

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС КОБЫЛ (*Equus caballus*) УКРАИНСКОЙ ВЕРХОВОЙ ПОРОДЫ В СВЯЗИ С ОПЛОДОТВОРЯЕМОСТЬЮ

А.В. ТКАЧЁВ<sup>1</sup>, О.Л. ТКАЧЁВА<sup>2</sup>, В.И. РОССОХА<sup>2</sup>

В странах с развитым коневодством цитогенетические исследования кобыл широко применяются на практике (в случаях эмбриональной смертности — в обязательном порядке), активно ведутся работы по генетической оценке *Equus caballus*. Тем не менее, в доступной литературе нам не удалось найти публикаций о связи между цитогенетическими нарушениями у кобыл и результативностью искусственного осеменения замороженной и оттаянной спермой. Мы впервые изучили влияние цитогенетического статуса конематок украинской верховой породы на полноценность их полового цикла и оплодотворяемость по харьковской технологии. Показано, что при установлении гипофункции яичников, которая вызвана повышенной хромосомной изменчивостью (в отсутствие геномных мутаций и сбалансированных цитогенетических нарушений, передаваемых потомству), кобыл целесообразно разделять на три группы по общей хромосомной нестабильности — с числом метафаз с абберациями до 5 %, от 5 до 10 % и более 10 %. Такое разделение позволяет лучше охарактеризовать физиологическое состояние животных, оптимизировать план лечебных мероприятий, что в дальнейшем влияет на результативность искусственного осеменения при проведении работ по харьковской технологии. В случае охлажденной спермы оплодотворяемость (по проценту рожденных жеребят) у кобыл с цитогенетическим статусом более 10 % метафаз с абберациями оказалась наименьшей и в среднем была на 29,81-31,86 % ниже ( $p < 0,01$ ), чем у кобыл с допустимой общей хромосомной нестабильностью. Оплодотворяемость после применения оттаянной спермы была наибольшей при осеменении кобыл с допустимыми показателями общей хромосомной нестабильности (до 5 %) и в среднем превысила на 14,93 % ( $p < 0,05$ ) этот показатель у конематок с повышенным процентом метафаз с абберациями. Влияние цитогенетического статуса кобыл на оплодотворяемость при искусственном осеменении более четко прослеживалось при применении деконсервированной спермы, чем при использовании охлажденной. Оплодотворяемость деконсервированной спермой у кобыл с числом абберантных метафаз до 5 % составила в среднем 71,60 %, в случае 5-10 % — 56,67 %, более 10 % — только 37,04 %. Для повышения эффективности биотехнологической работы с *E. caballus* предлагается учитывать особенности цитогенетического статуса кобыл.

**Ключевые слова:** *Equus caballus*, цитогенетический статус кобыл, оплодотворяемость, хромосомные абберации.

Генетическая оценка *Equus caballus* проводится во многих странах (1-3). Несмотря на это, в доступной литературе нам не удалось найти публикаций о влиянии цитогенетического статуса кобыл на результативность искусственного осеменения замороженной и оттаянной спермой. В странах с развитым коневодством цитогенетические исследования кобыл применяются на практике гораздо шире, чем в Украине, а в случаях эмбриональной смертности — в обязательном порядке (4-6). Известно, что в коневодстве Украины интенсивная селекция без достаточно широких фундаментальных цитогенетических исследований могла привести к распространению цитогенетических аномалий, которые способны снижать репродуктивную функцию (7-9). Возможно, именно поэтому выход жеребят в целом по отрасли коневодства Украины не превышает 50 %, а для большинства разводимых пород не обеспечен необходимый минимум племенного воспроизводительного поголовья. Из 12 официально зарегистрированных в Украине пород *E. caballus* только 3 имеют достаточное количество племенных животных; при этом общая численность поголовья лошадей на начало 2015 года сократилась до 320-330 тыс. (10). Поэтому фундаментальной задачей становится сохранение и увеличение численности поголовья, что отражено в программе развития коневодства в Украине до 2020 года. Определенная роль в этом отводится применению современных методов биотехнологии репродукции (11, 12), однако они неэффективны,

если у кобыл диагностируется ановуляторный половой цикл, вызванный гипофункцией яичников либо цитогенетическими нарушениями.

Отметим, что в последние годы у всех видов животных (как и у человека) отмечают снижение репродуктивной функции, рост числа акушерско-гинекологических заболеваний, что, возможно, отчасти связано с ухудшением экологической ситуации (13-16). В условиях зоопарков все шире применяют цитогенетические исследования с целью сохранения полноценного генофонда и эффективной репродукции животных (17-18).

Эти факты указывают на необходимость применения цитогенетических исследований для выявления причин ановуляторных половых циклов и повышения оплодотворяемости кобыл как при естественной случке, так и после искусственного осеменения. В первую очередь цитогенетическому обследованию следует подвергать кобыл с ректально подтвержденной гипофункцией яичников как наиболее распространенной патологией. Однако в Украине проводили лишь несколько цитогенетических исследований *E. caballus* в связи с репродуктивной функцией, но без изучения связи с результативностью искусственного осеменения (19, 20).

В настоящей работе мы впервые показали, что оплодотворяемость кобыл украинской верховой породы зависит от степени нестабильности их хромосомного аппарата (при отсутствии геномных мутаций и сбалансированных цитогенетических нарушений, передаваемых потомству), причем этот эффект проявляется сильнее, если конематок осеменяют не охлажденной, а деконсервированной спермой.

Целью исследования было установление влияния цитогенетического статуса самок *Equus caballus* на полноценность их полового цикла и результативность оплодотворяемости по харьковской технологии.

**Методика.** В одних и тех же хозяйствах (частные конные заводы и племрепродукторы в Харьковской, Полтавской, Днепропетровской, Запорожской и Киевской областях Украины) на протяжении 3 лет (2012-2015 годы) проводили обследование 143 кобыл украинской верховой породы.

Кровь для цитогенетических исследований отбирали до осеменения один раз в неделю общепринятыми методами из ярёмной вены с соблюдением правил асептики и антисептики в стерильные пробирки с гепарином. В стерильных условиях лимфоциты культивировали в среде Игла или среде 199 («Sigma», США) с добавлением инактивированной сыворотки теленка, фитогемагглютинаина («Sigma», США) и антибиотиков (пенициллин или стрептомицин, 100 мг/см<sup>3</sup>) при 37 °С на протяжении 48-56 ч, после чего готовили препараты метафазных пластинок лимфоцитов (21, 22). Препараты просматривали в световом микроскопе Jenaval («Carl Zeiss», Германия) под масляной иммерсией при увеличении  $\times 1000$ .

На основании цитогенетических данных до начала случного сезона и осеменения кобыл разделили на группы в зависимости от процента метафаз с абберациями (до 5 %, 5-10 % и более 10 %). После этого провели комплекс зоотехнических и ветеринарных мероприятий для усиления репродуктивной функции (улучшение кормления и содержания, увеличение длительности моциона, применение разработанного комплекса лечебных мер) у кобыл с установленной гипофункцией яичников. Животных с геномными мутациями и сбалансированными цитогенетическими аномалиями, передающимися по наследству, из исследования исключали.

Оптимальное время осеменения диагностировали комплексно с применением ультразвукового сканера Aquila Pro («Esaote», Spain) для ветеринарии с ректальным линейным зондом (частота 6-8 МГц).

Искусственное осеменение проводили при первом полноценном

овуляторном половом цикле по харьковской технологии (10) с помощью разработанного нами инструмента (23). Использовали охлажденную и деконсервированную сперму. Охлажденная сперма жеребцов перед осеменением хранилась в бытовом холодильнике при температуре 2-4 °С не более 48 ч. Сперму замораживали по харьковской технологии (10), спермодозы были расфасованы в шприц-тюбы объемом 5 см<sup>3</sup> с концентрацией спермиев 150-200 млн/см<sup>3</sup>. На одно осеменение использовали одну спермодозу. Размораживали спермодозы (шприц-тюбы) в водяной бане при температуре 38-40 °С в течении 2-3 мин. После размораживания для осеменения использовали только те спермодозы, в которых подвижность спермиев была не ниже 3 баллов (не менее 30 % спермиев с прямолинейно-поступательным движением). Жеребцы-доноры имели допустимую хромосомную изменчивость (менее 5 % метафаз с аберрациями), геномные мутации и наследуемые сбалансированные цитогенетические нарушения отсутствовали.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами (24), а также с применением специализированной программы SPSS («IBM», США). В таблицах приведены средние (*M*) и стандартные ошибки средних ( $\pm$ SEM). Различия оценивали по *t*-критерию Стьюдента и считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** При сохранении украинского генофонда *E. caballus* первоочередная проблема заключается в снижении числа кобыл с ановуляторными половыми циклами, так как у таких животных оплодотворение становится невозможным (25). При комплексной диагностике состояния репродуктивной сферы отклонения от физиологической нормы отмечали у животных с хромосомной изменчивостью, превышающей 5 %. На рисунке 1 представлен физиологический предовуляторный фолликул кобылы при допустимом числе метафаз с аберрациями и гипофункциональный яичник особи, у которой их процент повышен.

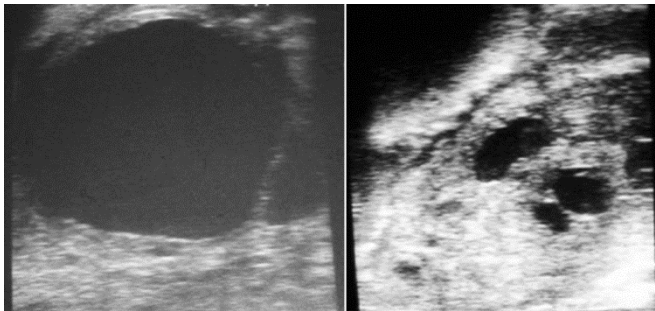


Рис. 1. Физиологический фолликул кобылы (*Equus caballus*) украинской верховой породы с допустимым цитогенетическим статусом (слева) и гипофункциональный яичник при повышенном проценте метафаз с аберрациями (справа).

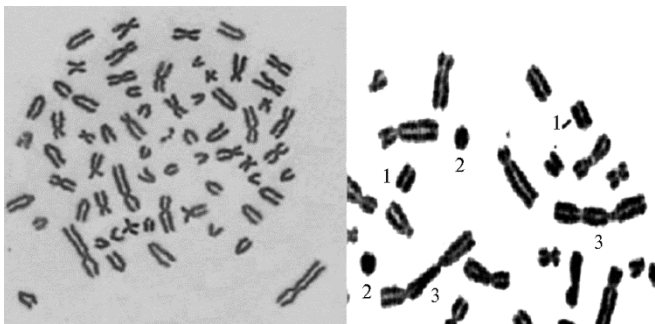


Рис. 2. Метафазные пластинки кобыл (*Equus caballus*) украинской верховой породы без аберраций (слева) и с повышенной хромосомной нестабильностью (справа): 1 — парные фрагменты, 2 — кольцевые образования, 3 — дигцентрические хромосомы.

Вид нормальной метафазной пластинки и пример наблюдаемых

цитогенетических нарушений иллюстрирует рисунок 2.

Как следует из данных, представленных в таблицы 1, кобылы с показателем общей хромосомной нестабильности до 5 % и физиологическим половым циклом имели на 5,31 % меньше ( $p < 0,001$ ) метафаз с

абберациями, чем животные из группы с 5-10 % аббераций, и на 17,09 % меньше ( $p < 0,001$ ) метафаз с абберациями по сравнению с конематками, у которых регистрировали более 10 % абберантных метафаз.

**1. Цитогенетический статус кобыл (*Equus caballus*) украинской верховой породы и их оплодотворяемость при искусственном осеменении по харьковской технологии ( $M \pm SEM$ , частные конные заводы и племрепродукторы Украины, 2012-2015 годы)**

Показатель	Метафазы с абберациями		
	до 5 %	5-10 %	более 10 %
Число исследованных метафаз	2418	2486	2930
Число кобыл в группе	44	45	54
Метафаз с абберациями	1,48±0,08	4,40±0,11***	10,67±0,22***
Относительное число метафаз с абберациями, %	2,70±0,14	8,01±0,22***	19,79±0,46***
Родилось жеребят от охлажденной спермы, %	92,00±1,15	90,00±1,11	60,19±0,93**
Родилось жеребят от оттаянной спермы, %	71,60±1,14	56,67±1,11*	37,04±1,85**

\*, \*\*, \*\*\* Различия статистически значимы в сравнении с первой группой кобыл (до 5 % метафаз с абберациями) соответственно при  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ .

При применении деконсервированной спермы влияние цитогенетического статуса самок на оплодотворяемость при осеменении проследилось более четко, чем в случае охлажденной, что согласуется с результатами применения замороженно-оттаянной спермы жеребцов другими исследователями (26, 27). Осеменение проводили при первом полноценном овуляторном половом цикле. Оплодотворяемость от применения охлажденной спермы (по проценту рожденных жеребят) у кобыл с цитогенетическим статусом более 10 % метафаз с абберациями была наименьшей: в среднем на 29,81 и 31,86 % ниже ( $p < 0,01$ ), чем у животных из групп соответственно с 5-10 % и < 5 % метафаз с абберациями. При осеменении охлажденной спермой у конематок из первой (до 5 % метафаз с абберациями) и второй (5-10 % метафаз с абберациями) групп оплодотворяемость не имела достоверных различий.

Оплодотворяемость оттаянной спермой была наибольшей в группе с общей хромосомной нестабильностью < 5 %, в среднем превысив на 14,93 % ( $p < 0,05$ ) показатель у кобыл из второй группы и на 34,56 % ( $p < 0,01$ ) — у особей с наибольшим процентом метафаз с абберациями (> 10 %). Другие исследователи тоже отмечают, что цитогенетический статус кобыл особенно важен при использовании деконсервированной спермы (28, 29).

**2. Структура хромосомных аббераций у кобыл (*Equus caballus*) украинской верховой породы с разной степенью хромосомной нестабильности ( $M \pm SEM$ , частные конные заводы и племрепродукторы Украины, 2012-2015 годы)**

Показатель	Метафазы с абберациями		
	до 5 %	5-10 %	более 10 %
Всего аббераций	1,95±0,10	6,69 ±0,27***	14,41±0,33***
Структура аббераций, %:			
единичные фрагменты хромосом	70,08±3,78	47,57±2,10***	43,02±1,85***
парные фрагменты хромосом	23,11±5,10	27,75±1,65	23,11±0,77
кольцевые хромосомы	0,00±0,00	10,36±1,70	16,84±1,20**
пробелы и разрывы хромосом	6,81±5,29	13,74±1,95	16,27±1,03
дицентрические хромосомы	0,00±0,00	0,58±0,66	0,76±0,87

\*, \*\*, \*\*\* Различия статистически значимы в сравнении с первой группой кобыл (до 5 % метафаз с абберациями) соответственно при  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ .

Изучение структуры хромосомных аббераций (табл. 2) показало, что их общее число у кобыл из первой группы (с допустимой общей хромосомной нестабильностью) было в среднем на 4,74 меньше ( $p < 0,001$ ), чем во второй группе, и на 12,46 меньше ( $p < 0,001$ ), чем в третьей. Среди аббераций преобладали единичные фрагменты хромосом, причем в первой группе этот показатель был на 22,51 % выше ( $p < 0,001$ ), чем во второй, и

на 27,06 % выше ( $p < 0,001$ ), чем в третьей, где число ановуляторных циклов наибольшее. Процент парных фрагментов хромосом был в среднем практически одинаков у самок с общей хромосомной нестабильностью до 5 % и более 10 %, а во второй группы этот показатель недостоверно превышал таковой в первой и третьей группах на 4,64 %. У животных с из первой группы кольцевых хромосом не наблюдали, а в третьей группе их было на 6,48 % больше ( $p < 0,01$ ), чем во второй. Число пробелов и разрывов в обследованных метафазных пластинках было наименьшим у кобыл из первой группы, что в среднем на 6,93 % меньше, чем во второй, и на 9,46 % меньше, чем в третьей. У обследованных кобыл с допустимым уровнем хромосомной нестабильности (до 5 %) дицентрических хромосом не обнаружили, их наибольший процент был установлен у животных из третьей группы, имеющих более 10 % метафаз с абберациями, что оказалось на 0,18 % больше, чем во второй группе с общей хромосомной нестабильностью 5-10 %.

Таким образом, впервые в Украине изучено влияние цитогенетического статуса кобылок *Equus caballus* украинской верховой породы на полноценность их полового цикла и оплодотворяемость по харьковской технологии. Установлено, что для повышения оплодотворяемости кобыл целесообразно разделять их в зависимости от цитогенетического статуса (с числом метафаз с абберациями до 5 %, 5-10 % и более 10 %). Такое разделение позволяет повысить оплодотворяемость как при естественной случке, так и при искусственном осеменении. При этом оплодотворяемость деконсервированной спермой у кобыл с числом абберантных метафаз до 5 % составила в среднем 71,60 %, с 5-10 % таких метафаз — 56,67 %, более 10 % — только 37,04 %. Следовательно, особенно важно учитывать цитогенетический статус кобыл при использовании деконсервированной спермы.

<sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет,  
61002 Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская, 53,  
e-mail: sasha\_sashaola@mail.ru ✉;

Поступила в редакцию  
4 сентября 2017 года

<sup>2</sup>Институт животноводства Национальной академии  
аграрных наук Украины,  
61120 Украина, г. Харьков, ул. 7-й Гвардейской Армии, 3,  
e-mail: tkacheva.olga2017@gmail.com, rossokha.v@ukr.net

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, V. 53, № 2, pp. 302-308

## CYTOGENETIC STATUS OF MARES (*Equus caballus*) OF UKRAINIAN RIDING BREED INFLUENCES THEIR FERTILITY

A.V. Tkachev<sup>1</sup>, O.L. Tkacheva<sup>2</sup>, V.I. Rossokha<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National University of Pharmacy, 53, vul. Pushkinskaya, Kharkov, Ukraine, 61002, e-mail sasha\_sashaola@mail.ru (✉ corresponding author);

<sup>2</sup>Institute of Animal Science of National academy of agrarian sciences of Ukraine, 3, vul. 7-i Gvardeiskoi Armii, Kharkov, 61120 Ukraine, e-mail tkacheva.olga2017@gmail.com, rossokha.v@ukr.net

ORCID:

Tkachev A.V. orcid.org/0000-0002-7721-5742

Rossokha V.I. orcid.org/0000-0001-8709-7535

Tkacheva O.L. orcid.org/0000-0002-5573-6117

The authors declare no conflict of interests

Received September 4, 2017

doi: 10.15389/agrobiol.2018.2.302eng

### Abstract

Cytogenetic studies of mares are widely used in practice (in case of embryonic death this is a mandatory test) in countries with developed horse breeding. Genetic evaluation of *Equus caballus* is also widely performed. Nevertheless, in the available literature, we could not find publications on the relationship between cytogenetic disorders in mares and the effectiveness of artificial insemination with frozen and thawed sperm. This paper is the first report on the impact of the cytogenetic status of mares *E. caballus* of Ukrainian horse breed on their sexual cycle and the efficacy of the artificial

insemination by Kharkov technology. It has been shown that in case of ovary hypofunction caused by an increased chromosomal variability, as estimated by the per cent of aberrant metaphases with no genome mutations and the transmitted cytogenetic disturbances found, it is necessary to divide the mares into three groups: up to 5 %, from 5 to 10 % and over 10 % overall chromosomal instability. This allows better characterization of mares' physiological condition to optimized treatment and the artificial insemination procedure by Kharkov technology. When cooled semen used, the fertility of the mares having more than 10 % aberrant metaphases was the lowest, by 29.81 and 31.86 % less ( $p < 0.01$ ) compared to mares from the groups with lower chromosomal instability. When thawed semen was used, the fertility was the highest in the mares with the chromosomal instability up to 5 %, that is, on average 14.93 % higher ( $p < 0.05$ ) compared to the mares with more than 5 % of metaphases with aberrations. The influence of cytogenetic status on the fertility in the insemination was clearly seen when the cryopreserved semen was used as compared to cooled semen. The fertility of the mares inseminated with cryopreserved sperm averaged was 71.60 % in group 1 (up to 5 % aberrant metaphases), 56.67 % in group 2 (5-10 % aberrant metaphases), and only 37.04 % in group 3 (> 10 % aberrant metaphases). So, estimation of cytogenetic status ensures optimization of artificial insemination and an increase in mares' fertility when used cooled and frozen-thawed semen.

Keywords: *Equus caballus*, cytogenetic status of mares, fertility, aberrations.

## REFERENCES

1. Aldridge L.I., Kelleher D.L., Reilly M., Brophy P.O. Estimation of the genetic correlation between performances at different levels of show jumping competition in Ireland. *J. Anim. Breed. Genet.*, 2000, 117: 65-72 (doi: 10.1046/j.1439-0388.2000.00232.x).
2. Shubertova Z., Candrak J., Rolinec M. Genetic evaluation of show jumping horses in the Slovak Republic. *Ann. Anim. Sci.*, 2016, 16(2): 387-398 (doi: 10.1515/aoas-2015-0072).
3. Stefaniuk-Szmukier M., Ropka-Molik K., Zagrajczuk A., Piorkowska K., Szmatoła T., Luszczynski J., Bugno-Poniewierska M. Genetic variability in equine GDF9 and BMP15 genes in Arabian and Thoroughbred mares. *Ann. Anim. Sci.*, 2018, 18(1): 39-52 (doi: 10.1515/aoas-2017-0035).
4. Zabek T., Semik E., Fornal A., Bungo-Poniewierska M. Genetic variation of two horse breeds in CpG islands of Oas1 locus. *Ann. Anim. Sci.*, 2014, 14(4): 841-850 (doi: 10.2478/aoas-2014-0069).
5. Curik I., Zechner P., Sölkner J., Achmann R., Bodo I., Dovc P., Kavar T., Marti E., Brem G. Inbreeding, microsatellite heterozygosity, and morphological traits in Lipizzan horses. *J. Hered.*, 2003, 94: 125-132 (doi: 10.1093/jhered/esg029).
6. Khanshour A., Juras R., Blackburn R., Cothran E.G. The legend of the Canadian Horse: genetic diversity and breed origin. *J. Hered.*, 2015, 106(1): 37-44 (doi: 10.1093/jhered/esu074).
7. Ducro B.J., Koenen E.P.C., Tartwijk J.M.F.M., Bovenhuis H. Genetic relations of movement and free-jumping traits with dressage and show-jumping performance in competition of Dutch Warmblood horses. *Livest. Sci.*, 2007, 107: 227-234 (doi: 10.1016/j.livsci.2006.09.018).
8. Druml T., Grilz-Seger G., Neuditschko M., Neuhauser B., Brem G. Phenotypic and genetic analysis of the leopard complex spotting in Noriker horses. *J. Hered.*, 2017, 108(5): 505-514 (doi: 10.1093/jhered/esx039).
9. Collins C.W., Songsasen N.S., Vick M.M., Wolfe B.A., Weiss R.B. Abnormal reproductive patterns in Przewalski's mares are associated with a loss in gene diversity. *Biol. Reprod.*, 2012, 86(2): 1-10 (doi: 10.1095/biolreprod.111.092676).
10. Tkachev A.V., Sheremeta V.I., Tkacheva O.L., Rossokha V.I. Physiological relationship of erythrocyte antigens with indicators of horse spermogram. *Fiziol. Zh.*, 2017, 63(1): 84-90 (doi: 10.15407/fz63.01.084).
11. Choi Y.H., Love C.C., Chung Y.G., Varner D.D., Westhusin M.E., Burghardt R.C., Hinrichs K. Production of nuclear transfer horse embryos by Piezo-driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract. *Biol. Reprod.*, 2002, 67(2): 561-567 (doi: 10.1095/biolreprod67.2.561).
12. McPartlin L.A., Suarez S.S., Czaya C.A., Hinrichs K., Bedford-Guaus S.J. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biol. Reprod.*, 2009, 81(1): 199-206 (doi: 10.1095/biolreprod.108.074880).
13. Moskalets V.V., Moskalets T.Z., Vasylykivskyi S.P., Grynyk I.V., Vovkohon A.H., Tarasyuk S.I., Rybalchenko V.K. Adaptability and stability mechanisms of Triticeae tribe to epiphytoparasites in anthropical ecosystem. *Ukrainian Journal of Ecology*, 2017, 7(2): 230-238 (doi: 10.15421/2017\_41).
14. Taguchi T., Kubota S., Mezaki T., Tagami E., Sekida S., Nakachi S., Okuda K., Tominaga A. Identification of homogeneously staining regions by G-banding and chromosome microdissection, and FISH marker selection using human Alu sequence primers in a scleractinian coral *Coelastrea aspera* Verrill, 1866 (*Cnidaria*). *Comp. Cytogenet.*, 2016, 10(1): 61-75 (doi: 10.3897/CompCytogen.v10i1.5699).
15. Dean W., Santos F., Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2003, 14: 93-100

- (doi: 10.1016/s1084-9521(02)00141-6).
16. Savina N.V., Smal' M.P., Kuzhir T.D. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*, 2008, 10: 108-114 (in Russ.).
  17. Kosowska B., Strzała T., Moska M. *Vestnik zoologii*, 2015, 49(6): 529-536 (doi: 10.1515/vzoo-2015-0063) (in Russ.).
  18. Perevozkin V.P., Bondarchuk S.S., Manich A.S. *Genetika*, 2015, 51(8): 924-933 (in Russ.).
  19. Pawlina K., Bugno-Poniewierska M. The application of zoo-fish technique for analysis of chromosomal rearrangements in the *Equidae* family. *Ann. Anim. Sci.*, 2012, 12(1): 5-13 (doi: 10.2478/v10220-012-0001-y).
  20. Danielak-Czech B., Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A. Identification of telomeric sequences in pigs with rearranged karyotype using prins technique /Identyfikacja sekwencji telomerowych u świ z rearan acj karyotypu przy wykorzystaniu techniki PRINS. *Ann. Anim. Sci.*, 2013, 13(3): 495-502 (doi: 10.2478/aoas-2013-0022).
  21. Warchałowska-Śliwa E., Grzywacz B., Heller K.G., Chobanov D.P. Comparative analysis of chromosomes in the Palaearctic bush-crickets of tribe *Pholidopterini* (*Orthoptera*, *Tettigoniinae*). *Comp. Cytogenet.*, 2017, 11(2): 309-324 (doi: 10.3897/CompCytogen.v11i2.12070).
  22. Sadílek D., Angus R.B., Táhlavský F., Vilímová J. Comparison of different cytogenetic methods and tissue suitability for the study of chromosomes in *Cimex lectularius* (*Heteroptera*, *Cimicidae*). *Comp. Cytogenet.*, 2016, 10(4): 731-752 (doi: 10.3897/CompCytogen.v10i4.10681).
  23. Tkachov O.V. *Pristrii atravmatichnii dlya shtuchnogo osimeninnya kobil. Patent Ukraïni na korisnu model' № 105004, MPK A61D 19/02. Zayavl. 05.10.2015. Opubl. 25.02.2016. Byul. № 4* [Devise for non-traumatic artificial insemination of mares. Patent of Ukraine № 105004, MPK A61D 19/02. Appl. 05.10.2015. Publ. 25.02.2016. Bul. № 4] (in Russ.).
  24. Plokhinskii N.A. *Rukovodstvo po biometrii dlya zootekhnikov* [Guide to biometrics for livestock specialists]. Moscow, 1969 (in Russ.).
  25. Wejer J., Lewczuk D. Effect of the age on the evaluation of horse conformation and movement. *Ann. Anim. Sci.*, 2016, 16(3): 863-870 (doi: 10.1515/aoas-2015-0092).
  26. Melo C.M., Papa F.O., Fioratti E.G., Magalhaes L.C.O., Alvarenga M.A. Application of equine epididymal sperm. *Biol. Reprod.*, 2010, 83(Suppl\_1): 672-680 (doi: 10.1093/biolreprod/83.s1.672).
  27. Robeck T.R., Steinman K.J., Gearhart S., Reidarson T.R., McBain J.F., Monfort S.L. Reproductive physiology and development of artificial insemination technology in killer whales (*Orcinus orca*). *Biol. Reprod.*, 2004, 71(2): 650-660 (doi: 10.1095/biolreprod.104.027961).
  28. Lindsey A.C., Morris L.H., Allen W.R., Schenk J.L., Squires E.L., Bruemmer J.E. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. *Equine Vet. J.*, 2002, 34: 128-132 (doi: 10.2746/042516402776767178).
  29. Lindsey A.C., Schenk J.L., Graham J.K., Bruemmer J.E., Squires E.L. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet. J.*, 2002, 34: 121-127 (doi: 10.2746/042516402776767321).