

ЗВ'ЯЗОК ІНБРИДИНГУ КОНЕЙ ЧИСТОКРОВНОЇ ВЕРХОВОЇ ПОРОДИ ЗІ СТУПЕНЕМ ГОМОЗИГОТНОСТІ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ДНК

В.В. Дзіцюк, доктор сільськогосподарських наук

О.В. Мельник, аспірант*

В.Г. Спиридонов, доктор сільськогосподарських наук

С.Д. Мельничук, член-кореспондент НААН України

Національний університет біоресурсів і природокористування України

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.

Вступ. Питання інбридингу у тваринництві залишається досить актуальним, проте доцільність його використання постійно викликає суперечки 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 [12]. 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 паруваль і генетичної природи ознак. Найбільш негативна дія інбридингу виявляється за ознаками з низьким і середнім рівнем успадкування [13].

Підтримка генетичного різноманіття є необхідною умовою для творчої селекційної роботи [17]. Низький рівень інбридингу разом зі збереженням високого рівня генетичної мінливості є однією зі складових програми збереження генетичного різноманіття у популяціях [3, 11]. Так, результати досліджень [6] свідчать, що втрата генетичної різноманітності в п'яти природних породах коней Бразилії є результатом близькоспорідненого розмноження в малих популяціях і використання екзотичних порід.

Встановлено, що інтенсивне використання інбридингу негативно впливає на відтворну здатність коней, оскільки кожен відсоток зростання рівня інбридингу в кобил збільшує кількість ранніх абортів на 1,27% [4, 5]. Дослідження, проведені Головач М. Й. показали, що навіть за незначного підвищення рівня інбридингу спостерігається значне зниження жеребності та плодючості. Наприклад, за рівня інбридингу 0,1—2,0 жеребність та плодючість кобил знижувалися на 13,1 та 9,8%, відповідно. При цьому також спостерігалось і зростання яловості. Проте, що стосується основних промірів тіла, то у цьому випадку простежувалася тенденція до їх зростання [10].

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, за необхідності його обрахунку, зазвичай використовують формулу Райта [8].

На сьогодні основним методом контролю ступеня інбридингу сільськогосподарських тварин є дані племінних записів. Проте останні не завжди можуть бути достовірними, що, в свою чергу, ускладнює селекційну роботу і може призводити до непередбачуваних наслідків. Оскільки рівень інбридингу характеризує ступінь гомозиготності тварини, то найбільш

* Науковий керівник — доктор сільськогосподарських наук В.В. Дзіцюк.

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 же порід коней генетичний аналіз за мікросателітами є обов'язковим [15].

Для чистокровної верхової породи, яку протягом багатьох десятиліть розводять "в собі" контроль ступеня інбридингу є необхідним. Дані [2] на основі аналізу білкового поліморфізму засвідчили, що чистокровна верхова порода була найбільш інбредною серед досліджуваних. Дослідження цієї ж породи за SNP-маркерами, проведені Vinns та ін. [1], підтвердили зростання ступеня 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. До того ж, проведення генетичного аналізу за мікросателітними маркерами дозволяє провести генетичну експертизу походження і таким чином переконатися у достовірності даних родоводів тварини. Подібні дослідження впливу інбридингу на ступінь гомозиготності локусів мікросателітної ДНК коней в Росії були проведені Гаврилічовою та Храбровою [9, 16]. 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 на базі науково-дослідного відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України у 2012—2013 роках. Периферійну кров відбирали у стерильні вакуумні пробірки з консервантом EDTA. Геному 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, АSB17, АSB23, СА425, HMS03, HMS06, HMS07, НТG04, НТG06, НТG07, VHL20. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за стандартних умов на ампліфікаторі Veriti 96-Well (Applied Biosystems, США) за наступних параметрів: 1 етап — початкова денатурація (95°C — 10 хв.), 2 етап — 30 циклів (95°C — 30 с, 60°C — 30 с, 72°C — 1 хв.). Заключний 3 етап тривав 72°C 60 хв. [14]. Продукти ампліфікації 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 [7]:

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

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 коефіцієнта 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 досліджень. Середній рівень інбридингу в популяції становив 1,29%. Серед досліджуваного поголів'я найбільший відсоток (41,03%) склали 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 (таблиця).

Таблиця. Розподіл коней чистокровної верхової породи за рівнем інбридингу та ступенем гомозиготності (результати досліджень за 2012 – 2013 рр.)

| 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 25% | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 (7,69%) |
| 4/12 33,33% | 2 | 2 | 1 | 1 | 6 (15,38%) |
| 5/12 41,67% | 3 | 4 | 3 | 0 | 10 (25,64%) |
| 6/12 50% | 3 | 2 | 1 | 1 | 7 (17,96%) |
| 7/12 58,33% | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 (5,13%) |
| 8/12 66,7% | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 (5,13%) |
| 9/12 75% | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 (2,56%) |
| Всього, гол. | 12 | 16 | 7 | 4 | 39 |
| У % | 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%) [16].

Переважає більшість коней (25,64%) мала ступінь гомозиготності на рівні 41,67%. Максимального значення (75%) гомозиготності 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 інбридингу 4,1 і більше ступінь гомозиготності дещо знижувався до 41,68% (рис. 1).

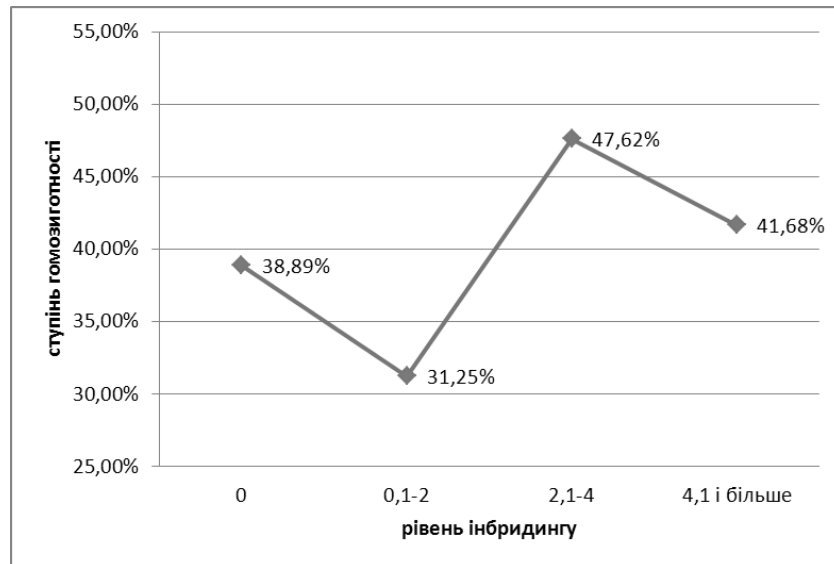


Рис. 1. Рівень гомозиготності коней з різним ступенем інбридингу

У цілому, при аналізі зміни ступеню гомозиготності при зростанні коефіцієнту інбридингу спостерігалася невелика позитивна динаміка щодо збільшення рівня гомозиготності.

Результати досліджень із впливу рівня інбридингу на ступінь гомозиготності стандартбредних рисаків, проведені Гаврилічовою та ін. [9], також не виявили лінійної залежності між цими показниками.

За детальнішого аналізу кожної окремо взятої особини було отримано досить цікаві результати. На рис. 2 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%. Однак 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 ступеня 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 Л.А. та іншими. Тобто, коефіцієнт інбридингу, розрахований за формулою Райта, вказує лише на ймовірність переходу частини генів до гомозиготного стану. Тому для визначення фактичного рівня гомозиготності тварин доцільно використовувати мікросателітні локуси ДНК, які мають кододомінантний характер успадкування та високий ступінь поліморфізму.

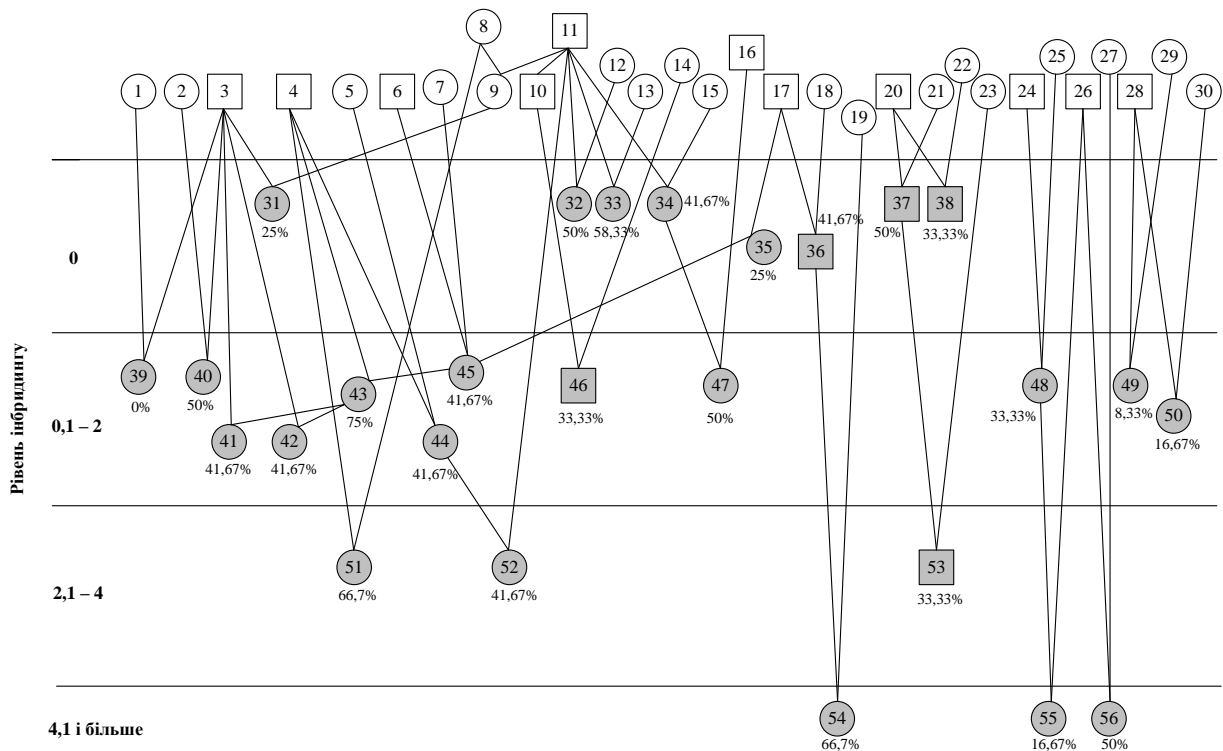


Рис. 2. Схема родоводів коней з різним ступенем інбридингу

● - тварини, прогенотиповані за 12 мікросателітними локусами;
(відсотками позначено ступінь гомозиготності мікросателітних локусів)

Висновок

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.

Література

1. Binns M.M., Boehler D.A., Bailey E., Lear T.L., Cardwell J.M., Lambert D.N. Inbreeding in the Thoroughbred horse // *Animal genetics*. — 2011. — 43. — P. 340—342.
2. Bowling A.T. *Horse Genetics*. CABI, Oxford. — 1996 — 517 p.
3. Frankham R., Ballou I.D., Briscoe D.A. *Introduction to conservation genetics*. — Cambridge: Cambridge University Press. — 2003. — 607 p.
4. Klemetsdal G., Johnson M. Effect of Inbreeding on Fertility in Norwegian Trotter Livestock // *Production Science*. — 1989. — 21. — P. 263—272.
5. Sairanen J., Nivola K., Katila T., Virtala A.-M., Ojala M. Effects of inbreeding and other genetic components on equine fertility // *Animal*. — 2009. — 3, № 12. — P. 1662—1672.
6. 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. — 11, №2. — P. 881—890.
7. Wright S. Inbreeding and Homozygosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. — 1933. — №19. — P. 411—420.
8. Антипов Г.П. О научной обоснованности нового метода определения степени инбридинга // *Зоотехния*. — 2003. — №2. — С. 2—5.

9. Гавриличева И.С., Храброва Л.А. Влияние степени инбридинга на уровень гомозиготности лошадей американской стандартбредной породы // Тез. докл. конф. "Искусственное осеменение лошадей — истоки биотехнологии в животноводстве". — Дивово: ВНИИ коневодства, 2004. — С.145—148.

10. 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.

11. Кузнецов В.М. Инбридинг в животноводстве: методы оценки и прогноза. — Киров, 2000. — 66 с.

12. Кушнер Х.Ф. Наследственность сельскохозяйственных животных. — М.: Колос, 1964. — 487 с.

13. Россоха В.И. Влияние различных степеней инбридинга на формирование генотипа свиней и их хозяйственно-биологических качеств: Дис... канд. с.-х. наук: 02.06.01. — Харьков. — 1984. — 166 с.

14. Генетична ідентифікація та експертиза походження свійських коней (*Equus caballus*) мікросателітними фрагментами дезоксирибонуклеїнової кислоти: Методичні рекомендації / Спиридонов В.Г., Шельов А.В., Кухтіна К.В. та ін. — К.: Вид. центр НУБіП України, 2010. — 20 с.

15. Храброва Л.А. Влияние инбридинга на степень гомозиготности чистокровных верховых лошадей по локусам микросателлитов ДНК // Коневодство и конный спорт. — 2010. — №5. — С. 7—8.

16. Храброва Л.А. Использование генетических исследований в коневодстве // Коневодство и конный спорт. — 2010. — №2. — С. 11—13.

17. Храброва Л.А. Методические рекомендации по ведению генетического мониторинга местных пород лошадей. — Дивово: ВНИИ коневодства, 2005. — 50 с.

АННОТАЦИЯ

Дзицюк В.В., Мельник О.В., Спиридонов В.Г., Мельничук С.Д. Связь инбридинга лошадей чистокровной верховой породы со степенью гомозиготности микросателлитных локусов ДНК // Биоресурсы и природопользование. — 2013. — 5, № 5—6. — С. 85—91.

На основании данных микросателлитного анализа установлен уровень гомозиготности 39 голов лошадей чистокровной верховой породы. При помощи родословных определена степень инбридинга. Показано, что для определения фактического уровня инбридинга стоит использовать генетический анализ микросателлитных локусов ДНК.

SUMMARY

V. Dzitsiuk, O. Melnyk, V. Spyrydonov, S. Melnychuk. Relation of inbreeding of thoroughbred horses with degree of homozygosity of microsatellite loci of DNA // *Biological Resources and Nature Management*. — 2013. — 5, № 5—6. — P. 85—91.

The degree of homozygosity of 39 thoroughbred horses based on the microsatellite analysis data has been found. Using the information about their pedigree the degree of inbreeding has been determined. The genetic analysis of microsatellite loci of DNA to determine the actual level of inbreeding should be applied.