

## ЦИТОГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ ГУЦУЛЬСЬКОЇ ПОРОДИ КОНЕЙ

**Л. Ф. СТАРОДУБ**

*Інститут розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН (Чубинське, Україна)*  
<https://orcid.org/0000-0002-9565-807X> – Л. Ф. Стародуб  
[starodublf@gmail.com](mailto:starodublf@gmail.com)

У статті представлені дослідження каріотипової мінливості коней гуцульської породи за допомогою цитогенетичних методів (рутинного фарбування хромосом та мікроядерного тесту). Середній показник геномних порушень (анеуплоїдії) становив 10,8%, при розмасті значень цієї мінливості 8,8%–11,1%, кратне збільшення числа хромосом (поліплоїдія) знаходилася у межах 1,1%–2,0% та розмах асинхронного розходження центромірних районів хромосом дорівнював 2,0%–6,0%. Структурні порушення хромосом, хромосомні розриви, становили 1,1%. Визначено частку лімфоцитів із мікроядром – 4,0–4,2%, двоядерних лімфоцитів – 6,2% та показник мітотичного індексу – 4,3%, що свідчить про стабільність каріотипу досліджуваних коней.

**Ключові слова:** гуцульські коні, анеуплоїдія, поліплоїдія, хромосомні розриви, мітотичний індекс, стабільність каріотипу

## CYTOGENETIC VARIABILITY OF THE HUTSUL BREED OF HORSES L. F. Starodub

*Institute of Animal Breeding and Genetic nd. a. M.V. Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)*

The article presents studies of karyotype variability of Hutsul horses using cytogenetic methods (routine chromosome staining and micronucleus test). The average rate of genomic disorders (aneuploidy) was 10.8%, with a range of values of this variability of 8.8%–11.1%, a multiple increase in the number of chromosomes, polyploidy, was within 1.1%–2.0%, and the range of asynchronous the divergence of centromeric regions of chromosomes was equal to 2.0%–6.0%. Structural abnormalities of chromosomes, chromosomal breaks, accounted for 1.1%. The proportion of lymphocytes with a micronucleus was determined – 4.0–4.2%, binucleated lymphocytes – 6.2% and the mitotic index – 4.3%, which indicates the stability of the karyotype of the studied horses.

**Keywords:** Hutsul horses, aneuploidy, polyploidy, chromosomal breaks, mitotic index, karyotype stability

**Вступ.** Для розв'язання однієї з глобальних проблем, які постали перед людством у ХХІ столітті – збереження біорізноманіття нашої планети, необхідні знання про структуру генофонду та оцінку генетичного різноманіття локальних порід домашніх тварин, як пріоритетних об'єктів охорони в агробіоценозах [1]. Гуцульські коні відносяться до найстаріших порід коней в Україні [2], які за назвою генофондового об'єкту належать до групи «Місцеві (гірські та поні)» І-шої категорії (генофондовий об'єкт, який вже зараз перебуває на межі зникнення) вітчизняної класифікації та ТР–транскордонної регіональної (класифікації FAO) генофондових об'єктів за загрозами для існування та підходами до зберігання [1, 3]. Дані ретроспективного аналізу архівних та літературних матеріалів свідчать про те, що формування та збереження породи гуцульських коней відбувалося на українських землях [4]. Одним із принципів визначення якісної своєрідності гуцульських коней є проведення генетичного моніторингу.

Спонтанна цитогенетична мінливість коней у порівнянні з іншими видами сільськогосподарських тварин вивчена набагато менше. У конярстві цитогенетичні дослідження, в основному, проводять у тварин, у яких спостерігається безпліддя або інші відхилення від норми. До цього часу недостатньо вивченим залишається породоспецифічний хромосомний поліморфізм коней. Тому, дослідження цитогенетичних особливостей спонтанного мутагенезу коней гуцульської породи є досить актуальним на сьогоднішній день. Метою нашої роботи було проведення цитогенетичного контролю коней гуцульської породи для визначення генетичної специфічності на хромосомному рівні.

**Матеріали і методи.** Цитогенетичний контроль здійснювали у коней гуцульської породи Національного природного парку «Гуцульщина» (20 гол.) м. Косів та господарства ТзОВ «Край неба» (20 гол.) Коломийського району с. Лісна Слобідка Івано-Франківської області. Більшість із досліджених тварин занесені до Державної книги племінних коней гуцульської породи (том II) [2].

Цитогенетичні препарати готували із лімфоцитів периферійної крові, яку брали із яремної вени тварини. Для культивування клітин крові в лабораторії заготовляли стерильні флакони; фасували середовище RPMI-1640 (Sigma, США) у стерильному боксі приблизно по 5 мл у один флакон з 15–20% – сироваткою крові великої рогатої худоби (бажано ембріональної). До культури додавали антибіотики з розрахунку 0,001 мл гентаміцину на 1 мл середовища, 0,5 мл цільної крові, а також мітоген – речовину, яка стимулює мітотичне ділення лімфоцитів у культурі. Дозування фітогемаглютиніну типу Р додавали у дозі 0,02 мл, типу М – 0,2 мл на 10 мл культуральної суміші. Суміш культивували в термостаті при температурі +37°C протягом 48–72 год., періодично струшуючи флакони. За дві години до фіксації в культуру вводили підігрітий до 37°C розчин колхіцину в кінцевій концентрації 0,3–0,5 мкг/мл культурального середовища. Для гіпотонізації використовували свіжоприготовлений 0,55%-вий розчин хлористого калію. Гіпотонізацію проводили протягом 20 хв. у термостаті при температурі +37°C. Після закінчення гіпотонізації культуру центрифугували, надосадкову рідину зливали, а до осаду обережно по стінці пробірки додавали охолоджену до +4°C фіксуєчу рідину, змішуючи одну частину льодяної оцтової кислоти з трьома частинами метилового (або етилового) спирту. Після цього осад ресуспендували і центрифугували, повторюючи цю операцію 2–3 рази. Суспензію клітин автоматичним дозатором із висоти 20–30 см наносили на чисті охолоджені предметні скельця. Висушували скло на повітрі. Отримані препарати, після їх фарбування готовим барвником Гімза, аналізували на предмет хромосомної мінливості під імерсійним збільшенням мікроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Німеччина) у 1000 разів і мікрофотографували [5] (рис. 1).

У процесі досліджень враховували: кількісні порушення хромосом – анеуплоїдію (А), поліплоїдію (ПП), клітини із асинхронністю розщеплення центромірних районів хромосом (АРЦРХ), структурні аберації – розриви хромосом (ХР). На цих самих препаратах підраховували кількість двоядерних лімфоцитів (ДЯ) та одноядерних лімфоцитів із мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ). Частоту ДЯ, МЯ, МІ вираховували в проміле (‰), кількість на 1000 клітин.

**Результати досліджень.** Результати цитогенетичного аналізу досліджуваних коней гуцульської породи показали, що для них характерні геномні та структурні порушення хромосом (табл. 1).

Геномні порушення хромосом, анеуплоїдія, були виражені в основному гіпоплоїдними клітинами ( $2n = 54-62$ ), середня величина яких становила 10,8%, розмах значень цієї мінливості 8,8%–11,1% у тварин господарства ТзОВ «Край неба» та Національного природного парку «Гуцульщина» відповідно. Проте, різниця середніх величин частоти анеуплоїдних метафаз у лімфоцитах крові коней двох господарств виявилася статистично недостовірною. За цією мінливістю, у досліджених тварин, спостерігався індивідуальний поліморфізм. Кореляційний зв'язок між віком та анеуплоїдією, у досліджуваних гуцульських коней, виявився слабким та недостовірним. Кількість поліплоїдних клітин у коней двох господарств знаходилася

у межі 1,1%–2,0%, середнє значення якого становило – 1,4% і не перевищувало видові показники цієї мінливості [4].

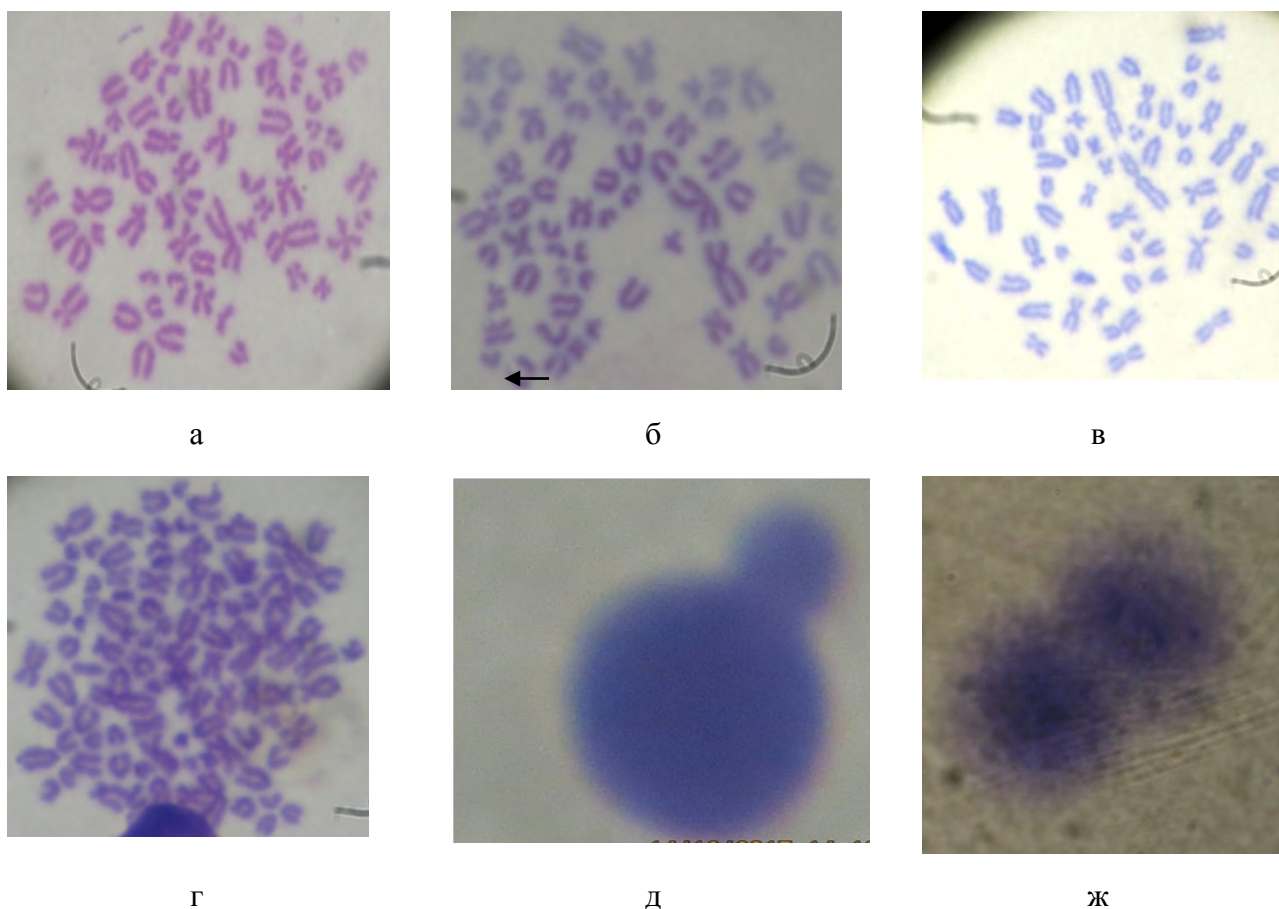


Рис. 1. Особливості каріотипу коней гуцульської породи

а) Норма каріотипу  $2n = 64$ ; б) Асинхронне розходження центромірних районів хромосом;  
в) Анеуплоїдія  $2n = 58$ ; г) Поліплоїдія  $3n = 96$  д) Лімфоцит із мікроядром; ж) Двоядерний лімфоцит;

**1. Результати аналізу каріотипової мінливості гуцульської породи коней Національного природного парку «Гуцульщина» та ТзОВ «Край неба» с. Лісна Слобідка Коломийського району, %**

Господарство	Анеуплоїдія	Поліплоїдія	АРЦРХ	Хромосомні розриви
Національний природний парк «Гуцульщина»	$11,1 \pm 2,63$	$1,1 \pm 1,04$	$6,0 \pm 2,15$	$1,1 \pm 1,04$
ТзОВ «Край неба»	$8,8 \pm 3,50$	$2,0 \pm 1,81$	$2,0 \pm 1,81$	–
$M \pm m$	$10,8 \pm 2,10$	$1,4 \pm 0,93$	$3,9 \pm 1,77$	$0,7 \pm 0,59$

Встановлено, що асинхронне розходження центромірних районів хромосом виникає у результаті передчасної реплікації прицентромірних гетерохроматинових ділянок, асоційованих з активністю центромери [6]. У гуцульських коней, яких досліджували, розмах цієї мінливості становив 2,0%–6,0%, при середньому значенні – 3,9%, що відповідає спонтанному рівню для коней в цілому (2,2%–9,1%) [7].

Структурні порушення хромосом (хромосомні розриви) у коней господарства ТзОВ «Край неба» не були виявлені, а у тварин Національного природного парку «Гуцульщина» відсоток метафазних пластинок із хромосомними розривами був невисокий і становив 1,1% (межа хромосомних розривів у коней за спонтанного мутагенезу становить 1,6%–4,7% [7, 8]. Це свідчить про стабільність каріотипу досліджуваних тварин.

Результати мікроядерного тесту (табл. 2) показали, що частка лімфоцитів із мікроядром для тварин двох господарств була, практично, однаковою. Розмах цієї мінливості становив 4,0–4,2%.

Для встановлення зв'язку між анеуплоїдією та лімфоцитами з мікроядром був проведений кореляційний аналіз. Встановлено пряму залежність між клітинами з анеуплоїдією та лімфоцитами з мікроядром ( $r = 0,9198$ ) з достовірною вірогідністю  $P > 0,95$ .

**2. Результати мікроядерного тесту гуцульської породи коней Національного природного парку «Гуцульщина» та ТзОВ «Край неба» с. Лісна Слобідка Коломийського району, ‰**

Господарство	Лімфоцит із мікроядром	Двоядерний лімфоцит	Мітотичний індекс
Національний природний парк «Гуцульщина»	4,2 ± 0,76	6,7 ± 1,01	4,7 ± 0,70
ТзОВ «Край неба»	4,0 ± 1,15	3,8 ± 0,79	2,8 ± 0,59
M ± m	4,1 ± 1,40	6,2 ± 0,94	4,3 ± 0,72

Кількість двоядерних лімфоцитів (6,2%) перевищувала показник мітотичного індексу (4,3%). Проте, різниця середніх величин між частотою двоядерних лімфоцитів та рівнем поділу клітин – мітотичним індексом, виявилася недостовірною. Дослідженнями на інших видах тварин встановлено, що зі збільшенням рівня забрудненості, зокрема радіонуклідами, підвищується розмах індивідуальної мінливості за МІ, частотою лімфоцитів із мікроядром і зменшується кількість двоядерних лімфоцитів [8]. Тому з отриманих даних можна зробити висновок, що досліджувані тварини знаходилися в екологічно чистих умовах відносно рівня радіонуклідного забруднення і характеризувалися стабільністю каріотипу та зниженою чутливістю до мутагенних чинників різної природи.

**Висновки.** За результатами цитогенетичного аналізу встановлено наявність геномних та структурних порушень хромосом у досліджуваних коней гуцульської породи.

Встановлено, що геномні порушення хромосом представлені анеуплоїдією, середня величина якої становила 10,8%, поліплоїдними клітинами з середньою частотою 1,4%, що не перевищують видові показники цієї мінливості.

Виявлено розмах асинхронного розходження центромірних районів хромосом (2,0%–6,0%) при середньому значенні – 3,9%, що відповідає спонтанному рівню для коней в цілому.

Виявлено відсутність хромосомних розривів у тварин господарства ТзОВ «Край неба» та 1,1% метафазних пластинок із хромосомними розривами у коней Національного природного парку «Гуцульщина», що свідчить про стабільність каріотипу досліджуваних тварин.

Визначено частку лімфоцитів із мікроядром для тварин двох господарств – 4,0–4,2%. Встановлено пряму залежність між клітинами з анеуплоїдією та лімфоцитами з мікроядром ( $r = 0,9198$ ) з достовірною вірогідністю  $P > 0,95$ .

Виявлено, що кількість двоядерних лімфоцитів (6,2%) перевищувала показник мітотичного індексу (4,3%) з недостовірною різницею середніх величин, що свідчить про стабільність каріотипу досліджуваних тварин.

## БІБЛІОГРАФІЯ

1. Boettcher P, Gandini G, Martin J. F., Joshi B. K., Oldenbroek K, Sponenberd P. 2011. FAO Guidelines for the Vivo Conservation of Animal Genetic Resources (Draft). Roma : FAO, 2011. 127 p.
2. Головач М. Й., Головач М. М. Державна книга племінних коней гуцульської породи. Ужгород : Карпати, 2013. Т. 2. 256 с.
3. Програма збереження генофонду локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин в Україні на 2017–2025 роки / М-во аграр. політики та прод-ва України, Нац. акад. аграр. наук, Ін-т розведення і генетики тварин ім. М.В.Зубця, Сум. Нац. аграр. ун-т ; кол. авт. : М. В. Гладій та ін. Суми, 2018. 84 с.

4. Стародуб Л., Стефурак Ю., Стефурак І., Зеленчук І., Зеленчук Я., Войціцький Р. Гуцульська порода коней – аборигенна порода українських Карпат. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького*. Серія : Сільськогосподарські науки. 2020. Т. 22, № 92. С. 119–124. DOI: 10.32718/nvlvet-a9220

5. Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві : наук. зб. /Укр. акад. аграр. наук, Ін-т розведення і генетики тварин ; за наук. ред. В. П. Бурката. Київ : Аграрна наука, 2005. 244 с.

6. Ковалева О. А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих. *Цитология и генетика*. 2008. № 1. С. 58–72.

7. Стародуб Л. Ф. Генетична мінливість аборигенних порід великої рогатої худоби та коней за різними типами маркерів : дис. ... д-ра с.-г. наук : 03.00.15. Чубинське Київської обл., 2021. 380 с.

8. Джус П., Стародуб Л., Куриленко Ю., Костенко С. Изменчивость цитогенетических показателей соматического мутагенеза разных пород лошадей. *Аграрни науки*. 2013. Vol. 5, iss. 14. С. 31–35.

## REFERENCES

1. Boettcher, P., G. Gandini, J. F. Martin, B. K. Joshi, K. Oldenbroek, and P. Sponenberd. 2011. *FAO Guidelines for the Vivo Conservation of Animal Genetic Resources (Draft)*. Roma, FAO; 127 (in English).

2. Holovach, M. Y., and M. M. Holovach. 2013. *Derzhavna knyha plemynnykh konei hutsul's'koj porody – State Book of Hutsul Breeding Horses*. Uzhhorod, Karpaty, 2:256 (in Ukrainian).

3. Hladii, M. V., Yu. P. Polupan, D. M. Basovskiy, L. V. Vyshnevskiy, S. I. Kovtun, and O. V. Sydorenko. 2018. *Prohrama zberezhennia henofondu lokalnykh i znykaiuchykh porid silskohospodars'kykh tvaryn v Ukraini na 2017-2025 roky – Program for conservation of the gene pool of local and endangered breeds of farm animals in Ukraine for 2017–2025*. Sumy, Sums'kyi natsionalnyi ahrarnyi universytet, 84 (in Ukrainian).

4. Starodub, L., Yu. Stefurak, I. Stefurak, I. Zelenchuk, Ya. Zelenchuk, and R. Voytsitskiy. 2020. Hutsul's'ka poroda koney – aboryhenna poroda ukrayins'kykh Karpat – The Hutsul breed of horses is an aboriginal breed of the Ukrainian Carpathians. *Scientific Bulletin of the LNUVMB named after S. Z. Gzytsky*. Series : Agricultural Sciences. 22(92):119–124 DOI: 10.32718/nvlvet-a9220 (in Ukrainian).

5. Burkat, V. P. 2005. *Metodyky naukovykh doslidzhen iz seleksii, henetyky ta biotekhnolohii u tvarynnyctvi – Research methods in breeding, genetics and biotechnology in animal husbandry*. Kyiv, Ahrarna nauka, 244 (in Ukrainian).

6. Kovaleva, O. A. 2008. Tsytohenetycheskye anomalyy v somatycheskykh kletkakh mlekopytaiushchykh – Cytogenetic abnormalities in mammalian somatic cells. *Tsytolohiya y henetyka – Cytology and genetics*, (1):58–72 (in Ukrainian).

7. Starodub, L. F. 2021. *Henetychna minlyvist' aboryhennykh porid velykoyi rohatoyi khudoby ta koney za riznymy typamy markeriv – Genetic variability of aboriginal breeds of cattle and horses by different types of markers : dys. ... d-ra s.-h. nauk : 03.00.15*. Chubyn's'ke Kyuyivs'koyi obl., 380 (in Ukrainian).

8. Dzhus, P., L. Starodub, Yu. Kurylenko, and S. Kostenko. 2013. Yzmenchyvost tsytohenetycheskykh pokazatelei somatycheskoho mutaheneza raznykh porod loshadei – Variability of cytogenetic parameters of somatic mutagenesis of different breeds of horses. *Ahrarny nauky – Agricultural sciences*, 5(14):31–35 (in Bulgaria).

---

Одержано редколегією 08.05.2023 р.

Прийнято до друку 30.05.2023 р.