

Л.Н. ШИНКАРЕНКО^{1,2}, О.Г. ГУЛЯКОВА¹,
В.А. МАЛИЕНКО^{1,2}, С.Д. МЕЛЬНИЧУК^{1,2},
В.Г. СПИРИДОНОВ^{1,2}

¹ Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины, Киев

² Украинская лаборатория качества и безопасности продукции
АПК, Киев

E-mail: IBK_line@mail.ru

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ У СОБАК С ВЫСОКИМ УРОВНЕМ ИНБРИДИНГА (ПОРОДА АМЕРИКАНСКИЙ ПИТ-БУЛЬ ТЕРЬЕР) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ



Исследован уровень полиморфизма по десяти микросателлитным локусам у 27 собак породы американский пит-буль терьер, с высокой долей кровности и коэффициентом инбридинга, достигающим 43,8 %. Установлено, что гетерозиготность изученной выборки собак превышает ожидаемую при таких коэффициентах инбридинга. Предполагается, что высокий уровень гетерозиготности животных может быть следствием отбора против гомозиготных генотипов.

© Л.Н. ШИНКАРЕНКО, О.Г. ГУЛЯКОВА, В.А. МАЛИЕНКО,
С.Д. МЕЛЬНИЧУК, В.Г. СПИРИДОНОВ, 2010

Введение. С начала развития генетики проблема инбридинга занимает особое место в связи с теоретическим значением и широким практическим использованием. Инбридинг у животных — это спаривание особей, связанных друг с другом определенным родством [1]. Инбридинг широко используется в селекции, позволяя закрепить у потомков признаки и свойства лучших представителей пород. М.Ф. Иванов (см. [2]) связывал достигнутые им успехи при выведении новых пород животных с применением инбридинга на лучших особях и последующей жесткой выбраковкой. Богданов [3] утверждал, что именно инбридинг позволяет создавать и поддерживать в гомозиготном состоянии большое количество необходимых для высокой производительности наследственных задатков.

Основным отрицательным последствием инбридинга считается инбредная депрессия, когда с повышением гомозиготности происходит концентрация нежелательных аллелей, что нередко приводит к снижению способности к воспроизводству, увеличению подверженности заболеваниям и смертности [4]. Однако экспериментальные данные о влиянии инбридинга весьма противоречивы. По мнению Robertson [5], уровень инбридинга до 20 % оказывает минимальный эффект на молочный крупный рогатый скот, тогда как у мясного поголовья наблюдалось снижение фертильности. У свиней инбредная депрессия отмечается при более низких уровнях инбридинга. В кинологии известно много примеров, когда инбридинг не приводил к нежелательным последствиям. Например, в случае с дисплазией суставов инбридинг с предками, свободными от нее и дающими здоровых потомков, может привести к смягчению или исчезновению симптомов заболевания благодаря повышению концентрации генов, отвечающих за правильное формирование тазобедренных суставов [4].

Развивая свое поголовье бордер-колли, Kelly [6] выяснил, что при инбридинге, не превышающем 20 %, не наблюдается никаких отрицательных эффектов. В ходе проведения программы разведения собак-поводырей в питомнике Сан-Рафаэль (Калифорния, США), Pfaffenberger [7] отметил улучшение работоспособности собак с возрастанием уровня инбридинга.

Данные выставочных собак породы боксер — чемпионов Англии с 1939 по 1975 гг., из книги Английского боксер-клуба — ВВС [8], иллюстрируют применение инбридинга для получения собак-победителей. Из них 25 % имеют как минимум одного родителя с относительно высоким коэффициентом инбридинга, подчеркивая их препотентность (способность производителя передавать свои качества потомству, давать щенков «в себя»), на которую и ориентировались заводчики [9].

Достижения последних лет в области молекулярной генетики создали предпосылки для использования молекулярных маркеров в селекции животных [10]. Не явились в этом отношении исключением и различные породы собак. Имеющиеся на сегодняшний момент литературные данные свидетельствуют о широком применении ДНК-маркеров (в частности микросателлитов) для генотипирования животных, а также изучения уровня генетической изменчивости различных пород собак [11–16].

В связи с неоднозначностью оценок влияния тесного инбридинга на гетерозиготность значительный интерес представляет изучение уровня генетической изменчивости среди инбредных особей. Объектом таких исследований может быть питомник собак породы американский пит-буль терьер. Начало формирования породы положено в Англии, Ирландии и других европейских странах. В XVIII столетии дальнейшее свое развитие порода получила в США, где и была впервые зарегистрирована в United Kennels Club (1898 г.) и American Dog Breeders Association (1909 г.) [17]. Племенная запись предков собак питомника составляет более 130 лет. На протяжении всей истории породы селекция животных основывалась на инбридинге.

Целью настоящего исследования было оценить уровень генетической изменчивости породы американский пит-буль терьер с помощью высокополиморфных микросателлитных ДНК-маркеров.

Материалы и методы. Исследование собак породы американский пит-буль терьер линии Iron Black King проведено в питомнике Iron King Kennels-II (владельцы: О.Г. Гулякова, Л.Н. Шинкаренко, г. Киев, Украина). Линия Iron Black King, созданная питомником, была

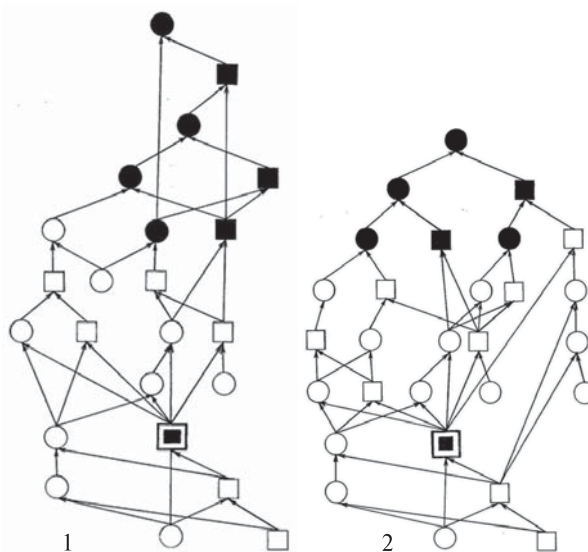


Рис. 1. Схема родословной животного № 17, табл. 1. \blacksquare — родоначальник линии Блек Кинг; σ^{\bullet} \blacksquare , ϕ^{\bullet} \bullet — ДНК-типированные собаки

Рис. 2. Схема родословной животных № 23, 24, 25, табл. 1. Обозначения см. на рис. 1

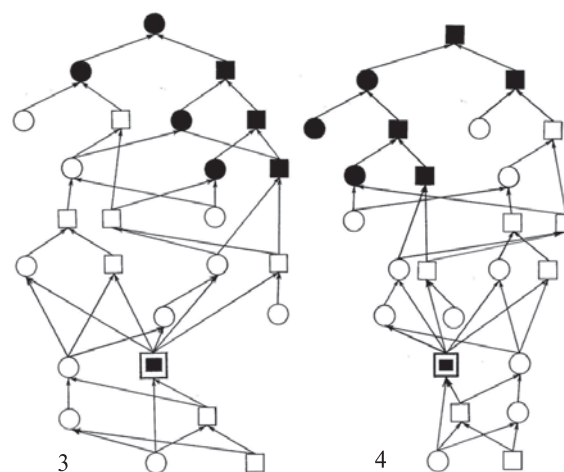


Рис. 3. Схема родословной животных № 4, 11, 21, табл. 1. Обозначения см. на рис. 1

Рис. 4. Схема родословной животного № 27, табл. 1. Обозначения см. на рис. 1

получена за 15 лет селекционной работы (1992–2007 гг.), имеет 8 поколений от общего предка Stevan's Black King (владелец Гуляков О.Г. (1963–1997), питомник Iron King Kennels, г. Москва, Россия). В селекционной работе широко использовалось близкородственное спаривание (рис. 1–4). В питомнике не обнаружили

животных с наследственными дефектами, а также ни в одном из пометов не было случаев гибели новорожденных или гибели щенков в натальном периоде. Исследовали 27 особей — пять поколений, 11 семей (из которых две семьи — дубль-пометы).

ДНК выделяли из соскобов эпителия ротовой полости с использованием набора «ДНК-сорб» («Амплисенс», Россия) по методике производителя. Амплификацию десяти микросателлитных локусов (PEZ1, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8, PEZ12, PEZ20, FHC2010, FHC2054, FHC2079), рекомендованных для генотипиро-

вания American Kennel Club, осуществляли с использованием набора реактивов StockMarks for Dog Genotyping Kit Canine («Applied Biosystems», Великобритания, PN 4307481). Для ПЦР пользовались амплификатором Applied Biosystems 2720. Состав ПЦР смеси и условия амплификации — рекомендованные производителем. Анализ продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3130. Размеры амплифицированных фрагментов определяли с помощью внутреннего стандарта GeneScan-350-ROX. Анализ результатов

Таблица 1

Доля кровности с родоначальником Блек Кингом и коэффициент инбридинга среди собак породы американский пит-буль терьер в племенном питомнике Iron King Kennels-II

№ животного	Количество встречаемости родоначальника в родословной (поколение)	Доля кровности с родоначальником	Коэффициент инбридинга
		%	
1	3 (0—III, III, IV)	31,3	0**
2	8 (IV, V, V, V, V—III, III, IV)	37,5	20,1
3	11 (IV, IV, V, V, V—IV, IV, V, V, VI)	45,3	30,6
4	16 (V, V, VI, VI, VI—V, V, V, V, VI, VI, VI, VI, VI, VI, VII)	33,6	15,2
5	5 (IV, IV—III, IV, IV)	37,5	20,1
6	3 (II, III—II)	62,5	27,5
7	5 (0—IV, IV, V, V, V)	21,9	0**
8	9 (IV, IV, V, VI, VI, VI—III, III, IV)	46,9	21,9
9	9 (0—IV, IV, V, V, VI, VII, VII, VII)	23,4	0**
10	0	0*	0*
11	16 (V, V, VI, VI, VI—V, V, V, V, VI, VI, VI, VI, VI, VI, VII)	33,6	15,2
12	14 (V, V, V, V, VI, VI, VI, VI, VI, VI, VII—III, III, IV)	53,9	40,6
13	14 (V, V, V, V, VI, VI, VI, VI, VI, VI, VII—III, III, IV)	53,9	40,6
14	14 (V, V, V, V, VI, VI, VI, VI, VI, VI, VII—III, III, IV)	53,9	40,6
15	14 (V, V, V, V, VI, VI, VI, VI, VI, VI, VII—III, III, IV)	53,9	40,6
16	14 (V, V, V, V, VI, VI, VI, VI, VI, VI, VII—III, III, IV)	53,9	40,6
17	17 (IV, IV, V—IV, IV, V, VI, VI, VI, VI, VII, VII, VII, VII, VII, VIII)	42,6	25,4
18	11 (IV, IV, V, V, V—IV, IV, V, V, VI)	45,3	30,6
19	5 (IV, IV—III, III, IV)	43,8	17,8
20	6 (III, III, IV—III, III, IV)	62,5	43,8
21	16 (V, V, VI, VI, VI—V, V, V, V, VI, VI, VI, VI, VI, VI, VII)	33,6	15,2
22	7 (IV, IV, IV, IV, V, V—II)	56,3	33,2
23	15 (IV, IV, V, V, VI, VI, VI, VI—III, V, V, V, V, VI, VI)	46,9	26,6
24	15 (IV, IV, V, V, VI, VI, VI, VI—III, V, V, V, V, VI, VI)	46,9	26,6
25	15 (IV, IV, V, V, VI, VI, VI, VI—III, V, V, V, V, VI, VI)	46,9	26,6
26	5 (0—IV, IV, V, V, V)	21,9	0**
27	14 (V, V, VI, VI, VI, VI, VII, VIII, VIII, VIII—V, V, VI, VI, VI)	22,7	7,1
Среднее значение по исследованным животным		42,8	26,4

* Особь кровной линии Блек Кинга. ** Вычисление коэффициента инбридинга невозможно, поскольку Блек Кинг встречается только у одного из предков.

Таблица 2

Частота аллелей у собак породы американский пит-буль терьер в племенном питомнике Iron King Kennels-II

Аллель	PEZ1	FHC2054	FHC2010	PEZ5	PEZ20	PEZ12	PEZ3	PEZ6	PEZ8	FHC2079
A					0,056					
B				0,148	0,296					
C				0,500	0,648			0,111		0,019
D		0,073		0,352		0,185		0,111	0,204	0,185
E		0,167				0,407		0,574	0,704	0,796
F	0,111		0,500			0,111		0,204	0,092	
G	0,852	0,204	0,056			0,093	0,074			
H	0,037		0,444							
I		0,278					0,167			
J		0,278				0,074	0,315			
K							0,370			
L							0,074			
M										
N						0,111				
O										
P						0,019				

осуществляли с использованием программы GeneMapper v 3.7 [18].

Расчет доли кровности на общего предка и коэффициент инбридинга произведен по десяти поколениям на каждую исследуемую особь с использованием программы PEDIGREE Software Program [19]. Коэффициент инбридинга рассчитывали по формуле Райта

$$F_x = \frac{1}{2} \sum [0,5^n \cdot (1 + f_a)],$$

где F_x – коэффициент инбридинга пробанда; \sum – сумма всех путей инбридинга; n – число путей от общего предка через животное X к общему предку с материнской стороны, исключая самого общего предка и пути от него; f_a – коэффициент инбридинга предка, на которого заинбридирован X .

Популяционно-генетические показатели, такие как частоты аллелей и генотипов, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, рассчитывали с помощью программы POPGENE VERSION 1.31 [20]. Индекс фиксации Райта (F_{IS}), который является мерой различий между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью – по формуле

$$F_{IS} = (H_E - H_O) / H_E,$$

где H_E – ожидаемая, H_O – наблюдаемая гетерозиготность [21].

Результаты исследований и их обсуждение.

Анализ родословных показал, что Блек Кинг как основатель линии встречается в родословных исследованных собак от 3 до 17 раз со II по VIII поколение (табл. 1). Это обеспечило высокую долю кровности с родоначальником, которая колебалась от 21,9 до 62,5 %. Только у одного из животных Блек Кинг не встречался совсем, а у четырех – только один из родителей инбреден на Блек Кинга. Коэффициент инбридинга, характеризующий вероятность встречи у потомка одинакового аллеля, полученного обоими родителями от общего предка и определяющего уровень гомозиготности животного, оказался высоким.

Среднее значение составило 26,4 %, что классифицируется как очень тесный инбридинг [2]. У шести из исследованных особей (22,2 %) коэффициент инбридинга превышает 40 %, что соответствует теснейшему инбридингу (inbred line), характерному для спаривания братьев с сестрами или родителей с детьми в ряде поколений.

Такой уровень инбридинга является высоким даже для собак, в разведении которых метод близкородственного скрещивания использовался довольно широко. Так, по данным Cole [22], у исследованных особей в популяции собак-поводырей немецкой овчарки и лабрадор

Таблица 3

Частоты генотипов в исследованной группе

Локусы	Частоты генотипов, %	χ^2	Вероятность
PEZ1	FG – 0,222; GG – 0,704; GH – 0,074	0,703	0,872
FHC2054	DE – 0,037; DG – 0,111; EI – 0,186; EJ – 0,111; GI – 0,185; GJ – 0,111; II – 0,074; IJ – 0,037; JJ – 0,148	19,90	0,030
FHC2010	FF – 0,185; FG – 0,074; FH – 0,556; GH – 0,037; HH – 0,148	1,60	0,659
PEZ5	BC – 0,074; BD – 0,222; CC – 0,222; CD – 0,482	9,43	0,024
PEZ20	AC – 0,111; BB – 0,037; BC – 0,519; CC – 0,333	7,47	0,280
PEZ12	DE – 0,297; DN – 0,074; EE – 0,111; EF – 0,074; EG – 0,111; EJ – 0,037; EN – 0,074; FG – 0,074; FJ – 0,037; FN – 0,037; JN – 0,037; JP – 0,037	28,40	0,130
PEZ3	GJ – 0,111; GL – 0,037; IK – 0,260; KK – 0,037; KL – 0,037; IJ – 0,074; JK – 0,370; JL – 0,074	18,80	0,043
PEZ6	CE – 0,222; DE – 0,222; EE – 0,222; EF – 0,260; FF – 0,074	9,09	0,169
PEZ8	DD – 0,074; DE – 0,260; EE – 0,481; EF – 0,185	2,78	0,426
FHC2079	CE – 0,037; DD – 0,037; DE – 0,296; EE – 0,630	0,26	0,967

Таблица 4
Ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность в исследованной группе (27 животных) и индекс фиксации Райта

Локус	Наблюдаемая гетерозиготность, H_O	Ожидаемая гетерозиготность, H_E	Индекс фиксации Райта, F_{IS}
PEZ1	0,296	0,261	-0,134
FHC2054	0,778	0,771	-0,009
FHC2010	0,667	0,549	-0,215
PEZ5	0,778	0,604	-0,288
PEZ20	0,630	0,489	-0,288
PEZ12	0,889	0,760	-0,169
PEZ3	0,963	0,725	-0,328
PEZ6	0,704	0,604	-0,166
PEZ8	0,444	0,455	0,024
FHC2079	0,333	0,331	-0,006
Среднее	0,648	0,555	-0,168

ретривера средний уровень инбридинга составил 26,2 и 22,0 % соответственно.

Для изучения уровня генетического полиморфизма в исследованной группе животных было проведено генотипирование по десяти микросателлитным локусам. Микросателлиты – участки ДНК, состоящие из повторяющихся фрагментов (коротких нуклеотидных повторов), длиной до 6 пар оснований. В основе полиморфизма микросателлитов лежит количество повторов фрагментов в участке. Полиморфизм

микросателлитных локусов широко используется для выявления генетического сходства и различий особей, а также в популяционном анализе [10–16].

Частоты аллелей и генотипов в исследованной группе животных представлены в табл. 2 и 3.

В ходе проведенных исследований было выявлено от 3 до 7 аллелей на локус. Среднее количество аллелей на локус составило 4 ($\sigma = 1,33$), а среднее эффективное количество аллелей – 2,63 ($\sigma = 1,07$).

Из проанализированных десяти полиморфных локусов только один – FHC2079 – оказался в состоянии равновесия согласно закону Харди-Вайнберга, о чем свидетельствуют данные табл. 3.

Наиболее выраженными отклонения оказались у локусов с большим количеством обнаруженных аллелей. Это можно объяснить тем, что из-за небольшого количества исследованных животных некоторые генотипы отсутствуют.

Существует общепринятое мнение, что нарушение случайного скрещивания должно вызывать отклонения в частотах генотипов от ожидаемого равновесия Харди-Вайнберга и в результате инбридинга частоты генотипов должны изменяться в сторону преобладания гомозигот. Однако в исследованной группе инбредных животных, наоборот, был обнаружен высокий

уровень гетерозиготности. Установлено, что во всех локусах, за исключением локуса PEZ8, наблюдаемая гетерозиготность превышает ожидаемую. Об этом также свидетельствует отрицательное значение индекса фиксации Райта — F_{IS} (табл. 4).

Избыток гетерозиготных генотипов в группах исследованных животных ранее был отмечен и у других пород собак, например, у лабрадор ретривера ($F_{IS} = -0,023$) [15], различных групп пуделей ($F_{IS} =$ от $-0,001$ до $-0,013$) [16], а также леонбергера ($F_{IS} = -0,041$), ньюфаундленда ($F_{IS} = -0,051$), спаниеля ($F_{IS} = -0,053$), добермана ($F_{IS} = -0,054$), бультерьера ($F_{IS} = -0,101$) и ряда других пород [12].

Таким образом, исследованная нами группа инбредных животных характеризуется высоким уровнем генетического полиморфизма и высоким уровнем гетерозиготности, что оказалось несколько неожиданным для таких значений доли кровности и коэффициента инбридинга. У семи из десяти проанализированных локусов (PEZ1, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ12, FHC2010, PEZ20) наблюдаемая гетерозиготность более чем на 10 % превышала ожидаемую.

Возможными причинами этого могут быть либо эффект выборки (небольшое количество проанализированных особей), либо существование отбора на стадии образования зигот, т.е., возможно, имеется какой-то механизм, препятствующий слиянию гамет с образованием гомозиготных генотипов. Впрочем не исключено, что несколько иная картина может наблюдаться при анализе других микросателлитных локусов или генетических маркеров, например изоферментов.

Авторы считают целесообразным продолжить дальнейшее изучение исследуемого объекта с использованием различного рода генетических маркеров для изучения влияния инбридинга на генетическую структуру породы.

Авторы статьи выражают благодарность за критические замечания рецензенту О.И. Смирновой (ст. преподаватель кафедры разведения и генетики им. Н.А. Кравченко, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины).

L.N. Shinkarenko, O.G. Guliakova,

V.A. Malienko, S.D. Melnychuk, V.G. Spyrydonov

ANALYSIS OF GENE VARIABILITY IN THE DOGS (AMERICAN PIT BULL TERRIER BREED) WITH HIGH INBREEDING LEVEL USING MICROSATELLITE MARKERS

The level of gene polymorphism of 10 microsatellite loci in 27 American Pit Bull Terrier dogs which have a high value of the percentage of blood and inbreeding coefficient achieved 43.8 % was studied. The excess of heterozygosity over expected for this level of inbreeding coefficient was established. Suggestion that the high level of heterozygosity is the result of the selection against homozygotes was made.

Л.М. Шинкаренко, О.Г. Гулякова,

В.А. Малієнко, С.Д. Мельничук, В.Г. Спиридонов

АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ У СОБАК З ВИСОКИМ РІВНЕМ ІНБРИДИНГУ (ПОРОДА АМЕРИКАНСЬКИЙ ПІТ-БУЛЬ ТЕР'ЄР) З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ

Досліджено рівень поліморфізму за десятьма микросателітними локусами у 27 собак породи американський піт-буль тер'єр з високою часткою кровності та коефіцієнтом інбридингу, який досягає 43,8 %. Встановлено, що гетерозиготність вивченої вибірки собак перевищує очікувану за таких значень коефіцієнта інбридингу. Припускається, що високий рівень гетерозиготності тварин може бути наслідком добору проти гомозиготних генотипів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гершензон С.М. Основы современной генетики. — К.: Наук. думка, 1979. — 506 с.
2. Кравченко Н.А. Разведение сельскохозяйственных животных — М.: Колос, 1973. — 486 с.
3. Богданов Е.А. Как можно ускорить совершенствование и создание племенных стад и пород — М.: Сельхозгиз, 1928.
4. Малькольм Б.У. Генетика собак. — М.: Полиграф, 2000. — 604 с.
5. Robertson A. Inbreeding and performance in British Friesian cattle // Proc. Brit. Soc. Anim. Prod. — 1954. — 87.
6. Kelly D.F. Functional disorders of the adrenal gland in dogs // Vet. Ann. — 1973.
7. Pfaffenberger C.J. The new knowledge of dog behavior. — New York : Howell Book House, 1963.
8. BBC. The British Boxer Club Record Book 1939–1975 // British Boxer Club. — London, 1976.
9. Willis M.B. The German Shepherd Dog: its history, development and genetics // K & R Books. — Leicester, 1976.

10. Храброва Л. Новые горизонты селекции // Конный мир. — 2003. — № 1.
11. Irion D.N., Schaffer A.L., Grant S., Wilton A.N., Pedersen N.C. Genetic variation analysis of the Bali street dog using microsatellites // BMC Genetics 2005. 6:6.
12. Leroy G. Diversité génétique et gestion génétique des races canines: Thèse Pour obtenir le grade de Docteur D'AgroParisTech Discipline (Génétique animale), 2008.
13. Koskinen M.T., Bredbacka P. Assessment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites // Anim. Genet. — 2000. — 31. — P. 310–317.
14. Zajc I., Sampson J. Utility of canine microsatellites in revealing the relationships of pure bred dogs // J. Hered. — 1999. — 90, № 1. — P. 104–107.
15. Altet L., Francino O., Sánchez A. Microsatellite polymorphism in closely related dogs // J. Hered. — 2001. — 92, № 3. — P. 276–279.
16. Bjornerfeldt S., Hailer F., Nord M., Vila C. Assortative mating and fragmentation within dog breeds // BMC Evol Biol. — 2008. — 8.
17. Stratton R. The book of American Pit Bull Terrier // Neptune City. T.F.H. Publ., Inc., 1981. — 352 p.
18. GeneMapper v 3.7 // Applied Biosystems. — P.N. 4346135 Rev. D. — 12/2007.
19. James E. Seltzer. Win Canis PEDIGREE Software Program // Version 4.12 — Feb 7, 2007.
20. Yeh F.C., Cai-Yang R., Boyl T. POPGENE VERSION 1.31 // Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis Quick User Guide. — August 1999.
21. Wright S. Variability within and among natural populations. — Chicago : Univ. press, 1978. — Vol. 4.
22. Cole J.B., Franke D.E., Leighton E.A. Population structure of a colony of dog guides // J. Anim. Sci. — 2004. — 82. — P. 2906–2912.

Поступила 01.12.08