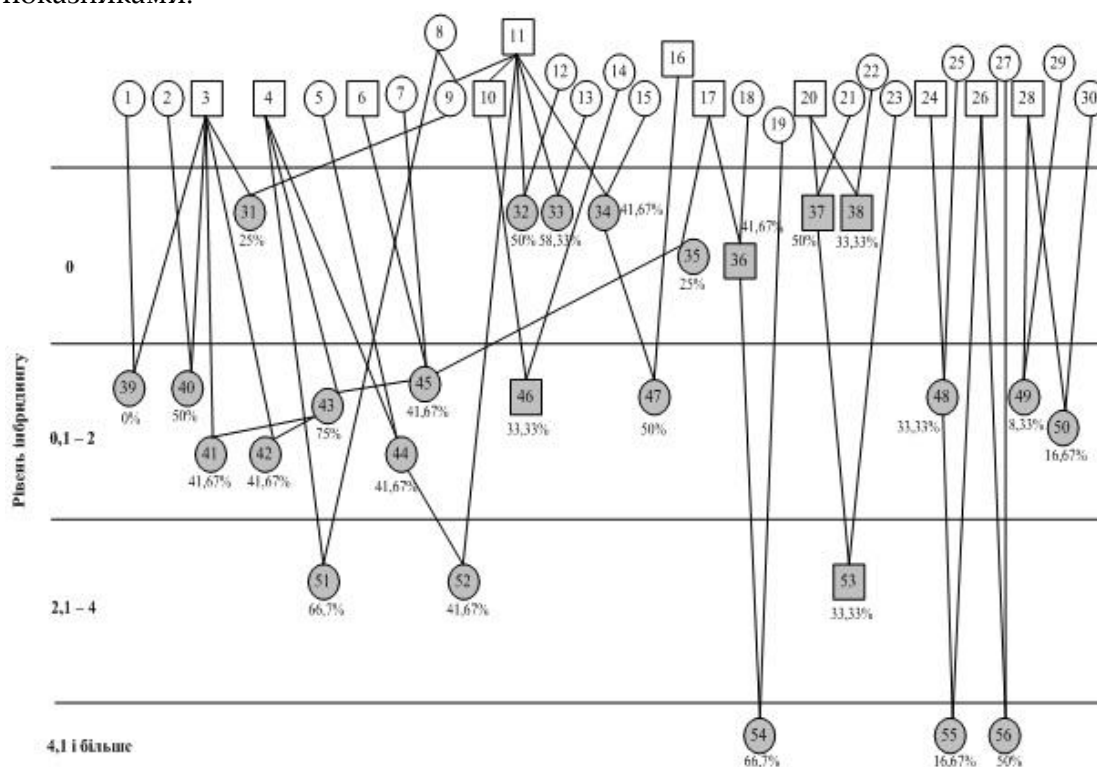


Рис. 2. Схема родоводів коней з різним ступенем інбридингу

● – тварини, прогенотиповані за 12 мікросателітними локусами; відсотками позначено ступінь гомозиготності мікросателітних локусів

При детальнішому аналізі кожної особини були отримані наступні результати (див. рис. 2, де наведено розподіл частини прогенотипованих коней за рівнем інбридингу та вказано ступінь гомозиготності коней за мікросателітними локусами ДНК).

Наприклад, серед аутбредних коней, які мають бути 100% гетерозиготами, не було виявлено жодної голови зі ступенем гомозиготності 0%. Проте, у групі тварин із рівнем інбридингу 0,1–2 тварина №39 виявилася гетерозиготною за 12 досліджуваними мікросателітними локусами. Максимальний ступінь гомозиготності (75%) також було зафіксовано для коней цієї ж групи (тварина № 43) (для порівняння, в аутбредних тварин максимальний ступінь гомозиготності був у тварини № 33 – 58,33%). Коливання гомозиготності у коней з рівнем інбридингу 2,1 – 4 було меншим, ніж в попередніх випадках, і знаходилося в межах 33,33 (тварина № 53) – 66,7% (тварина № 51). В усіх трьох групах переважна більшість тварин мала ступінь гомозиготності 41,67%. Найменша кількість коней (4 гол., або 10,26%) утворювала групу з інбридингом 4,1 та більше. Причому, мінімальний ступінь гомозиготності серед них був таким же, як і для аутбредних коней та тварин з рівнем інбридингу 0,1 – 2 – 16,67%. Що стосується максимального показника ступеню гомозиготності, то він виявився меншим, ніж у тварини № 43 – лише 66,7%. Незважаючи на невелику вибірку дослідженого поголів'я чистокровної верхової породи, отримані нами дані підтверджують результати досліджень, отримані Храбровою (2005, 2010а, 2010b)

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження свідчать про те, що для визначення фактичного рівня інбридингу доцільно проводити генетичний аналіз досліджуваної популяції за поліморфними мікросателітними локусами ДНК, оскільки визначення інбридингу за формулою Райта вказує лише на ймовірність переходу частини генів до гомозиготного стану. До того ж, генетичний аналіз за використаними у дослідженні локусами дозволяє контролювати передачу спадкового матеріалу одразу за 10 хромосомами.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Антипов Г.П. О научной обоснованности нового метода определения степени инбридинга // Зоотехния. – 2003. – №2. – С. 2 – 5.
- Гавриличева И.С., Храброва Л.А. Влияние степени инбридинга на уровень гомозиготности лошадей американской стандартбредной породы // Искусственное осеменение лошадей – истоки биотехнологии в животноводстве: тез. докл./ ВНИИ коневодства. – Дивово, 2004. – С.145 – 148.



- Головач М.Й. Вплив рівня інбридингу на показники відтворення і проміри коней гуцульської породи і їх помісей // Наук.-техн. бюл. /УААН. Ін-т тваринництва. – Х., 2002. – №82. – С. 48 – 51.
- Кузнецов В.М. Инбридинг в животноводстве: методы оценки и прогноза. – Киров. – 2000. – 66 с.
- Кушнер Х.Ф. Наследственность сельскохозяйственных животных. – М.: «Колос», 1964. – 487 с.
- Россоха В.И. Влияние различных степеней инбридинга на формирование генотипа свиней и их хозяйственно-биологических качеств: дисс. канд. с.-х. н. 02.06.01 «Разведение и селекция сельскохозяйственных животных». – Харьков. – 1984. – 166 с.
- Спиридонов В.Г., Шельов А.В., Кухтіна К.В., Мельничук С.Д., Григорюк І.П. Генетична ідентифікація та експертиза походження свійських коней (*Equus caballus*) мікросателітними фрагментами дезоксирибонуклеїнової кислоти. (Методичні рекомендації). – К.: Видавничий центр НУБіП України, 2010. – 20 с.
- Храброва Л.А. Влияние инбридинга на степень гомозиготности чистокровных верховых лошадей по локусам микросателлитов ДНК // Коневодство и конный спорт. – 2010а. – №5. – С. 7 – 8.
- Храброва Л.А. Использование генетических исследований в коневодстве // Коневодство и конный спорт. – 2010б. – №2. – С. 11 – 13.
- Храброва Л.А. Методические рекомендации по ведению генетического мониторинга местных пород лошадей. – Дивово. – 2005. – 50 с.
- Binns M.M., Boehler D.A., Bailey E., Lear T.L., Cardwell J.M., Lambert D.H. Inbreeding in the Thoroughbred horse // *Animal genetics*. – 2011. – Vol. 43. – P. 340 – 342.
- Bowling A.T. *Horse Genetics*. CABI, Oxford. – 1996 – 517 p.
- Frankham R., Ballou I.D., Briscoe D.A. *Introduction to conservation genetics*. – Cambridge: Cambridge University Press. – 2003. – 607 p.
- Klemetsdal G., Johnson M. Effect of Inbreeding on Fertility in Norwegian Trotter Livestock // *Production Science*. – 1989. – V. 21. – P. 263 – 272.
- Sairanen J., Nivola K., Katila T., Virtala A.-M., Ojala M. Effects of inbreeding and other genetic components on equine fertility // *Animal*. – 2009. – V. 3 (12). – P. 1662 – 1672.
- Silva A.C.M., Paiva S.R., Albuquerque M.S.M., Egito A.A., Santos S.A., Lima F.C., Castro S.T., Mariante A.S., Correa P.S., McManus C.M. Genetic variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers // *Genetics and Molecular Research*, 2012. – Vol. 11 (2). – P. 881 – 890.
- Wright S. Inbreeding and Homozygosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 1933. – No. 19. – P. 411 – 420.

REFERENCES

- Antipov, G.P. (2003). On the scientific validity of a new method of determining the degree of inbreeding. *Husbandry*. 2, 2-5.
- Gavrilicheva, I.S., Khrabrov, L.A. (2004). Effect of inbreeding on the level of homozygosity of the American Standardbred horse breed. In *Artificial insemination of horses - the origins of biotechnology in animals. Proceedings.* Institute of Horse Breeding.
- Kuznetsov, V.M. (2000). Inbreeding in cattle: the methods of estimation and prediction. - Kirov.
- Kushner, H.F. (1964). Heredity of agricultural animals. Moscow: Kolos.
- Rossokha, V.I. (1984). The effect of different degrees of inbreeding on the formation of the genotype of pigs and their economic and biological qualities. *Doctors Thesis.* Kharkov.
- Khrabrova, L.A. (2010a). Effect of inbreeding on the degree of homozygosity of Thoroughbred horses on microsatellite DNA loci. *Horse breeding and horse riding*. 5, 7-8.
- Khrabrova, L.A. (2010b). The use of genetic studies in the horse breeding. *Horse breeding and horse riding*. 2, 11-13.
- Khrabrova, L.A. (2005). Guidelines on the management of genetic monitoring of local breeds of horses. *Divovo*.



- Holovatch, M.I. (2002). Effect of the level of inbreeding on reproduction and performance measurements of Hutsul horse breeds and their crosses. Scientific and Technical. Bull. Biochemistry. Institute of animal husbandry. 82, 48-51.
- Spiridonov, V., Shelov, A.V., Kuhtina, K.V., Melnychuk, S.D., & Grygoryuk, I.P. (2010). Genetic identification and examination of the origin of domestic horses (*Equus caballus*) microsatellite fragments of deoxyribonucleic acid. Guidelines. - Kyiv: Ukraine NUBIP Publishing House.
- Binns, M.M., Boehler, D.A., Bailey, E., Lear, T.L., Cardwell, J.M., Lambert, D.H. (2011). Inbreeding in the Thoroughbred horse. *Animal genetics*. 43, 340–342.
- Bowling, A.T. (1996). *Horse Genetics*. CABI: Oxford.
- Frankham, R., Ballou, I.D., Briscoe, D.A. (2003). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Klemetsdal, G., Johnson, M. (1989). Effect of Inbreeding on Fertility in Norwegian Trotter Livestock. *Production Science*. 21, 263–272.
- Sairanen, J., Nivola, K., Katila, T., Virtala, A.-M., Ojala, M. (2009). Effects of inbreeding and other genetic components on equine fertility. *Animal*. 3(12), 1662–1672.
- Silva, A.C.M., Paiva, S.R., Albuquerque, M.S.M., Egito, A.A., Santos, S.A., Lima, F.C., Castro, S.T., Mariante, A.S., Correa, P.S., McManus, C.M. (2012). Genetic

variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*. 11(2), 881–890.

Wright, S. (1983). Inbreeding and Homozygosis. *Proceedings of the USA National Academy of Sciences*. 19, 411–420.

Поступила в редакцію 17.06.2013

Как цитировать:

О.В. Мельник, В.В. Дзіцюк, В.Г. Спиридонов, А.В. Шельов, С.Д. Мельничук (2013). Зв'язок інбридингу коней чистокровної верхової породи зі ступенем гомозиготності мікросателітних локусів ДНК. *Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого*, 2 (8), 149-159. **crossref**
[http://dx.doi.org/10.7905/bbmsspu.v0i3\(6\).543](http://dx.doi.org/10.7905/bbmsspu.v0i3(6).543)

© Мельник, Дзіцюк, Спиридонов, Шельов, Мельничук, 2013

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).