



УДК 636.082

ББК 45.318.6

С71

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 27.02.2014 р., протокол № 6.

Укладачі:

М. І. Гиль –

д-р. с -г. наук, професор, завідувач кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

О. І. Каратєєва –

канд. с -г. наук, асистент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти :

Т. І. Нежлукченко –

д-р. с -г. наук, професор, завідувач кафедри генетики та розведення сільськогосподарських тварин, ДВНЗ «Херсонський державний аграрний університет».

С. І. Луговий –

канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри технології виробництва продукції тваринництва, Миколаївський національний аграрний університет.

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| Вступ   | 4  |
| 1. Феногенетика великої рогатої худоби  | 5  |
| 2. Комплексний генетичний моніторинг селекційних процесів збереження генофонду тварин | 10 |
| 3. Використання QTL-генів   | 18 |
| 4. Геномна селекція (SNP-маркери)   | 23 |
| 5. Генетика собак   | 29 |
| 6. Ентропійно-інформаційний аналіз полігенно зумовлених ознак                         | 37 |
| 7. Маркер-допоміжна селекція (MAS – Marker-assisted selection)                        | 42 |
| 8. Методи відстані у філогенії  | 48 |
| Література  | 54 |

## Вступ

Генетика – наука про спадковість і мінливість органічних форм життя. Її розділ – спеціальна генетика розглядається в циклі тваринницьких, зокрема зооінженерних наук, як фундаментальна підстава для ведення селекції з тваринами, порозуміння їх імунно-резистентних властивостей, процесу видоутворення і макроеволюції, є теоретичною основою генетично-інженерних розробок в галузі тваринництва. Тенденції селекційного удосконалення, прискорення цього процесу набувають в останні часи великого значення. В зв'язку з цим доречно згадати слова М.І. Вавілова, який приділив увагу знанням з спадковості, мінливості, відбору, підбору, що перетворюють селекцію в еволюцію, яка спрямовується волею людини. Отже, порозуміння генетичних процесів і оволодіння деякими біотехнологіями визначило в генетиці центральну роль керування процесами життя, блискуче майбутнє.

В системі підготовки фахівців – «Спеціальна генетика» є теоретичною основою для розв'язання практичних задач в різних галузях тваринницького напрямку з питань селекції, відтворення і утримання сільськогосподарських тварин і птиці.

## Тема №1.

### Феногенетика великої рогатої худоби

**ФЕНОГЕНЕТИКА** (від грец. *φαίνομαι* – з’являюся і генетика) – напрям досліджень у генетиці що вивчає вплив генотипу на формування фенотипу. Термін запровадив у 1918 р. німецький учений В. Геккер. Інша назва – *фенетика* – вчення про елементарні одиниці фенотипу, їх природу. Ці два поняття взаємопов’язані [1].

Феногенетичний метод дозволяє встановити ступінь впливу генів і умов середовища на розвиток досліджуваних властивостей і ознак в онтогенезі.

Термін “*фен*” було введено В. Логансеном для визначення генами зумовленої ознаки, цілого фенотипу. *Фени* – це дискретні альтернативні варіації будь-якої ознаки чи властивості які в чисельній популяції нероздільні без втрати якості. Фени відображають генотипові – конституцію особини, а частота їх зустрічаємості – фенотипові особливості популяції [1].

Вивчення конкретних фенів у конкретній породі свідчить, що не варто очікувати лише однозначні і постійні співвідношення між геном і феном. Виникає потреба подальшого дослідження фенів не лише в генеалогії (генеалогічних фенів), стадах (стадних фенів), породах (породних фенів), а і в цілому виді (видових фенів) [14].

Кожна порода великої рогатої худоби має свій банк генів і свою карту фенів. Наприклад, електрофоретичні фени характеризують не лише породну фенорізноманітність худоби, й визначають алельні варіанти в локусах хромосом ліній, родин та стад. Важливими в методах чистопородного розведення стали серологічні фени, в прогнозуванні резистентності та продуктивності – біохімічні. Генетичний поліморфізм таких фенів оцінюється і в нових породах, породних типах та генераціях.

Особливості породного генофонду, алельні і неалельні взаємодії у тварин та їх породний генотиповий склад розкриває вивчення і дослідження фенів у скотарстві. Фени дають змогу селекціонерам слідкувати за їх проявом (пенетрантністю) у породах і родинах. Наприклад, фени форми рогів, відмітин, дерматогліфів, типів безмежної кількості морфологій, поведінки та інші різняться коливаннями частоти не лише у близьких і далеких родичів, а навіть у різних породах [1, 14].

Останнім часом у селекційно-племінній роботі з великою рогатою худобою вже стають вагомими дослідження фенів і феноструктури фенофондів у породах та породних групах. Дискретна та безперервна морфологічна різноманітність фенів вражає своєю палітрою за масою, спадковими аномаліями, будовою тіла, ростом та іншими ознаками. Особливо помітні барви різноманітності в окремих популяціях та стадах на індивідуальних фенах. Дають змогу глибше охарактеризувати генотипи індивідуумів у стадах (популяціях), визначити гетерогенність їх на різних рівнях і з'ясувати мікрофілогенез породи чи породної групи фени носогубного дзеркала краніологічні, екстер'єрні, фени забарвлення та форм волосся, етологічні, біохімічні і фізіологічні фени. Так, з'ясувалось, що саме біохімічна різноманітність фенів (кількість алелів, гомозиготність певних локусів та розподіл генних концентрацій) виявилось значно іншою у європейських порід порівняно із західними [14].

Саме ці факти навели на думку проведення систематизованого висвітлення породної фенетики. В основу покладено три категорії ознак: статі, віку та екстер'єру тварин.

Породний «склад» фенів розглядається на простих і складних ознаках: конфігурація черепа, форм спіралі слухового проходу, характер зовнішнього лабіринта, завиток вуха, типи постави губ та очей, варіанти серологічних факторів, форми розташування карманів у судинах і симетричність рогів, «модифікації» постави лопаток, голови, хвоста, кінцівок і дійок, фенотипи ратиць, молочних колодязів, дерматогліфів і молочного дзеркала, типи суглобів, варіанти форм жуйної поверхні зубів, типи локомоцій тварин, характери голосів і стресових реакцій, безліч факторів стресостійкості, типи гілкування судин та нервових волокон, варіанти борозенчатості зовнішнього шару головного мозку, типів електрофоретичних фенів та інших. Таким чином, предметом фенетики стають «матеріалізовані» у вигляді дискретних характеристик гени, які і вивчають за допомогою фенів. Фени виділяються візуально:

а) спрямованим спостереженням за живими тваринами і описом матеріалів;

б) фотографування;

в) аудіо- та відеозаписом.

Фени є альтернативною відмінністю будь-яких ознак, які або присутні (як цілісна ознака), або можуть фенотипово комбінуватись у спадковості нащадків. Ці комбінати зумовлені винятково генетично. Фени

існують незмінними все життя тварини. Можна припустити, що у майбутньому винайдуть всі фени, що маркують гени великої рогатої худоби. Підставою цього є виявлення екстер'єрних та інтер'єрних ознак (фенів), які використовуються в селекції. Тут потрібно виділити фени голови, тулуба, кінцівок, хвоста, ратиць, суглобів та інші [2].

Давно відомі в породній селекції фени загального забарвлення волосся та композиції малюнків всього волосяного покриву і окремих статей тварини.

Виходячи з динамічної моделі вивчення онтогенетичних фенів можна також визначити в породі на ранніх стадіях онтогенезу тварин як з інтенсивним ростом та розвитком так і з помірним, що певною мірою може слугувати своєрідним маркером майбутньої продуктивності таких тварин. Існують також генетично різні тварини і за складними ознаками (сукупностями фенів): «запахочутливості» «тривалості ембріогенезу», «поведінки», «локомоцій», «частоти серцебиття», «ритму життєдіяльності» та іншими. Крім динамічної та топологічної моделей вивчення фенів відома і факторна модель – вивчення факторних дисперсій, а саме – успадкованості ( $h^2$ ) та різної повторюваності ( $r_w$ ) окремих фенів і фенокмплексів [14].

Видові, породні і взагалі, різногрупові фени досить складні. їх нараховується кілька тисяч (близько 4000).

Використання в селекції фенетичного поліморфізму молочної худоби засноване на виявленні, в першу чергу, родинних фенів, а також через частоти фенів – визначення «кращих» та «гірших» за продуктивністю тварин.

Звичайно, що бездоганною в цьому відношенні могла бути «молекулярна класифікація» нуклеотидного складу ДНК, рекомбінативних чи клонованих фрагментів ДНК пріоритетних за господарсько корисними ознаками тварин. Але за технічних труднощів і дороговизни апаратурного забезпечення цих досліджень спадковості (на рівні молекул, хромосом і генів) подальше дослідження їх обмежене певний час рівнем поліморфізму фенів-маркерів.

Поліморфізм – це прояви індивідуальної різноманітності фенів, присутність в одній популяції двох або більше позначених типів фенів. Теорію поліморфізму розвивали в своїх працях С. Райт, С.С. Четвериков, М.П. Дубінін, Д.Д. Ромашов, М.В. Тимофеев-Ресовський, Р. Фішер, Є. Форд, Дж. Холдейн, Ф.Ф. Ейснер та інші [2].

Відкриття серологічного поліморфізму, наприклад, підтвердило уявлення про те, що електрофоретичний фен (тип білка, фермента чи ізоферменту) є маркером відповідного гена. А серед соматичних фенів широкого розповсюдження в селекції набуває інформація фенологів за визначенням особливостей типів черепа у тварин різної генеалогії. За варіантами форми вим'я, типами верхівок дійок, формами молочного дзеркала і молочних «колодязів» діагностували рівень молочності. Помітним у розведенні стає використання простих фенів: коротконогість і короткоголовість, архітектоніка будови і забарвлення волосся, різноманітність форм лоба, морди, грудей, холки, спини, кінцівок, вим'я, хвоста, типів печінки, легенів і нирок, типів гілкування бронхів, судин і нервових волокон [1, 2, 16].

У породній феноселекції можна навести дев'ять основних груп фенів:

1. Фени форми тіла (або окремих статей) – карликовість, брахігнатія, долігнатія, брахіцефалія і доліхоцефалія, короткохвостість – безхвостість.
2. Фени забарвлення покриву – мозаїка, великі і дрібні плями на тулубі, округлі, кутасті, овальні, ліроподібні, листоподібні і кільцеві. Фени забарвлення покриву голови – «борсучий тип»: світлий верх – темний низ; темний верх – світлий низ; маскарадне забарвлення («окуляри»), забарвлена макушка, плями на щоках, лобі і носі. Фени забарвлення вух, шиї, кінцівок, спини, живота, підгрудка та хвоста.
3. Фени побудови волосяного покриву – різні модифікації гіпотріхозу, пучки волосся вух, хвоста, пахвин, шиї, гриви і морди.
4. Морфологічні фени – типи дійок, форми ратиць, рогів, зубів, варіації вушної раковини та кінчика хвоста, типи швів черепних кісток.
5. Фени травної системи – топографії смакових сосочків язика, конфігурації долей печінки, нирок та дольок підшлункової залози, форми сечового міхура, складчастості тонких і товстих кишок, типів дольок надниркових залоз.
6. Фени дихальної системи – дивертикулів гортані та носових проходів, ніздрів, гілкування бронхів і типи трахей.
7. Фени статевої системи – топографія зовнішніх статевих органів, типи складчастості вагіни, форми сім'яників і яєчників.
8. Фени нервової системи – варіація типів нервових стовбурів і гілкування нервових волокон.
9. Серологічні фени – типи груп крові та білків, типи сплетень судин,



різні форми селезінки.

В зв'язку з широким використанням симентальської породи при створенні нових сучасних спеціалізованих порід (молочних і м'ясних) фенетика розглядається з наголосом саме на цю породу. В селекції симентальської худоби найрідкіснішою особливістю є породне багатство типів. Ця властивість утворилась у худоби завдяки тому, що порода розводилась у багатьох регіонах, тому її часто схрещували з іншими породами. В результаті ця худоба зосередила багатий поліфонний матеріал, який став доповненням у селекції. Так, тонка шкіра, гладка блискуча шерсть, об'ємисті груди, рівна спина, велике молочне дзеркало, сухий корінь хвоста, наприклад, вірогідно маркували рівень молочності сименталів [14].

Адже фени кожної породи великої рогатої худоби природно пов'язані, позначають (маркують) спадковість (генотип) тварин, і відображають популяційні процеси та особливості породоутворення. Фени ідентифікують: а) вид – каріотипом і хромосомним поліморфізмом; б) породу – факторами груп крові і поліморфними білками біологічних рідин; в) популяцію – окремими системами антигенів, якісними та кількісними характеристиками; г) лінію або родину – морфологічними, структурними і продуктивними ознаками; індивідууми дерматотипами, окремими антигенами і особливостями інтер'єру та екстер'єру: д) статевий диморфізм – наявністю X та Y-хромосом, певні типи будови тіла [1, 2, 14].

Таким чином, морфометрія таких фенів свідчить, що існує діапазон їх генотипової мінливості не лише в межах окремих статевих і вікових груп тварин, але й у різних поколінь та навіть порід, що дає змогу певним чином прогнозувати напрям продуктивності та її кількість.

## Тема №2

### Комплексний генетичний моніторинг селекційних процесів збереження генофонду тварин

Останніми роками стан селекційної роботи в тваринництві характеризується певним скороченням національної бази племінних ресурсів, зниженням племінних і продуктивних якостей, застосуванням у ряді випадків недосконалих методів відтворення стада та відсутністю системи контролю за найважливішими елементами селекції – одержанням, вирощуванням, оцінкою і використанням племінних плідників. Можливості широкого залучення кращого генетичного матеріалу спеціалізованих порід зарубіжної селекції достатньою мірою не реалізуються [3].

Як вказують В.П. Буркат, А.П. Кругляк, необхідно розробити програму реформування системи селекції в стадах з різними формами власності, яка буде ґрунтуватися на породних принципах управління селекційним процесом і апробованих світових системах обліку та оцінки тварин [8].

Б.А. Агафонов та ін. вважають, що процес селекції є нескінченим ланцюгом двох прийомів, які чергуються – відбору та підбору, і ця проста схема принципово не змінюється, не зважаючи на будь-які зміни техніки та технології розведення тварин. Удосконаленню підлягають лише методи оцінки племінних тварин, які визначають ефективність відбору та підбору.

Н. Stalhammer, В. Lindhe, L. Barstrom, Л.К. Ернст, М.З. Басовський, М.З. Басовський, М.З. Басовський, В.І. Власов, М.З. Басовський, І.А. Рудик, В.І. Власов розглядають можливість застосування методів популяційної генетики, моделювання процесів селекції сільськогосподарських тварин. Це дає змогу створити більш точні методи оцінки генотипу тварин [8].

М.З. Басовський, В.І. Власов, В.П. Коваленко та ін., Ю.П. Полупан вважають, що новим потужним імпульсом для використання методів популяційної генетики є можливість застосування сучасних ЕОМ для збору, збереження і аналізу генетичної інформації в племінних стадах. Оцінка генотипу, що ґрунтується на методах популяційної генетики, є дуже важливою, але лише з одного боку селекції, з іншого – це відбір

бажаних генотипів, їх швидке розповсюдження в популяціях. Вітчизняний і зарубіжний досвід свідчить, що там, де систематично проводиться оцінка за якістю нащадків, удосконалення породи відбувається швидше [8].

А.А. Amin, S. Toth, T. Gere, S. Gere, Л.К. Ернст, В.П. Буркат, А.П. Кругляк, Л.К. Ернст, В.А. Чемм вважають, що перспективу розвитку селекції сільськогосподарських тварин повинна вирішувати також біотехнологія на рівні клітинної та генної інженерії.

На базі інтеграції методів популяційної генетики, системи ЕОМ, нових методів штучного осіменіння і тривалого збереження сперми плідників, методів біотехнології було створено систему великомасштабної селекції. М.З. Басовський, В.П. Буркат, В.І. Власов, В.П. Коваленко зазначають, що розроблення її принципів і методів дозволило перетворити селекцію молочної худоби у злагоджену науково обґрунтовану систему, що забезпечить підвищення ефективності селекції в 2–3 рази, а також сприятиме високим темпам покращення генофонду молочних порід худоби. Основою для перебудови порід є великомасштабна селекція, теоретичні та практичні основи якої відображені в роботах вітчизняних вчених і ряду зарубіжних дослідників [2, 3, 8].

Впровадження великомасштабної селекції для удосконалення молочних порід викликало сумнів у деяких вчених щодо доцільності і ефективності розведення за лініями. З цього приводу у вітчизняній науковій літературі була проведена дискусія, результатом якої виявилось визнання доцільності розведення за лініями. Беручи до уваги думку ряду вчених, можна зробити висновок і про те, що кількість ліній в тій чи іншій породі визначається чисельністю, віком, ареалом та рівнем заводської досконалості породи. Вказаний метод лінійного розведення дозволяє розподілити породу або внутріпородний тип молочної худоби на окремі цінні структурні групи тварин і планувати систему підбору в товарному тваринництві, який виключає стихійний інбридинг [8].

Результати досліджень багатьох авторів свідчать, що підвищення генетичного потенціалу продуктивності порід за умов чистопородного розведення знаходиться в межах 1,0–1,5% за рік або 40–50 кг. Головною причиною низької ефективності селекції, на думку авторів, є недостатньо жорсткий відбір плідників за якістю нащадків. З такими темпами удосконалювати породу з метою підвищення генетичного потенціалу необхідно не менше 20-ти років. У зв'язку з цим П.Н. Прохоренко, М.Г. Дмитрієв вважають, що прискорити підвищення продуктивності

тварин у 2-3 рази можливо, застосовуючи міжпородне схрещування з кращими спеціалізованими породами світу. За результатами схрещування корів чорно-рябої породи з голштинськими бугаями середньорічний генетичний тренд за надоєм склав 103 кг і молочним жиром 3,6 кг, що перевищує аналогічні показники результатів чистопородного розведення відповідно в 2,3 та 2,6 рази. У помісних тварин, як стверджують Д.Т. Вінничук і В.О. Пабат, значно поліпшуються екстер'єрні показники та ін. В.Б. Близниченко та інш., М.В. Кононенко, В.М. Зубец, В.П. Буркат, аналізуючи результати використання світового генофонду порід для покращення червоної степової худоби, дійшли висновку, що ефективніше використовувати червоно-рябих голштинів. Наступною за ефективністю є червона датська порода і незначне збільшення продуктивності одержано від помісей з англєрськими бугаями [8, 11].

Результати досліджень деяких авторів доводять, що одночасно з поліпшенням продуктивних якостей міжпородне схрещування підвищує життєздатність і довголіття тварин. Проте Ю.Д. Рубан, В.Б. Близниченко вказують, що в умовах, коли широко застосовується схрещування місцевого генофонду з іноземним, необхідна система селекційної роботи, яка передбачає удосконалення існуючих та створення нових порід і типів тварин, збереження цінних вітчизняних порід і типів тварин [8, 16].

У цілому, слід зазначити, що відповідно до Закону України “Про племінне тваринництво” при розробленні програм збереження і використання генофонду слід враховувати всі складові селекційного процесу. До них належать:

1) збереження генофонду традиційних локальних порід та його розширення за рахунок індивідуального відбору пар на основі імуногенетичного тестування;

2) реконструкція існуючого генофонду з використанням генних комплексів найкращих світових поліпшуючих порід (створені таким чином масиви високопродуктивних тварин слід типізувати і консолідувати в нові породи, типи і лінії);

3) розроблення породних технологій вирощування і використання племінних тварин.

4) вивчення закономірностей індивідуального розвитку тварин як критеріїв оцінки їх племінної цінності;

5) врахування ефекту взаємодії “генотип–середовище” [8, 11].

Останнім часом досить часто висловлюється стурбованість щодо збереження генофонду сільськогосподарських тварин. Констатується, що одночасно зі створенням ряду нових порід заміна місцевих порід відселекціонованими за певним напрямком продуктивності призвела до різкого зменшення поголів'я вітчизняних порід, які, звичайно, не можуть конкурувати зі спеціалізованими породами. Проте вони залишаються носіями цінних спадкових якостей та інших комплексів, без яких подальший породотворчий процес був би однобічним. Зникнення кожної з порід приводить до безповоротної втрати генів, що зумовлюють різноманітність господарсько корисних ознак. Тому потрібна національна програма збереження та раціонального використання вітчизняного генофонду. В той же час, як вказують В.І. Глазко та Е.І. Семенова, науково-технічний процес та перехід на інтенсивний розвиток тваринництва приводять до звуження породної різноманітності і заміни місцевих порід на вузькоспеціалізовані та високопродуктивні [3, 11, 16].

Таким чином, подальше генетичне поліпшення сільськогосподарських тварин буде ефективним при створенні для порід умов відкритої популяції, де з однаковим успіхом можуть застосовуватися як чистопородне розведення, так і міжпородне схрещування. Але тварини мають відповідати розробленим стандартам продуктивності та типу будови тіла. Отже, створилася об'єктивна необхідність у розробленні великомасштабних заходів щодо перетворення генофонду порід тварин. На думку М.І. Гиль та В.П. Коваленка, на найближчу перспективу одним із основних напрямів науково-технічного прогресу в тваринництві стане розроблення і практична реалізація методів збереження генофонду, використання стабілізуючого та корекція дії природного відборів, обґрунтування оптимальної частки спадковості за поліпшуваними породами, розроблення системного генетико-селекційного моніторингу внутріпопуляційних процесів у тваринництві, перетворення існуючих порід за якістю продукції [8].

При розгляді питань породоутворення слід завжди враховувати зміни соціально-економічних умов у сільському господарстві, які зумовлюють необхідність перетворення генофонду існуючих порід відповідно до нових умов. В Україні розроблено і впроваджено в господарствах теорію породоутворення, найбільший вклад в яку зробили академік М.Ф. Іванов, професори П.М. Кулешов, Х.Ф. Кушнер, Н.А. Кравченко, Ф.Ф. Ейснер, А.Е. Яценко. Але починаючи з другої половини ХХ століття, у зв'язку з

інтенсифікацією сільськогосподарського виробництва, породотворний процес був спрямований на спеціалізацію тваринництва. Це зумовило розроблення нової теорії породоутворення. Її основою є відхід від догмату породи, а використання більш складної структурної одиниці селекції – синтетичних популяцій, що включають тварин, отриманих як від чистопородного розведення, так і від різних форм породоперетворюючих і породополіпшуючих схрещувань. При цьому введено поняття “умовна кровність” для особин, що відповідають цільовому стандарту породи, типу, лінії родини, що створюється. Як вказують автори новітньої теорії селекції М.В. Зубець, В.П. Буркат, М.Я. Єфименко, Ю.П. Полупан, А.П. Кругляк, її теоретичний фундамент ґрунтується на двох методологічних підходах – теоретико-множинному і системному. На їх думку, нове бачення породи як складної, динамічної, відкритої біологічної системи спонукало відмовитись від поняття “чистота породи”, що неминуче призводить до однієї з двох крайностей: або до застою і втрати темпів генетичного прогресу, або до схрещування, що доходить до безсистемного, забуття лайнбридингу, хоча все це й проходить під знаком чистопородного розведення. Основними засадами теоретичної концепції породоутворення є:

- 1) радикальна реконструкція наявного генофонду із якнайширшим залученням кращого у світі селекційного матеріалу;
- 2) розроблення сучасних методів одержання “на замовлення”, вирощування, випробування, оцінка і використання плідників;
- 3) опрацювання методів ідентифікації та об’єктивної незалежної оцінки фенотипу – і генотипу племінних тварин;
- 4) розробка нових стандартів росту для ремонтного молодняку, відповідних систем і схем його вирощування;
- 5) збереження генофонду традиційних локальних порід через визначення господарств-резерватів, спермо-, – ембріо – та генобанків;
- 6) нові аспекти використання кросбридингу та інбридингу при виведенні порід і типів сільськогосподарських тварин;
- 7) теоретичне обґрунтування створення синтетичних популяцій і ліній;
- 8) започаткування нової для тваринництва науки – біотехнологічної селекції і теоретичне визначення основних її напрямків;
- 9) використання інтер’єрних тестів для прогнозування продуктивності тварин [8].

Теорія породоутворюючого процесу, що розглядається, базується на ряді концепцій, серед яких є обґрунтування найбільш оптимальних селекційних програм та селекційно-генетичний моніторинг мікроеволюційних процесів й управління ними [8, 16].

За С.І. Боголюбським, селекційна програма – це всебічно обґрунтований комплекс робіт з виведення та удосконалення ліній, родин, типів, порід тварин і птиці. Вона включає визначення мети селекції, вибір вихідного матеріалу і методу розведення, генетичний аналіз одержаних селекційно-значимих форм та закладку і виведення ліній та родин, формування генеалогічної структури типів, порід, що створюються.

Дані останніх років вказують, що основним критерієм вибору селекційних програм є визначення типу успадкування ознак [11]. Встановлено, що при адитивному типі успадкування батьківські форми повинні бути контрастними за основною селекційною ознакою. Так наприклад, в молочному скотарстві, як свідчать дослідження Ю.Ф. Мельника [11], молочна продуктивність чорно-рябої породи підвищується (при використанні голштинських плідників) переважно під дією адитивного типу успадкування (за надоем) і прояву материнського і гетерозисного ефекту (за вмістом жиру в молоці). Крім того, в умовах, що сприяють реалізації високого рівня генетичного потенціалу, величина адитивних ефектів значно збільшується, а гетерозисний ефект суттєво зменшується. Тому при розробленні селекційних програм удосконалення української чорно-рябої породи доцільно передбачити підбір контрастних за ознаками “надій за лактацію” як окремих особин, так і їх груп, що використовуються в міжлінійних кросах в межах породи. При неадитивному типі успадкування ознаки головним є не контрастність батьківських пар, а їх поєднуваність, тобто  $g.c.s.$  і  $s.c.s.$ , які зумовлюють прояв ефекту гетерозису. По цьому типі успадковуються відтворні, адаптивні якості худоби, тому селекційні програми повинні враховувати підбір поєднаних батьківських пар. Взагалі для ознак з низькою успадкованістю ( $h^2 = 0,05-0,15$ ) підвищення відтворних якостей і життєздатності, на думку Ф.В. Ільєва, може досягатися на шляхах контрольованої гетерозиготності [8].

Як вказують В.П. Бородай, В.П. Коваленко, у тваринництві можуть бути використані такі три концепції підбору батьківських форм: 1) концепція лінії (породи); 2) концепція ознаки; 3) концепція гена. Розглянуті концепції забезпечують ведення селекційної роботи з

урахуванням трьох основних рівнів організації біосистем – популяційного, організменного і клітинного.

За визначенням Н.З. Басовського, П.Н. Прохоренка та В.Є. Кузнєцова, програми селекції повинні бути побудовані на виборі мети, системи і критеріїв селекції, оцінці біологічних, селекційних і економічних параметрів, методах прогнозу ефекту селекції, генетико-статистичній моделі визначення племінної цінності, комп'ютерних програмах для їх реалізації, узагальненого аналізу і відбору найкращого варіанту для впровадження. У зв'язку з цим досить застережливими є обґрунтовані рекомендації професорів Ю.Д. Рубана, Д.Т. Винничука, В.В. Мирося [45] та інших учених, що однобічна селекція на максимальну продуктивність тварин викликає зниження їх стійкості до захворювань та зменшення тривалості продуктивного використання. Тому особливого значення набувають вибір ознак для оцінки тварин та перехід до комплексних індексів селекційних показників [8].

Ефективність селекційних програм і у кінцевому значенні всіх генетико-селекційних заходів залежить від ступеня генетичної мінливості тварин, точності оцінки племінної цінності та інтенсивності відбору і відображення темпу генетичного поліпшення продуктивності тварин [16].

Слід зазначити, що пріоритет у розробленні альтернативних варіантів програм селекції належить науковцям США – С. Smith, L. Gilliard, L.E. Dickerson, L.H. Hazel, I. Rendel, A. Robertson, а в застосуванні електронно-обчислювальної техніки – Н. Skjervold, В. Lindhe. Вони вперше зробили висновок, що максимальний генетичний прогрес досягається осіменінням спермою молодих плідників 30-50% активної частки популяції та співвідношенням відбору плідників, яких оцінено за показниками власної продуктивності і якості потомства – 1:10. А науковці університету штату Техас (США) визначили вплив кількості поколінь потомків на економічний ранг плідників. Відношення загального чистого прибутку при виробництві продукції до генетичного вкладу плідників склало в п'яти поколіннях нащадків – 55, 75, 91, 96 і 98%. Величина кореляції між прибутком за I і II покоління потомків склала 0,95, а II і III – 0,99 [8].

Е. Cunningham, I. Cleaves стверджують, що селекційні програми, які спрямовані на максимальне зростання величини надою завдяки використанню значної кількості бугаїв, оцінених за якістю потомства, можуть бути ефективними. Тому раціональним є осіменіння 20% поголів'я



маток спермою молодих плідників з метою одержання пересічно на одного бугая 40 дочок із закінченою першою лактацією та інтенсивністю відбору 1:4. Більш деталізовані дослідження, які проводили датські вчені, свідчать, що при вибракуванні за енергією росту 80% ремонтних бугайців генетичний прогрес популяції зростає на 1,56% молочного жиру, а за середньодобовими приростами живої маси – на 0,42% [8, 16].

Сучасні методичні підходи щодо розробленні селекційних програм, зокрема елементів (принципів) синтетичної теорії в молочному скотарстві розглянуто в дослідженнях Ю.Д. Рубана. Запропонована синтетична теорія селекції тварин тандемно включає основні елементи зоотехнічної роботи для створення бажаного типу тварин. Аналіз літературних джерел й узагальнення результатів процесу породоутворення в тваринництві України дозволяє, на наш погляд, виявити такі основні тенденції селекційно-генетичних досліджень: 1) розроблення концепції створення селекційних програм за видами тварин; 2) пошук методів розширення спадкової мінливості популяцій, стад, ліній для створення нових селекційних форм; 3) детальне вивчення співвідносної мінливості ознак, їх регресії для розроблення прийомів відбору за комплексом ознак, у тому числі й тих, які негативно корелюють; 4) широке використання закономірностей мінливості ознак під дією стабілізуючого відбору для консолідації виведених і нових ліній, а також споріднених форм, що створюються; 5) оцінка адаптивної здатності популяцій, де здійснюється селекція за параметрами пластичності (середовищна чутливість) і стабільності; 6) моделювання основних господарсько корисних ознак; 7) розроблення нових підходів оцінки типологічних особливостей тварин перспективного і резервного генофонду [8, 11].

Таким чином, проведений моніторинг наукових концепцій та досліджень свідчить про достатню різноманітність селекційно-генетичних програм з породами різних країн і континентів, але головним їх критерієм залишається величина селекційного прогресу та прибутковість, тимчасом як основним базисом – генетико-популяційні методи та їх досконалість.

## Тема № 3

### Використання QTL-генів

Одним із досягнень сучасної генетики є відкриття поліморфних генетичних систем у сільськогосподарських тварин, які «зчеплені» з бажаними ознаками молочної продуктивності. Дуже важливим є отримання тварин із заздалегідь запрограмованою продуктивністю, наприклад: молоко корів, що має високий вміст білку – є більш бажаним в технології сироваріння. Це стає можливим завдяки саме генетичним маркерам за допомогою яких на рівні білків, або на рівні ДНК і РНК можна виявити гени, поліморфізм яких асоційований з бажаними ознаками молочної продуктивності. Основним методом у здійсненні даної оцінки виступають ДНК-маркери за допомогою яких на рівні алельних варіантів генів можна визначити генотип тварин та передбачити їх продуктивність незалежно від їх фізіологічного стану, віку інколи й статі [5].

Так, прийнято вважати, що економічно найбільш ефективним є використання молекулярно-генетичних маркерів у роботі із племінними тваринами у процесі оцінки їхньої племінної цінності з урахуванням підбору відповідних варіантів схрещувань.

У прискоренні вдосконалювання молочної продуктивності спеціалізованих порід великої рогатої худоби виділяють два основних напрямки використання молекулярно-генетичних маркерів. Один з них – картування хромосом великої рогатої худоби щодо виявлення головних генів молочної продуктивності (*Quantitative Trait Loci – QTL*). Передбачається, що картування QTL може призвести до формування принципово нового етапу в селекції – селекції за допомогою маркерів (MAS). У той же час, аналіз накопичених даних за результатами такого прийому оцінки свідчить про їхню крайню суперечливість. Наприклад, картування QTL головних ознак молочної продуктивності (надою, кг, вмісту жиру й білку в молоці, %) у тварин однієї й тієї ж голштинської породи виявило різну локалізацію таких генів у хромосомах залежно від країни, де виконувалися дослідження. Очевидно, що результати таких досліджень будуть істотно залежати від специфіки генофондів розглянутих порід тварин, а також від факторів навколишнього середовища, у яких вони відтворюються.

Можливість цілеспрямованого створення високопродуктивних груп тварин великою мірою залежить від наявності інформації про гени, що контролюють ознаки продуктивності. На цей час уже ідентифіковані

окремі гени з вираженими фенотиповими ефектами дії, що приводять, наприклад, до м'язової гіпертрофії в худоби й свиней, пов'язаних з підвищеною чутливістю свиней до стресу або багатоплідністю в овець. Проте здебільшого ознаки продуктивності тварин є кількісними і полігенними за механізмом формування. Багаточисленні дослідження зосереджені на пошуках “головних” генів таких кількісних ознак, поліморфізм за якими вносить визначальний вклад у їх розвиток. Ідентифікація таких генів пов'язана із значними труднощами, оскільки на даний час недостатньо вивченими залишаються генетичні механізми формування кількісних ознак [5, 6].

Поряд з традиційним методом відбору тварин, селекція з використанням маркерів сприяє направленому формуванню генофондів із потрібними генними поєднаннями, що супроводжується зниженням економічних витрат на виробництво продукції. Разом із тим, ефективність використання молекулярно-генетичних маркерів у селекційній роботі істотно залежить від вибору останніх і ознак, у контролі розвитку яких вони приймають участь, а також від селекційного завдання, що вирішується [5].

За даними К.В. Копилової, М.І. Гиль існує два основних напрямки пошуку «головних» генів кількісних ознак [5, 15]. Метод ДНК-маркування – це виявлення ДНК-поліморфізму за допомогою рестрикційного аналізу – «поліморфізм довжини рестриктних фрагментів». Метод ПДРФ-маркерів має перевагу завдяки менделівському типу успадкування, кодомінантності прояву, відсутності плейотропного ефекту та високому поліморфізму. Інший метод ґрунтується на виявленні високоваріабельних послідовностей, що містять тандемні повтори сателітної ДНК – мінісателітної і мікросателітної. Визначення міні- і мікросателітної ДНК проводять з використанням «полімеразної ланцюгової реакції», що також дає можливість проведення аналізу її поліморфізму за кожним, окремо обраним локусом [7]. У зв'язку з підвищеними вимогами до якості молока виникає потреба використання в селекційній роботі генетичних маркерів пов'язаних з ознаками молочної продуктивності. У великої рогатої худоби встановлено найбільшу кількість таких генетичних маркерів, що відкриває широкий спектр можливостей прогнозувати і покращувати продуктивність тварин [7].

До цих генів належать білки та гормони молока, наприклад, *κ*-казеїн (*CSN3*) – який пов'язаний з вмістом білку в молоці, його технологічними

властивостями, якістю та виходом білкововмісних продуктів, оскільки виконує роль стабілізуючого фактору в утворенні міцел [5, 7, 15] та  $\beta$ -лактоглобулін (*BLG*) – крім того, що бере участь у синтезі білків молока, є важливою ланкою в селекційному процесі оскільки має суттєвий вплив на створення активного імунітету у телят, тим самим підвищує збереженість молодняку, лептин (*LEP*) – синтезуючись в адіпоцитах, відповідає за регуляцію маси тіла тварини, споживання нею корму та її жирові відкладення, а також бере участь у синтезі жирів молока і соматотропін (*GH*), який крім соматичного регулятора росту тварини володіє лактогенною, інсуліноподібною, діабетогенною, жиромобілізуючою і нейротропною діями [5, 7].

Продукт ампліфікації гена *CNS3* праймерами включає ділянку 4-го екзону й 4-го інтрону гену. Після рестрикції цього фрагменту рестриктазою *Hind III* виявляються два алельні варіанти *A* та *B*. Варіант *B* гену *CSN3* характеризується наявністю двох крапкових мутацій, у положеннях 136 і 148, що викликають амінокислотні заміни *Tyr* на *Iso* та *Ala* на *Asn*. Присутність алельного варіанта *B* локусу *CSN3* істотно поліпшує якість твердих сирів. *BB*-генотип спричиняє на 5-10% більший вихід сиру, ніж *AA*-генотип. Виявляється тісний зв'язок між поліморфізмом молочного білка й сичужним зсіданням молока. Осадження молока від корів з генотипом *CNS3-AA* під впливом сичужного ферменту триває довше, ніж осадження молока від корів з генотипом *AB* і особливо із *BB*-генотипом. Присутність алелі *B* у локусі  $\kappa$ -казеїну – економічно важлива для сировиробництва селекційна ознака у великої рогатої худоби, що має спеціалізацію в молочному напрямку продуктивності. Спрямоване формування стад коровами, які є носіями цього алелі з метою забезпечення сировиробництва, могла б сприяти більш повному використанню генетичного потенціалу тварин. Це особливо важливо у зв'язку з тим, що в молочних порід великої рогатої худоби, зокрема, у голштинської, і отриманими з її використанням як поліпшуючої породи, виявляється низька частота алельного варіанту *CNS3-B* [5, 7, 15].

Дослідження іншого структурного гену –  $\beta$ -лактоглобуліну (*BLG*) – білок, який, на відміну від казеїнів, не осаджується сичужним ферментом, не входить до структури міцел і є сироватковим білком. Біологічна функція *BLG*, як передбачається, пов'язана із транспортом вітаміну А. Цю гіпотезу підтверджує відкриття рецепторів для комплексу *BLG* і ретинолу в

кишечнику новонароджених телят, що сприяє засвоєнню ліпідів. Ген *BLG* має розмір 4662 п.н. і складається з 7 екзонів і 6 інтронів.

Відносно локусу *BLG*, то ділянка ампліфікації довжиною 247 п.н. включала фрагменти 4-го екзону й 4-го інтрону. Алель *BLG-A* несе один сайт рестрикції для рестриктази *Hae III*, який веде до формування двох фрагментів рестрикції 148 і 99 п.н., а *BLG-B* у ділянці довжиною в 148 п.н. має додатковий другий сайт рестрикції *Hae III* і після рестрикції спостерігається формування трьох фрагментів: одного довжиною 99 і двох фрагментів з довжиною 74 п.н. Варіант *BLG-B* відрізняється від *A* наявністю двох крапкових мутацій, що приводять до амінокислотних заміни *Asn* → *Глу* й *Val* → *Ала* в положенні 64 і 118, відповідно. Експресію варіанту *B* пов'язують із високим вмістом у молоці казеїнових білків, більшим відсотком жиру й кращими параметрами казеїнового коагуляту. Варіант *A* контролює високий вміст сировоткових білків і сумарний вміст білків молока. У молоці корів з генотипом *AB* спостерігається наявність обох алельних форм *BLG* з перевагою форми *A* [5].

Наступний структурний ген продукує гормон росту (*GH*), який, у свою чергу, складається з п'яти екзонів і чотирьох інтронів, загалом це більше 2 т.п.н. У великої рогатої худоби ген гормону росту локалізований у 19-ій хромосомі. У цього виду були ідентифіковано окремі мутації в гені гормону росту [7]. Надано характеристику основних алельних варіантів цього гена у великої рогатої худоби, що виникли завдяки нуклеотидним замінам у різних районах гену. Особлива увага приділяється нуклеотидній заміні в 5 екзоні кодону лейцину (*CTG*) на кодон валіну (*GTG*) у положенні 127 поліпептидного ланцюгу, що приводить до появи алельних варіантів *A* та *B*. Ці алелі виявляються за допомогою рестриктази *Alu I* і позначаються як алель *L* (лейцин) і *V* (валін).

*GH* є системним регулятором фундаментальних біохімічних процесів, що лежить в основі загального обміну у всіх тварин. У ссавців описана його лактогенна активність. Відомо, що введення екзогенного *GH* стимулює ріст і розвиток молочної залози й збільшує вихід молока в корів на 10-40%. Виявлено також, що при цьому знижується рівень жиру й збільшується кількість м'язової тканини в туші. Тому не дивно, що *GH* викликає такий великий інтерес як маркер ряду характеристик продуктивності тварин. Особливу увагу приділяється поліморфізму алелів *L* і *V*, оскільки було доведено, що молоко корів з генотипом *LL* містить більший відсоток жиру й білку, ніж у тварин з генотипом *VV* [5, 7].

Структурний ген який відповідає за синтез гормонального білка – лептин. Цей гормон регулює жирові відкладення в організмі, а також впливає на багато інших фізіологічних процесів, наприклад стимуляцію статевого дозрівання, метаболізм глюкози, літогенез, ліполіз і термоліз. Дослідники знайшли понад 20 поліморфних сайтів, з яких тільки шість знаходяться в екзонах, і лише два з них призводять до амінокислотних замін. Аналіз поліморфізму за локусом *LEP* проводять шляхом оцінки довжин рестрикційних фрагментів, одержуваних після обробки продукту ампліфікації (1830 п.н.) рестриктазою *Sau3AI* [5].

За локусом лептину виявлено три генотипи. Для генотипу *AA* продукти рестрикції становлять 740, 690, 400 п.н., для генотипу *AB* – 740, 690, 310 п.н., а для *BB* – 740, 470, 220 п.н.

Встановлений зв'язок поліморфізму сайтів рестрикції з «оплатою» корму в тварин. Існують дослідження, які свідчать, що алель *T* гену лептину бажаніший, ніж алель *S*, оскільки перший асоційований з підвищеним вмістом жиру і білка в молоці [5].

Таким чином, результати численних досліджень свідчать про те, що розподіл алельних варіантів за дослідженими структурними генами й асоціації між ними, які контролюють господарсько цінні ознаки, можуть розглядатися у порід худоби молочного і комбінованого напрямку продуктивності як додаткові породні характеристики, а їхнє формування, визначається особливостями штучного відбору, відповідно до напрямку продуктивності корів та селекційно-племінної роботи з ними.

## Тема № 4

### Геномна селекція (SNP-маркери)

Протягом останніх років методи прямого дослідження поліморфізму послідовностей ДНК набули великого поширення і майже витіснили із популяційної генетики дослідження білкового поліморфізму [5, 6].

Як відомо, в основі усіх типів поліморфізму ДНК лежать зміни, які викликані всіма можливими замінами пар основ і перебудовами послідовності ДНК – інсерціями, делеціями, транспозиціями, дуплікаціями, інверсіями, транслокаціями.

Одним із загальних недоліків у використанні ДНК-маркерів є функціональна “анонімність” як самої нуклеотидної послідовності, так і її поліморфізму. Це дало поштовх для розвитку нової області досліджень – “зворотньої” генетики, яка базується на визначенні функціонального значення поліморфізму будь-якої ділянки ДНК [4].

Поліморфізм ДНК може бути предметом самостійного вивчення, зокрема дослідження еволюції ДНК (її факторів, швидкості), закономірностей мінливості та успадкування варіантів послідовностей ДНК у популяціях і філетичних лініях. В основному ж він використовується як засіб маркірування гена, ділянки ДНК, хромосоми, геному, організму, популяції, виду у вирішенні різних проблем. Як основні методи геномної селекції можна виділити наступні:

- генетичне картування;
- оцінка генетичного поліморфізму (гетерозиготність популяції, мікроеволюція);
- ДНК-типування (фінгерпринтинг-дактилоскопія, каріотипування) організмів, популяцій, видів;
- філогенія і таксономія організмів;
- використання у селекції.

Існує цілий ряд сучасних технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК, серед яких можна виділити наступні:

- аналіз поліморфізму довжин рестриктних фрагментів ДНК (ПДРФ);
- аналіз поліморфізму випадково ампліфікованої ДНК;
- “адресована” полімеразна ланцюгова реакція;
- аналіз поліморфізму послідовності ДНК [3, 4, 5].

*Поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів* (ПДРФ, відома аббревіатура RFLPs – restriction fragment length polymorphisms) заснований

на наявності чи відсутності сайту розпізнавання для рестриктаз у досліджуваному фрагменті ДНК. Вперше аналіз RFLP був застосований для ідентифікації температурно-чутливої мутації в геномі аденовірусу у 1974 р. [4]. Проте широкого застосування у генетичних дослідженнях методика набула з 1980 р. після роботи С. Ботштейна та співавторів, у якій були вивчені властивості RFLP як генетичного маркера і теоретично обґрунтовані напрями його використання. Авторами метод був успішно застосований для картування геному людини.

Оцінка RFLP може бути здійснена різними способами, але найбільш традиційним є метод з використанням блот-гібридизації. Як гібридизаційні зонди при дослідженні внутрішньовидового RFLP використовують клоновані із геномних бібліотек або синтезовані послідовності. Генетичні RFLP-маркери дозволяють отримувати детальні генетичні карти на основі невеликої кількості схрещувань, а в деяких випадках сегрегація досягається вже після одного схрещування. Використання цього методу дало змогу у короткі строки суттєво заповнити генетичні карти людини, різних видів тварин і рослин [4].

Проте метод має певні недоліки, які обмежують можливості його застосування у широкомасштабних дослідженнях на популяційному рівні:

1) необхідність відповідного забезпечення ДНК-зондами для достовірного аналізу відмінностей на внутрішньовидовому рівні, перш ніж скринінг різноманітності може бути дійсно проведений;

2) необхідність відносно великої кількості високоочищеної ДНК;

3) неповна пенетрантність алельних варіантів при роботі з ознаками продуктивності;

4) наявність мінливості негенетичної природи;

5) складнощі локалізації алельних варіантів відносно структурного гена [241, 275, 370].

Більш перспективним є використання як гібридизаційних проб високоваріабельних ділянок ДНК, відомих як міні- та мікросателітні локуси (VNTR – variable number of tandem repeats). Цей метод реалізований у роботах G. Jeffreys і отримав назву фінгерпринту (відбитків пальців) [4, 6].

У геномах ссавців різних видів кількість сателітної ДНК може значно відрізнятись: від кількох відсотків у людини до більше половини ДНК у кенгурового щура. У представників підродини козлоподібних (*Caprinae*) сателітна ДНК займає більше 10% геномної ДНК. У бичачих (*Bovinae*)



сателітна ДНК складає біля 25% геному. Вихідним предком цих сателітних ДНК є послідовність довжиною 23 п.н., яка піддавалась кільком етапам дуплікації і ампліфікації, влаштуванню інсерційних елементів, перегрупуванням отриманих послідовностей і новим серіям ампліфікації. Спільність походження різних родин сателітної ДНК у представників *Bovidae* виявляється за порівняльного аналізу первинних послідовностей клонованих сателітів [4].

Мінісателітною ДНК називають ділянки ДНК розміром 10–70 пар нуклеотидів. Поліморфізм мінісателітної ДНК був описаний на початку 80-их років при виділенні із геному людини гіперваріабельної анонімної ділянки ДНК, яка мала у популяції 8 алелів. Надалі такі послідовності були виявлені і в геномах інших ссавців: миші, щура, свині, собаки. Мінісателітні послідовності описані також у інших класах і царствах: птахи, риби, комахи, рослини і мікроорганізми. Мінісателітні локуси розподіляються по всьому геному і локалізовані на всіх хромосомах людини і сільськогосподарських тварин [3-5].

Поліморфізм мікросателітної ДНК обумовлений різною кількістю тандемних повторів – одно-, двох-, трьох-, чотирьохнуклеотидних.

На даний час їх поліморфізм описаний для широкого кола господарів: людини, собаки, коня, великої рогатої худоби, вівці, свині, лосося. Загалом прості повтори розподіляються по геному у наступних відношеннях: однонуклеотидні – 27,3%, динуклеотидні – 30,3%, тринуклеотидні – 5,1%, чотиринуклеотидні повтори – 27,3%. Завдяки високому поліморфізму даний підхід є зручним інструментом для аналізу внутрішньо- і міжпопуляційної мінливості, а також для визначення генетичних відстаней між групами організмів.

Передбачається, що поліморфізм мікросателітних локусів нейтральний до факторів відбору, до подій еволюційного рангу і оптимально відповідає вирішенню завдань об'єктивної оцінки генетичних взаємовідносин між генофондами, а також маркірування різних ділянок геному (картування).

VNTR-алельні варіанти мають кодомінантний характер успадкування, проте ці маркери у ряді випадків виявляються занадто мультилокусними (а їх локуси – мультиалельними) і отримані спектри є дуже складними для аналізу. Тому для обробки даних за класичною генетичною схемою необхідні спеціальні статистичні прийоми, що вкрай ускладнює завдання і робить точність аналізу спорідненості проблематичною.

*Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)* – це метод багатоциклічного спрямованого синтезу (ампліфікації) ДНК *in vitro* з допомогою термостабільної ДНК-полімерази.

Метод ПЛР дає змогу вибірково синтезувати *in vitro* відносно невеликі ділянки ДНК довжиною від декількох десятків до декількох сотень пар нуклеотидів, рідше до 1000–2000 п.н., використовуючи як матрицю будь-які зразки ДНК – геному ДНК окремих індивідумів, різних видів про- та еукаріот, ДНК, виділену із культур клітин, бактеріальних клонів, бібліотек генів чи інших джерел [84, 302]. Метод ПЛР набув поширення у багатьох галузях, таких як мутагенез ДНК *in vitro*, генетичний фінгерпринтинг, пряме секвенування геномної ДНК і кДНК, визначення присутності інфекційних агентів, діагностика статі передімплантаційних ембріонів, пренатальний діагноз спадкових захворювань, аналіз різних алельних варіантів ДНК тощо [4, 5].

Розроблено декілька методів на основі ПЛР для отримання молекулярних маркерів. Насамперед використовується поліморфізм за довжиною і структурою ампліфікованої у полімеразній ланцюговій реакції ДНК (відома абревіатура – ASPs – amplified sequence polymorphisms). Аналізу і порівнянню підлягає ДНК розмірами до декількох тисяч пар нуклеотидів.

Ампліфікація конкретних генетичних локусів базується на попередньому виявленні їх первинної нуклеотидної послідовності. Обійти це обмеження дозволила розробка методів ПЛР з довільними праймерами, в яких замість двох праймерів використовується один. При цьому відбувається ампліфікація послідовностей ДНК, які обмежені однаковими, комплементарними цьому праймеру ділянками. Різні праймери, розміри яких становлять 5–15 нуклеотидів, виявляли як консервативні, так і поліморфні локуси ДНК. Ампліфікація поліморфної ДНК з використанням такого типу праймерів здобула назву RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA – випадково ампліфіковані послідовності ДНК) [4].

Картина електрофоретичного фракціонування продуктів ампліфікації виявилась видоспецифічною. Для бактерій це, як правило, унікальні чи низькокопійні локуси, для грибів, рослин та інших еукаріот – повторювана ДНК. Застосування цього методу дало можливість дослідити анонімні поліморфні локуси найрізноманітніших таксономічних груп. Найширшого застосування метод RAPD-PCR набув у бактеріології: при ідентифікації,

діагностиці і систематиці мікроорганізмів – збудників інфекційних захворювань.

Щодо застосування методу для вивчення геномів представників фауни, то це, в основному, комахи, риби, рептилії і парнопалі.

У випадках дослідження організмів, геном яких вивчений більшою мірою, можливе застосування довільних праймерів для побудови карт окремих хромосом і маркірування кількісних ознак. Так, наприклад, був виявлений локус високого росту *hg* (*high growth*) на 10-тій хромосомі миші, встановлено зчеплення ізозимних маркерів з 43 маркерами RAPD-PCR геному риб родини *Xiphophorus*.

Проте дана технологія має ряд обмежень. По-перше, маркери RAPD-PCR ведуть себе як домінантні та їх гетерозиготний стан не відрізняється від гомозиготного. По-друге, присутність в RAPD-спектрах смуг з близькою молекулярною масою не завжди може трактуватись як ампліфікація одного й того ж фрагмента ДНК, ці смуги можуть бути утворені кількома продуктами ампліфікації, які мігрують сумісно. З причин м'яких умов ампліфікації відтворюваність результатів низька. До того ж ускладнена інтерпретація результатів досліджень геномів, які містять нехромосомну ДНК (плазміди, фаги) – утворюються додаткові (неспецифічні) продукти ампліфікації.

Поєднання принципів RFLP і RAPD-аналізу дало початок новому методу – *поліморфізму довжин ампліфікованих фрагментів*, відома аббревіатура AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) [4]. Порівняно з RFLP даний метод має важливу перевагу – для його використання не потрібно знати ні первинної послідовності ДНК, ні нуклеотидної послідовності праймерів. Метод включає три етапи: рестрикцію і зв'язування ДНК, PCR-ампліфікацію і аналіз гелю. На першому етапі геномна ДНК розщеплюється ферментами рестрикції. Олігонуклеотидний праймер зв'язується ДНК-рестриктими таким чином, що місцем зв'язування виступає сайт рестрикції. Утворення ДНК-ДНК ділянки на кінцях рестриктних фрагментів є універсальною мішенню для ампліфікації. PCR-ампліфікація відбувається за всіма рестриктними фрагментами.

Дана технологія дозволяє визначити генетичні зміни, викликані точковими мутаціями в сайтах рестрикції або ж у ділянках випалу праймера (присутність чи відсутність продукту ампліфікації у спектрі), а також обумовлені невеликими вставками – делеціями всередині

рестрикційного фрагмента (зміни розмірів смуги у спектрі). Однак AFLP-маркерна система, на кшталт RAPD, є домінантною за типом успадкування алельних варіантів, хоча деякі спеціалісти відстоюють можливість ідентифікації гетерозигот. Ідентичність в гелях ампліфікованих ДНК-фрагментів однієї довжини часто важко довести.

Метод AFLP дозволив аналізувати велику кількість локусів на предмет поліморфізму і дав можливість отримати значно більшу кількість поліморфних ДНК-маркерів, ніж будь-який інший метод, оснований на застосуванні ПЛР. Варіюючи нуклеотидною послідовністю праймерів і застосовуючи різні рестриктази, можна домогтися ампліфікації лише декількох фрагментів, які можуть бути використані як фінгерпринт. Метод успішно використовується для “геномної дактилоскопії” зернових культур [247, 406], порід великої рогатої худоби [4].

Для вирішення завдань об’єктивної оцінки генетичних взаємовідносин між генофондами у 1994 році був запропонований метод ISSR-PCR (inter-simple sequence repeat – ділянки між локусами повторюваної ДНК). У даному випадку як праймер використали мікросателітний повтор (ди- чи тринуклеотидний), що обумовлює ампліфікацію в ПЛР фрагмента, фланкованого його інвертом. Як і в RAPD-PCR, ISSR-PCR не потребує попереднього клонування і секвенування фрагментів для підбору праймерів. Основними властивостями маркерів ISSR-PCR є: домінантний тип успадкування; вища точність і відтворюваність порівняно з RAPD-PCR у зв’язку з більшою довжиною праймера (19-23 п.н.) і більш високою температурою випалу; локалізація у геномі невідома; функція невідома. Існує припущення, що мінливість спектру ампліконів при використанні маркерів ISSR-PCR є нейтральною до факторів відбору і подій еволюційного рангу [5].

Таким чином, молекулярно-генетичні маркери стали цінним інструментом для вирішення численних проблем еволюції, генетики, селекції, збереження генофондів, ідентифікації генотипів і уточнення їх походження. Очевидним є факт, що різні типи молекулярно-генетичних маркерів повинні відповідати певним завданням досліджень, тобто кожне поставлене завдання потребує відбору відповідного типу молекулярно-генетичних маркерів.

## Тема № 5

### Генетика собак

Собака – перша тварина, приручена і одомашнена людиною. Різні його запиту і потреби спричинили виникнення великої різноманітності типів і порід собак. Сформувалися породи: мисливські, службові, декоративні. Джерелом різноманітності служили такі генетичні процеси, як мутаційний, комбінативна мінливість і умови зовнішнього середовища як природні, так і створювані людиною при здійсненні штучного відбору.

В результаті досліджень встановлено, що каріотип собак містить [3] число хромосом в соматичних клітинах  $2n = 78$ . Сюди входить 76 аутосом і дві статеві хромосоми ( $76 + XX$  – самка і  $76 + XY$  – самець). За морфологічною будовою всі аутосоми є акроцентричними, які зменшуються за розміром від найбільшої першої пари гомологічних хромосом до найменшої – тридцять восьмої. Статеві хромосоми субметацентричного типу X-хромосома представлена великим субметацентриком, Y-хромосома – найменший субметацентрик в наборі. Причому Y-хромосома є генетично інертною, тобто гени, розміщені в X-хромосомі, як правило, не мають алелей в Y-хромосомі. Ідентифікація окремих акроцентричних хромосом ускладнюється відсутністю суттєвої різниці їх розмірів [6].

Генетика собаки найбільш докладно розроблена щодо наступних ознак: успадкування пігментації, екстер'єрних ознак, волосяного покриву, аномалій і хвороб.

**Успадкування пігментації.** Прояв різної пігментації у собак виявляється в забарвленні волосяного покриву, пігментації мочки носа, губ і рота, райдужної оболонки очей і повік. У собак службових порід мінливість пігментації спостерігається рідко. У мисливських і декоративних – варіювання забарвлення волосу досить різноманітне. За повідомленням Р. Робінсона, у 118 порід виявлено 29 різних алелей пігментації. Найбільша варіабельність забарвлення виявлена у кокер-спанієля – 18 фенотипів, пінчера – 10, пуделя – 14 фенотипів. Незважаючи на таке розмаїття забарвлення волосяного покриву, виділяються такі основні його типи:

- сіре забарвлення – німецька вівчарка з серією різної інтенсивності забарвлення: від більш світлого до чорного;
- чорний – ньюфаундленд;

- шоколадний (кавовий, коричневий) – доберман;
- блакитний – доберман;
- соболинний, червоний – боксер;
- чепрачний – колі, німецька вівчарка;
- чорний з підпалинами – доберман;
- тигровий – дог, боксер;
- альбіноси (лейцисти) – шпіци, лайки, арлекіни.

Генетичний аналіз показує, що це розмаїття зумовлено дією мінливості і серією множинних алелів в результаті багаторазової мутації основного гена. Успадкування забарвлення проявляється у вигляді домінування, рецесивності, неповного домінування, міжалельної взаємодії, плейотропної дії. У забарвленні волосся собак часто спостерігається розподіл пігменту за довжиною волосу у вигляді зон (кілець), що дає забарвлення «агуті». Вважається, що забарвлення агуті є первинною пігментацією, поширеною у диких тварин, таких як сірий вовк, шакал. У структуру локусу агуті входять алелі, позначені наступними символами: суцільний чорний – *As*, домінантний жовтий – *Ay*, агуті – *A*, чепрачний тип – *asa*, рудувато-коричневий тип – *at*. Поєднання в генотипі собаки генів цього локусу дає різноманітність у забарвленні волоссяного покриву. Забарвлення волосу по типу агуті розповсюджене у німецьких вівчарок і лайок [17].

Розподіл пігменту по тілу також має генетичну зумовленість і мінливість. Так, наприклад, пігментація волосу може розповсюджуватися по всьому тілу або виявлятися в вигляді окремих плям, тобто «пегості» з більшою чи меншою величиною плям. Часто пігментація оформлена у вигляді чепрака по всій спині, або плями розкидані по боках, по голові, морді. Наявність гена альбінізму призводить до втрати пігментації волоссяного покриву, шкіри, райдужної оболонки очей, губ і рота.

Плямистість може мати специфічний вид, зокрема у вигляді крапчатості та штрихоподібних плям чорного або коричневого кольору на білому тлі. Особлива плямистість типова, наприклад, для долматинців та англійського сетера. Ще зустрічається коли біле волосся рівномірно перемішане з пігментованим. Цей тип забарвлення називається чаліст'ю. Вважається, що чале забарвлення має домінантне успадкування і обумовлене геном *T*. Воно формується у цуценят до місячного віку. Темна плямистість виявляється у різних місцях (статях) тіла: на голові, шиї, хвості, лапах, крижах, спині. Депігментація рідше зустрічається на вухах і

корені хвоста. Вважається, що поява білих плям на ногах і спині має домінантне успадкування, а на мочці носа, вухах, стегнах – рецесивне. При оцінці екстер'єру вадою вважаються рожева мочка носа і губ, рожеві (без пігменту) очі [3, 17].

Незважаючи на велику різноманітність у фенотипах пігментації собак, можна виділити типові забарвлення шерсті для деяких порід. Так, наприклад, афганські борзі мають забарвлення шерсті: чорне, чорне з коричневим підпалом, блакитнувате, сіре; російські борзі – чорне, руде плямисте; боксери – руде, червоне, тигрове; бульдоги – червоне, соболине, тигрове; чау-чау – чорне, блакитнувате, червоне, сіре; доги – чорне, коричневе, жовте, строкате; арлекіни – різноокі в забарвленні райдужної оболонки; добермани – чорне, коричневе (кавовий, шоколадний) голубувате, ізабелла; японські хіни – чорне з білим, червоне з білим; ньюфаундленди – чорне, коричневе, блакитнувате; чи-хуа-хуа – 10 різних фенотипів.

Повних альбіносів у собак не зареєстровано. У деяких особин спостерігається неповний альбінізм. Це так звані лейцисти, у яких при безбарвному (білому) волосяному покриву зберігається темна пігментація мочки носа і райдужної ока. Лейцизм зареєстрований як породна ознака у білих шпіців, білих бультер'єрів, у деяких порід лайок. Таким чином, основу синтезу пігменту забезпечує ген *C*, а його рецесивний стан призводить до альбінізму. У лейцистів гени забарвлення знаходяться в прихованому стані і виявляються тільки у потомства, отриманого від схрещування собаки-лейциста з забарвленою собакою, що має домінантний ген *C*. В такому потомстві можуть бути цуценята чорного, кавового забарвлень і альбіноси, якщо забарвлена собака була гетерозиготна (*Cc*) [17].

**Успадкування типу і структури вовняного покриву.** Розрізняють такі типи волосяного покриву у собак:

короткошерсті – ген *L* (добермани, боксери та ін.);

довгошерсті – ген *l* (німецькі вівчарки, ньюфаундленди, колі, кавказькі вівчарки, лайки та ін.);

жорсткошерсті – домінантний ген *Wh* (фокстер'єри, жорсткошерсті лягаві, ердельтер'єри, жорсткошерсті такси та ін.);

шовковисті (болонки);

безшерсті – ген *Hr* – в гомозиготі *Hr Hr* (голі мексиканські – виживають тільки гетерозиготи *Hrhr*);

напівхвилясте та завиткове волосся (пуделі) – ген *wo*.

При схрещуванні короткошерстої собаки, яка несе домінуючий ген *L*, з довгошерстою собакою, що має рецесивний ген *l*, у приплоді проявляється проміжне успадкування довжини волосу, і тому нащадки будуть мати різну довжину волосся, яка відхиляється в тій чи іншій мірі від довжини волоса одного або іншого батька. Така особливість у варіюванні довжини волосу обумовлена тим, що ця ознака визначається дією багатьох генів, тобто має полігенне успадкування.

**Успадкування екстер'єрних ознак.** Характерними спадковими ознаками, які оцінюються як породна ознака, є довжина і форма хвоста, форма і розмір вушної раковини, особливості в будові черепа і кінцівок.

По довжині і формі хвоста собаки розрізняються на породи: довгохвості (доги, борзі), з середньою довжиною хвоста до скакального суглоба (німецька вівчарка, сенбернари, колі та ін.); короткохвості і безхвості (повна відсутність хвостових хребців).

Довжина хвоста генетично обумовлена полімерією, вплив генів – модифікаторів призводить до фенотипового варіювання довжини хвоста.

Вроджена короткохвостість зрідка з'являється у окремих особин, що послужило матеріалом для виведення короткохвостих порід собак (карликовий шпіц, гладкошерста лягава бурбон). Короткохвостість обумовлена рецесивним геном *br*, при цьому кількість хвостових хребців зменшена.

Розрізняють форму і поставу хвоста, що має спадкову обумовленість і закріплено селекцією, як породна ознака. Так, у лайок типовий хвіст кільцем на спині, у фокстер'єрів, ердельтер'єрів, біглей хвіст вертикально-і прямостоячий, у лягавих хвіст має горизонтальне розташування у вигляді «прута», у борзих хвіст утворює на кінці невелику кільцеподібність [17].

Породною генетичною ознакою є форма і розмір вушної раковини. Встановлено, що напівстоячі вуха визначає ген *Ha*, при цьому кінчик вуха на третину зігнутий у бік слухового входу. Така форма вуха типова для колі, фокстер'єрів. Генотипи можуть бути: *HaHa*, *HaH*, *HaH*. Стояче вухо обумовлено рецесивним геном *h* з генотипом *hh*, воно характерне для німецької вівчарки, лайок, шпіців, французьких бульдогів, бультер'єрів. Багато порід мають висяче вухо з м'яким хрящем від основи вушної раковини. Воно викликане домінуючим геном *H*, з генотипом *HH*. Така форма вже спостерігається у багатьох порід. Але вухо варіює по довжині, коли його розміри досягають такої довжини, що край вуха торкається



землі. Довговухість типова для спанієлів, гончих, такс, біглей, пуделів, болонок, бассетів [17].

Велике розмаїття у собак спостерігається в будові черепа, щелеп. При одомашненні (доместикації) умови утримання і годівлі собак впливали на формування скелета. Мутаційні процеси, викликані впливом мутагенів в їжі і в навколишньому середовищі, призводили до мутантних ознакам, частина з яких людина закріпила селекційним процесом. В результаті морфологічні особливості скелета черепа, кінцівок, як характерні для вовка і дикої собаки, зазнали змін. З'явилася мопсовидність (укорочення щелепних кісток, особливо верхньої щелепи), поширилася укороченість і викривленість кісток кінцівок, особливо передніх (такси). Мопсовидність поширена як породна ознака у собак породи мопс, деяких типів болонок.

Для сторожових порід типово формування потужного черепа і щелепного апарату, з добре розвиненою зубної системою і нормальним прикусом. У деяких мисливських собак, які формувалися для швидкого бігу за звіром, селекція закріпила довгоногість, вузькотілість, довгі лінії голови і шиї (борзі). Більшість елементів скелета обумовлено полігенним типом успадкування, а також впливом факторів зовнішнього середовища.

Таким чином, напрямок штучного відбору, який здійснюється людиною для отримання і закріплення бажаних особливостей екстер'єру, супроводжується збільшенням міжпородної мінливості і використанням мутаційного процесу.

**Успадкування хвороб собак.** Основний фактор, що викликає спадкові хвороби і аномалії – мутаційний процес, що викликає генні (точкові), та хромосомні перебудови. Дослідження генів, що викликають аномалії, показує, що їх частка в породі у гетерозиготних особин значно більше, ніж у гомозиготних.

Виявлення таких генів слід починати з вивчення родоводів родинних тварин в ряді поколінь і у бокових родичів. Якщо ген аномалії має рецесивний тип, то при обстеженні декількох приплодів частка аномальних буде складати близько 25 відсотків від усіх народжених. Якщо ген мав домінантне успадкування, то аномалія може бути присутньою і виявлятися вже у одного з батьків.

У разі домінантного успадкування гена аномалії вона проявляється у її носія. Таких собак слід виключати з племінного використання. Але іноді домінантна мутація може з'явитися в геномі особини і виявляється тільки у її нащадків. Такий носій аномалії повинен виключатися з розмноження.

Тварин, що мають рецесивний тип успадкування і знаходиться приховано в гетерозиготному генотипу, необхідно також виключати з розмноження, як собак – носіїв рецесивної аномалії, і проводити це в ряді поколінь [17].

#### **Деякі спадкові захворювання у собак.**

**Шкіра.** Дисплазія сполучної тканини супроводжується крихкістю шкіри і периферичних кровоносних судин, легко розривається, утворюються рубці. Викликана домінантним геном *Cd*, в гомозиготі дає летальний результат.

*Безшерстість* обумовлена домінантним геном *Hr*, гомозиготи *HrHr* – гинуть, живуть гетерозиготи *Hrhr*.

**Хвороби очей.** *Афаксія* – відсутність кристалика ока, зумовлена рецесивним геном, зареєстрована у сенбернарів.

*Катаракта* розвивається повільно, має багато форм, виявляється від 6-місячного до 4-річного віку. Деякі катаракти мають домінантне, а інші, частіше, рецесивне успадкування; *АКТ* – аномалія очної структури зареєстрована у 80-90 відсотків собак породи колі. Вражена сітківка, склера, зоровий нерв, обумовлена геном *sea*, має плейотропну дію.

*Глаукома* поширена у американського кокер-спанієля. З'являється з віком у старих і середньовікових собак. У біглей розвивається з 6-18 місяців.

*Куряча сліпота* – виявляється з 8-тижневого віку. Зумовлена рецесивним геном *he*.

**Аномалії.** *Дисплазія тазостегнового суглоба* – виявляється в ранньому віці у вигляді кульгавості, виснаженої стегнової мускулатури, поганій рухливості тазостегнового зчленування, небажанням собаки рухатися. Аномалія має полігенну обумовленість.

*Гіпофізарна карликовість* – виявляється після 1-2-місячного віку. Зростання припиняється і настає смерть. Функція гіпофіза – недостатня. Викликається рецесивним геном *du*. Виявлена карликовість у німецьких вівчарок і у карельських лайок.

*Фіброзна дисплазія* – набрякання передніх кінцівок, кульгавість з 5-7-місячного віку. Аномалія має спадковий тип рецесивного характеру.

*Ахондроплазія* – вкорочення кінцівок (бассети, такси), викликається рецесивним геном.

*Вкорочення хребта* (павіанова постанова) зумовлена рецесивним геном *sp*; випинання міжхребцевих дисків; деформація хребта; остеохондроз хребта [17].

**Нервові захворювання.** *Атаксія* спричиняє дегенерацією центральної нервової системи, викликається рецесивним геном *at*.

*Повний ідіотизм* починає виявлятися з 6-місячного віку в підвищеній нервозності, судомах; тварини гинуть до 2-річного віку.

*Лейкодістрофія Бьєркаса* проявляється в атаксії і паралічі, втраті зору, зумовлена рецесивним геном *Id*.

*Мозочкова атаксія* з'являється з 9-16-тижневого віку, виявляється в дрібному тремтінні голови, негнучкості задніх кінцівок, обумовлена рецесивним геном *Eb*.

*Епілепсія* – має полігенне успадкування порогового типу.

**Захворювання крові.** Головними захворюваннями крові є анемії та гемофілії.

*Гемолітична анемія* починає проявлятися близько річного віку, цуценята гинуть протягом року – еритроцитам бракує ферменту піруваткінази, кількість якого регулює ген *pk*.

Гемофілії мають кілька ступенів прояву, супроводжуються різноманітними гемофілічними дефектами. Успадкування може бути рецесивне, неповне домінантне і домінантне. *Гемофілія А* пов'язана зі статтю: у гетерозиготних самок скорочений синтез фактора VIII. У *гемофілії В* – успадкування зчеплене зі статтю; у гетерозиготних самок скорочена активність фактора IX. Гемофілії передаються через X-хромосому потомству. Самки є носіями гемофілії, а самці хворіють клінічними формами у вигляді пухлин гематомного типу, кровотеч з носа і анального отвору.

**Аутоімунні хвороби** у собак спостерігаються відносно гормонів щитовидної залози і сім'яників. Найімовірніше, їх спадкова зумовленість має полігенний характер.

Важливою аномалією є *крипторхізм* (односторонній і двосторонній), коли насінники не опускаються в мошонку. *Крипторхізм* має пороговий тип прояву і зумовлений дією декількох полігенів і рецесивним геном *c* в хромосомі. Двосторонні крипторхи стерильні, коли односторонні можуть давати потомство. Такі самці не повинні використовуватися в розведенні, оскільки вони насичують породу аномальними полігенами. Самки є

носіями генів крипторхізму, і тому бажано виключати з розмноження самок, від яких з'являються сини-крипторхи [17].

Таким чином, важливою умовою ведення племінної роботи в собаківництві є ретельний, точний облік та своєчасне виявлення всіх відхилень від норми морфологічних, екстер'єрних та фізіологічних якостей собак. А наведена інформація щодо генетичного успадкування основних селекційних ознак собак є тому підтвердженням.

## Тема № 6

### Ентропійно-інформаційний аналіз полігенно зумовлених ознак

В основу сучасної селекційної роботи з сільськогосподарськими тваринами покладено оцінку та відбір тварин за комплексом ознак. Інтенсифікація молочного скотарства, прискорений темп вдосконалення племінних та продуктивних якостей тварин потребує більш раннього прогнозування продуктивності [16].

У нинішніх умовах інтенсифікації тваринництва в силу різних причин, продуктивні особини передчасно вибувають із стада, повністю не реалізуючи закладені в їх генотипі можливості, оскільки найкраща продуктивність у корів проявляється на четверту – шосту лактації, а витрати пов'язані з вирощуванням корови стають рентабельними тільки після третьої – четвертої лактації. Тому пошук ефективних методів прогнозування майбутньої продуктивності та довголіття тварин на ранніх стадіях їх онтогенезу призведе до інтенсифікації галузі й стане обов'язковим елементом великомаштабної селекції [7].

Останніми роками все частіше залучаються інформаційно-статистичні методи аналізу до генетико-селекційного процесу у тваринництві. Ентропійно-інформаційний аналіз у кібернетиці бере початок з робіт К. Шенона. З часом він був застосований і у біологічних науках зокрема в медицині, екології та фізіології. У 1989 році Є.К. Меркур'єва та А.Б. Бертазін використали ентропійний аналіз та коефіцієнт інформативності при оцінці селекційних ознак у молочному скотарстві. Пізніше С.С. Крамаренко [9] вдало модифікував методику ентропійно-інформаційного аналізу, після чого з'явилась низка робіт у галузі птахівництва (С.С. Крамаренко Л.С. Патрєва, В.П. Хвостик ), у скотарстві (М.І. Гиль, І.А. Галушко, О.Ю. Сметана, М.І. Гиль, В.В. Коваленко, О.І. Каратєєва), у свинарстві та вівчарстві (В.П. Коваленко, В.В. Дебров, Т.І. Нежлукченко), що підтвердили доцільність застосування нової вищезгаданої методики [7].

Вперше поняття ентропії – як міри випадковості, невизначеності було введено К. Шеноном у 1963 році. Всі біологічні системи характеризуються високим різноманіттям та складністю. Але селекційний процес з одного боку керований людиною і внаслідок цього ентропійні властивості організмів підлягають меншим змінам, ніж при вільному розмноженні, а з іншого боку будь-який організм підлягає взаємозв'язку з середовищем,

тобто формує індивідуальні відмінності процесу обміну і їх динамічність. Таким чином, ентропія з точки зору селекції – це здатність проявляти мінливість у часі під дією ймовірних факторів. Ентропія – ступінь невизначеності, неорганізованості будь-якої системи, є певним ступенем хаосу, мірою безладу [7, 12]. На відміну від імуногенетичного аналізу, який дає змогу оцінити лише гетеро- або гомозиготність за алелями груп крові та тип поліморфізму білків, ЕІА враховує гомо- або гетерозиготність за основними селекційними ознаками. Це дає можливість оцінити варіабельність популяції більш глибоко, що є цінним при прогнозуванні продуктивності – плануванні відбору. Тобто спрямований підконтрольний процес від повної ентропії до максимальної інформативності в кінцевому підсумку сприяє певному рівню упорядкованості системи й зменшенню її хаотичності [5].

Досліджуючи механізми передачі інформації можна моделювати процеси розвитку системи в певному напрямку. В свою чергу це дає можливість прояснити механізми прогресу системи з врахуванням її ускладнення, упорядкованості і підвищення ступеня організованості [5].

М.І. Гиль вважає, що будь-яка біологічна система містить в собі певну кількість інформації, яка характеризується тільки для конкретно взятої популяції і підлягає різним факторам впливу, ентропія в таких системах зростає або не змінна [5]. Завдяки таким властивостям М.І. Гиль, О.Ю. Сметана, О.І. Каратеева рекомендують використовувати показник безумовної ентропії і відносну її організацію для встановлення її стану гетерогенності піддослідного об'єкту для удосконалення, скажімо селекційного процесу з окремо взятим стадом чи породою [5, 7].

Л.С. Патрева, С.С. Крамаренко вважають, що цей підхід дає декілька переваг: по-перше, нові величини – для певних ознак, що мають будь-яку розмірність, будуть варіювати в межах від 0 до 1... по-друге, використання інтегралу щільності нормальної кривої призводить до її згладжування. Ця особливість інтегралу щільності нормального розподілу часто використовуються в прикладному статистичному аналізі, наприклад, при пробіт-аналізі. Згладжування нормальної кривої дає нам ще одну важливу перевагу, а саме, її монотонність, тобто однакову величину прирощення частоти зустрічаємості варіант у виборці при збільшенні абсолютних значень цих варіант [7].

С.С. Крамаренко [9] довів, що значення інтеграла щільності розподілу ознаки будуть мати рівномірний розподіл. І цей розподіл буде найбільш

ідеально наближатися до рівномірного тоді, коли вихідний емпіричний розподіл буде ближче до нормального. А це значить, що чим ближче розподіл вихідної ознаки до нормального, тим ближче розподіл інтеграла його щільності до рівномірного і, відповідно, ентропія такої системи буде прагнути до свого максимуму. І, навпаки, чим сильніше емпіричний розподіл вихідної ознаки відхиляється від нормального, тим сильніше буде відхилятися від рівномірного розподіл інтеграла його щільності і, відповідно, тим нижче буде значення ентропії цієї системи. У крайньому випадку, коли всі варіанти у виборці (або популяції) будуть рівними, ентропія такої системи, як і слід за визначенням, буде дорівнювати нулю.

Кількість інтервалів, на які можна розбити відрізок (0-1) для інтеграла щільності розподілу, залежить від об'єму вибірки. С.С. Крамаренко та Л.С. Патрева пропонують таку оптимальну кількість інтервалів, при якому середня частота попадання величини в будь-який з таких інтервалів не буде менше 5-10. Таким чином, для вибірок, об'ємом 100-200 об'єктів (особин) оптимальним буде 10 інтервалів. В цьому випадку, максимальне значення ентропії такої системи буде дорівнювати  $H_{max}=3,322$  біт. При більшому об'ємі вибірових даних, кількість інтервалів може бути збільшено, при меншому об'ємі, навпаки, зменшено[7].

На основі проведених досліджень С.С. Крамаренком та Л.С. Патревою встановлено, що представлену систему за показником живої маси курей батьківського стада бройлерного кросу можна віднести до стохастичної згідно класифікації О.Г. Антомонов, оскільки  $R$  не перевищує 0,3 і знаходиться у межах 0,005.. 0,168 для курочок і 0,007.. 0,224 – для півників.

В результаті проведення В.П. Хвостиком електрофоретичних досліджень протеїнів яєчного білку гусячих яєць було визначено частоту трьох алелей поліморфного локусу овомукоїду у гусей великої сірої породи, рейнської білої породи, великої білої популяції (птицю обстежено у 2008 та 2009 роках) та гібридів першого покоління, отриманих за міжпородного і схрещування рейнських і великих сірих. Оскільки локуси овоальбуміну, трансферину та овомакроглобуліну виявилися мономорфними за алелем  $A$ , то окрему величину безумовної ентропії розраховували тільки для алелей поліморфного локусу овомукоїду і додавали їх значення для обчислення сумарної безумовної ентропії цього локусу, що представляє собою елементарну генетичну систему.

Для визначення рівня складності та відносної організації системи, представлені частотою алелей локусу овомукоїду яєчного білку, автором, проведено розрахунок інформаційно-статистичних параметрів. Рівень складності системи становив для гусей усіх досліджених груп  $H_{max}=1,7918$  біт. Величина безумовної ентропії у обстежених, груп гусей знаходилася у межах  $0,5907\dots 0,7849$  біт. Максимальний прояв безумовної ентропії частот алелей локусу овомукоїду яєчного білку характерний для великих білих гусей, обстежених у 2008 році ( $H=0,7849$  біт). Тоді як мінімальне значення виявлено у особин великої сірої породи, обстежених в тому ж році ( $H=0,5907$  біт) [7].

За результатами проведених досліджень В.П. Хвостик показав можливість трактування отриманих даних з точки зору застосування математичних підходів, зокрема ентропійно-інформаційного аналізу.

Так автор, для характеристики стану біосистеми конкретних ознак рекомендує застосування параметрів безумовної ентропії ( $H$ ) та відносної організації системи ( $R$ ). А встановлений високий корелятивний зв'язок між показниками безумовної ентропії ( $H$ ) та рівнем гетерозиготності ( $He$ ) у досліджених груп гусей на рівні  $r=0,700$  підтверджує таку доцільність.

Як відомо, будь-який процес росту характеризується певними періодами спаду та інтенсивного нарощування живої маси. ЕІА дає можливість дослідити біологічні системи за рівнем їх генетичної організованості під дією фенотипових факторів, які детермінують процеси росту і впливають на подальшу продуктивність.

Використовуючи ентропійно-інформаційний аналіз, О.І. Каратєєва для опису живої маси корів у різні вікові періоди зазначила, що діапазон мінливості параметрів досить широкий і коливається в межах:  $1,459$  біт ....  $3,209$  біт (швидкий тип розвитку) і  $1,776$  біт ....  $3,154$  біт (повільний тип). Ступінь угрупованості системи у червоної степової та української чорнорябої молочної порід зростає при народженні та у віці дев'яти і п'ятнадцяти місяців, така ж тенденція спостерігається і в розрізі типів інтенсивності формування організму, про що свідчать і найвищі значення відносної ентропії саме в ці вікові періоди. Серед ровесниць ЧС худоби в перші шість місяців розвитку вища організованість вибірки притаманна коровам повільної швидкості росту ( $H=2,049$  біт,  $H=2,490$  біт,  $H=2,357$  біт), а з дев'яти до п'ятнадцяти місячного віку, навпаки, худобі швидкої інтенсивності формування організму ( $H=1,906$  біт,  $H=3,055$  біт,  $H=2,127$  біт) [7].



Також О.І. Каратеева вказує, що серед дослідженого поголів'я вищий ступінь організованості оцінених біологічних систем, представлених молочною продуктивністю, виявлено здебільшого у корів швидкої інтенсивності формування організму, що підтверджується і показниками продуктивності. У більшості випадків основні показники молочної продуктивності з віком корів стають упорядкованішими, а величина безумовної ентропії ( $H$ ) зменшується [7].

Отже доведено, що застосування ентропійно-інформаційного аналізу дає можливість трактування отриманих даних з точки зору застосування математичних підходів, зокрема ентропійно-інформаційного аналізу.

Таким чином, доцільно використовувати отримані показники організованості окремих систем, як допоміжні параметри для оптимального відбору і підбору тварин для їх удосконалення в процесі селекції та прогнозування продуктивності.

## Тема № 7

### Маркер-допоміжна селекція (MAS - Marker-assisted selection)

Бурхливому прогресу ДНК-технологій сприяло те, що відразу ж була усвідомлена їх велика значимість і перспективність у вирішенні проблем довкілля та найрізноманітніших проблем біології і сільського господарства. Крім того, вперше дослідникам відкрилась можливість не лише вивчати механізми життєдіяльності організмів, але й свідомо планувати зміни в них. ДНК-технології здійснили суттєвий внесок у розвиток цілого ряду напрямів класичної генетики, у зміну уяви про структурно-функціональну організацію живої матерії, сформувавши новий підхід до розуміння оточуючого світу. Виділяють такі основні напрями використання ДНК-технологій у тваринництві:

- дослідження геному сільськогосподарських видів тварин на наявність продуктивних якостей для вирішення селекційних завдань (*MAS – marker assisted selection* – селекція з допомогою маркерів);
- дослідження генетичної структури організмів, створення генетичних паспортів порід, видів, таксономічних груп;
- виявлення генетичних захворювань на ранніх стадіях розвитку організму;
- діагностика інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин і проведення епізоотологічного моніторингу;
- діагностика статі ембріонів великої рогатої худоби;
- контроль якості сільськогосподарської сировини і продуктів харчування.

Деякі з цих напрямів не лише добре відпрацьовані, але й упроваджені у практику тваринництва, інші перебувають на стадії апробації [4].

Часто фенотипова зміна ознаки обумовлена мутацією одного єдиного нуклеотиду у послідовності ДНК (крапкова мутація). Зрозуміло, що за оцінки крапкових мутацій з рецесивним типом успадкування за фенотипом неможливо розділити гомозиготних носіїв та гетерозиготних прихованих носіїв спадкових змін. Це призводить до того, що навіть при вибракуванні усіх носіїв небажаний рецесивний алель зберігається у популяції і може проявлятися у наступних поколіннях. Використання молекулярно-генетичних методів не лише дозволяє розділити популяцію на носіїв і неносіїв, але й робить можливою діагностику, а звідси і вибракування прихованих носіїв. Широке впровадження молекулярно-генетичних

методів у тваринництво пов'язане з розвитком технології ПЛР, що значно скоротило й спростило аналіз крапкових мутацій.

У практику тваринництва багатьох країн упроваджена ДНК-діагностика деяких крапкових мутацій, які пов'язані з господарсько-корисними ознаками. Однією із таких ознак є стійкість до стресів свиней. Крім порушень у конституції, чутливі до стресу свині проявляють ряд симптомів, які призводять до їх загибелі. Услід за напруженням м'язів, утрудненим диханням і підвищеною частотою пульсу, внаслідок порушення кровообігу і серцевого шоку у них розвивається злякисний гіпертермічний синдром (MHS). Після забою таких свиней ряд показників якості м'яса значно знижується або воно стає непридатним для переробки. Було показано, що чутливість до злякисної гіпертермії (чутливість до стресу) обумовлена крапковою мутацією у гені р'анодинового рецептора RYR1 свиней. Відкриття цієї мутації дало змогу розробити і впровадити у практику молекулярно-генетичний тест, який дозволяє чітко ідентифікувати генотипи стресостійких і чутливих до стресу свиней [2, 4].

З точки зору впливу на певні господарсько-корисні ознаки великої рогатої худоби особливої уваги заслуговує локус гена міостатину. Мутація у цьому гені, обумовлена делецією розміром 11 пар нуклеотидів у екзоні 3, порушує рамку зчитування гена і таким чином порушує синтез білка міостатину. Велика рогата худоба, яка є носієм даної мутації, має м'язову гіпертрофію – так званий ефект подвійної мускулатури. Вперше дана мутація була виявлена у бельгійської блакитної породи великої рогатої худоби [4].

Простежено зв'язок алельних варіантів гена соматотропіну з молочною продуктивністю. З цією метою за локусом даного гена були протестовані основні породи великої рогатої худоби США, Канади, Японії.

З використанням 181 мікросателітного маркера у 5 хромосомах із 29 аутосом у великої рогатої худоби були картовані локуси кількісних ознак, пов'язані з молочною продуктивністю. У даній роботі на великій кількості плідників (1518 голів), чий генетично обумовлений потенціал до високої молочної продуктивності був тестований за потомством (більше 150000 корів-доньок), головні гени, асоційовані з такими характеристиками молочної продуктивності як загальний надій у першу лактацію, масова частка жиру, білка у молоці, були картовані у хромосомах 1, 6, 9, 10 і 20.

Одним із маркерів, асоційованих з локусами кількісних ознак, є ген високої плодючості у овець породи бурулла – ген *Fec B*. Експресія цього

гена зумовлює підвищення кількості овулюючих яйцеклітин і великий приплід у овець бурулла – як гомозигот, так і гетерозигот за геном *Fec B*. Проявляння цього гена підтверджено у овець порід кембрідж, фінської, романівської, австралійських мериносів [4].

До групи численних генів, які контролюють молочну продуктивність і якість молока, відноситься ген капа-казеїну. У ряді європейських країн і США обов'язковим є визначення генотипів за локусом цього гена у худоби молочного напрямку продуктивності.

ДНК-технології дозволяють на ранніх стадіях онтогенезу сільськогосподарських видів з високою точністю діагностувати у них широкий спектр генетично детермінованих захворювань. Так, відпрацьована методика виявлення у великої рогатої худоби захворювання BLAD (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency) – дефіцит адгезивності лейкоцитів, яке вперше виявлене у голштинської породи великої рогатої худоби [5]. Захворювання зумовлене крапковою мутацією у кодуючій частині аутосомного гена *CD18*. Даний ген контролює синтез глікопротеїду *B*-інтегрину, який грає ключову роль у міграції нейтрофілів до осередку запалення. У хворих тварин відбувається блокування нормального функціонування імунної системи. Хвороба фенотипово проявляється лише у гомозиготних тварин і вони гинуть у перші місяці постнатального розвитку [4].

У зв'язку з фактами швидкого розповсюдження BLAD у багатьох країнах з розвиненим молочним скотарством створені спеціальні національні програми щодо виключення носіїв цієї мутації із систем штучного відтворення. На жаль, в Україні така програма відсутня, і мутація поширюється безконтрольно, що вже призводить до суттєвих економічних втрат.

Ще одним генетично детермінованим захворюванням, яке з'явилося внаслідок виведення "суперпорід" і набуло світового поширення в результаті продажу племінних тварин, ембріонів і сперми голштинської худоби, є хвороба рецесивного гена DUMPS (deficiency of uridine monophosphate synthase) – дефіцит уридинмонофосфатсинтетази. Ця метаболічна вада негативно позначається на відтворювальній функції тварин і впливає на життєздатність потомства. Якщо обоє батьків є носіями рецесивного гена DUMPS, то біля 25% ембріонів гине на ранній стадії розвитку (до 40 днів). Для ідентифікації даної мутації відпрацьований метод ПЛР з подальшим рестрикційним аналізом [5].

Метод ПЛР з наступним аналізом рестрикційних фрагментів дозволяє ідентифікувати дві точкові мутації гена аргініносукцинатсинтетази у великої рогатої худоби, які зумовлюють захворювання цитрулінемію (порушення синтезу сечовини). Без відповідного лікування тварини з даним порушенням обміну гинуть.

Простота, велика чутливість, висока відтворюваність швидко перетворила метод полімеразної ланцюгової реакції в один із найбільш зручних і перспективних для діагностування інфекційних збудників у сільськогосподарських видів тварин. Перелік бактерій і вірусів, для виявлення яких вже готові ПЛР-набори чи компоненти до таких наборів, на даний час значний. Спеціалістами ветеринарної медицини розроблені тест-системи для діагностики таких захворювань як сказ, ящур, бруцельоз, кампілобактеріоз, лістеріоз, хламідіоз, токсоплазмоз тварин; туберкульоз, сибірка, лейкоз, чума великої рогатої худоби; класична чума, респіраторно-репродуктивний синдром, трансмісивний гастроентерит, хвороба Ауески і везикулярна хвороба, парвовірусна інфекція, енцефаломіокардит свиней; сальмонельоз, стафілококоз, мікоплазмоз, хвороба Марека, реовірусна інфекція, хвороба Гамборо, інфекційний бронхіт, Ньюкаслська хвороба курей; чума м'ясоїдних, вірусний ентерит норок, вірусний гепатит каченят.

Перспективними підходами використання ПЛР у даному напрямі є визначення резистентності клінічних штамів збудників інфекційних захворювань до антибіотиків, створення можливості кількісного обліку результатів для контролю динаміки інфекційного процесу, вірного вибору тактики лікування і оцінки ефективності застосовуваних лікувальних засобів.

Напрямок геномної “дактилоскопії” реалізується через дослідження у різних сільськогосподарських видів поліморфізму структурних генів, сателітної ДНК, мітохондріальної ДНК, “анонімних” послідовностей ДНК і дозволяє отримати унікальну генетичну картину будь-якого індивідууму. Вивчається генетична мінливість домашніх тварин, включаючи контроль походження; визначається генетична спорідненість між групами тварин з метою підбору ліній для схрещування; проводиться генетичний “аудит” у випадку сумнівності походження племінних тварин; досліджується філогенія і генетична структура популяцій; проводиться генетичний аналіз у матеріалі *ex situ* (сперма, ооцити, ембріони, ембріональні стовбурові клітини), генетична ідентифікація трансгенних тварин.

Відносно новим напрямом використання ДНК-технологій у практиці тваринництва є видова диференціація м'яса у продуктах харчування і кормах, які піддавались термічній обробці. Значення цього напрямку суттєво зросло останнім часом у зв'язку з виявленням пріонних захворювань у сільськогосподарських та домашніх тварин. З допомогою молекулярно-генетичних методів можна виявити 1% свинини у суміші з яловичиною, яка піддавалась термічній обробці при 120 С протягом 10 хвилин, після 30 циклів ампліфікації і 0,1% – після 35 циклів ампліфікації. Застосування як праймерів для ПЛР фрагментів мітохондріального цитохрому В і 20 різних ендонуклеаз для наступної рестрикції дозволило типувати м'ясо таких споріднених тварин, як олень, косуля, лань, серна, американський лось, північний олень, південно-африканська газель [4].

На даний час розроблена тест-система для визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у кормах і рибному борошні методом ПЛР, яка дозволяє виявити домішки м'ясного борошна масовою часткою 0,1% у складі рибного борошна, визначити видову належність тканин жуйних тварин у комбікормах для сільськогосподарських тварин і птиці, сухих и консервованих кормах для домашніх тварин, в сирих м'ясних продуктах і продуктах, які піддавались кулінарній обробці.

Останнім часом великого значення набуває визначення статі ембріонів великої рогатої худоби як додаток до запліднення і культивування ембріонів *in vitro*, оскільки це дозволяє накопичувати і пересаджувати ембріони бажаної статі. Передімплантаційна діагностика статі забезпечує можливість пересадки декількох ембріонів одному реципієнту, виключаючи при цьому вірогідність народження гетеросексуальних двоєн, а відповідно і фримартинізм у жіночих особин. Один із способів діагностики статі з допомогою ПЛР оснований на ампліфікації Y-специфічних повторюваних послідовностей. Використовуються, також, гомологічні однокопійні гени. Для контролю присутності ДНК, а також для попередження помилкової інтерпретації результатів (у випадку порушення реакцій з будь-яких причин чоловічі особини можуть бути прийняті за жіночі) ряд дослідників проводять одночасно ампліфікацію аутосомних генів [4].

Таким чином, з допомогою молекулярно-генетичних маркерів можна диференціювати сільськогосподарських тварин на носіїв та неносіїв цінних господарських ознак, генетичних, інфекційних захворювань, за статтю,

видовою і породною належністю. Це можна здійснювати на ранніх стадіях онтогенезу, задовго до фенотипового прояву характерної ознаки.

Напевно, наведена інформація стане корисною для удосконалення селекційної роботи, створення стад худоби з цільовим технологічним призначенням, сприятиме збереженню місцевих порід худоби як носіїв цінних генотипів, адже більшість із них перебувають на даний час у критичному стані.

## Тема № 8

### Методи відстані у філогенії

**Молекулярна філогенетика** – спосіб встановлення родинних зв'язків між живими організмами на підставі вивчення структури полімерних макромолекул – ДНК, РНК і білків.

Результатом молекулярно-філогенетичного аналізу є побудова філогенетичного дерева живих організмів. Близьке споріднення між живими організмами зазвичай супроводжується великим ступенем схожості в будові тих чи інших макромолекул, а молекули не споріднених організмів сильно різняться між собою [10].

*Молекулярна філогенія* використовує такі дані для побудови філогенетичного древа, які відображають гіпотетичний хід еволюції досліджуваних організмів. Можливість аналізувати і детально вивчати ці молекули з'явилася тільки в останні десятиліття ХХ століття. В якості ознак при побудові молекулярних філогенів можуть виступати імунологічні дані, будь-які дані аналізу конкретних молекул (наприклад фореграмми), дані по гібридизації молекул ДНК/РНК, самі первинні структури біополімерів [13].

Починаючи з 1950 року число філогенетических реконструкцій на основі молекулярних даних різко збільшується. Основними вихідними даними стають дані за первинними структурам біополімерів. Наслідками популярності даного підходу є розробка найрізноманітніших методів побудови філогенів і методів оцінки відстані між макромолекулами білка або ДНК/РНК.

**Мета філогенії** – з'ясування конкретного ходу еволюції живих організмів. **Об'єкт філогенії** – живі організми в їх безперервному еволюційному розвитку. Перед філогенетикою постає тимчасова послідовність популяцій, безперервні філогенетичні ряди, при цьому виділити окремі види неможливо. Філогенетична реконструкція вважається повною, якщо в ній зазначені простір і час розвитку груп, а також враховано ставлення "предок-нащадок". Як приклад найбільш повної філогенетичної реконструкції можна навести роботи О. Ковалевського з філогенії та еволюції роду кінських.

Молекулярна філогенетика вплинула на наукову класифікацію живих організмів. Методи роботи з макромолекулами стали доступні біологам найрізноманітніших спеціальностей, що призвело до швидкого накопичення нової інформації про живі організми. На підставі цих даних



старі припущення про еволюцію живих організмів переглядаються. Описують нові групи, в тому числі, що виділяються тільки на основі молекулярно-філогенетичних даних [10].

Основою філогенетичного аналізу з обчислювальної точки зору є порівняння первинних нуклеотидних або амінокислотних послідовностей і подальша візуалізація результатів порівняння. Порівняння біологічних послідовностей полягає в побудові вирівнювання вихідних послідовностей символів, що кодують нуклеотиди або амінокислоти. Оскільки в реконструкції філогенії бере участь безкіннченна кількість послідовностей, то говорять про множинне вирівнюванні. Алгоритми множинного вирівнювання використовують різні моделі для опису заміни, вставок або делецій в якості налаштувань. Залежно від обраної моделі, результати порівняння можуть відрізнятися. Для візуалізації результатів порівняння застосовується ряд методів, що відрізняються швидкодійним і точним відтворенням філогенетичного дерева. Для нівелювання варіацій побудованих дерев та отримання статистично значимого результату застосовують різні методи оцінки. Кожен з перерахованих кроків побудови характеризується вибором алгоритму або його налаштувань, які вирішальним чином можуть впливати на вид результуючого філогенетичного дерева. Вибір алгоритму визначається розв'язанням практичного завдання і перевагами дослідника. Тому часто програмні засоби для проведення філогенетичного аналізу надають набір інструментів, які дозволяють не тільки провести цілісний аналіз, але здійснити варіацію використовуваних алгоритмів [13].

Існує велика кількість методів побудови філогенії на підставі молекулярних даних. Їх можна поділити на два типи:

- Методи використовують оцінку генетичних дистанцій;
- Методи використовують аналіз дискретних ознак.

**Методи засновані на аналізі генетичних дистанцій.** Дана група методів базується на даних про генетичні дистанції. Загальний принцип полягає в попарному порівнянні об'єктів і побудові матриці дистанцій, яка потім використовується для побудови філогенетичного дерева.

*Вирівнювання молекулярно-генетичних послідовностей.* Реконструкція філогенії починається з множинного вирівнювання аналізованих послідовностей. Підхід, який використовується всіма практичними програмами множинного вирівнювання, такими як CLUSTALW і програмами, доступними в браузер-версії, такими як MSA, полягає в тому,

що намагаються знайти краще вирівнювання методом послідовних попарних вирівнювань.

CLUSTAL є дієвим засобом для проведення множинного вирівнювання як нуклеотидних, так і амінокислотних послідовностей. Вона може представляти результат своєї роботи в текстовому файлі і у вигляді побудованого філогенетичного дерева. Результат вирівнювання також може бути представлений у вигляді кольорового постскріпт-файлу. CLUSTAL дозволяє користувачеві контролювати налаштування задіяних для вирівнювання методів, таких як розрахунок матриці відстаней і штрафні коефіцієнти за розриви [10, 13].

*Методи обчислення відстаней між послідовностями.* При порівнянні послідовностей програмою оцінюється вирівнювання пари послідовностей на основі підрахунку у них числа мутацій. Такими мутаціями є заміщення, ділеції та вставки. Кожна з цих подій має певний ваговий коефіцієнт. Сума цих індивідуальних відмінностей зі своїми ваговими коефіцієнтами дорівнює відстані між послідовностями. Метод обчислення відстані дає єдину міру кількості еволюційних змін між двома геномами з часу відгалуження від загального предка. Існують кілька методів обчислення відстаней, які розрізняються наборами вагових коефіцієнтів, що мають сенс частот заміни нуклеотидів або амінокислот і «штрафів» за розриви. Мутаціям типу вставки і видалення в моделі обчислення відстаней надаються великі вагові коефіцієнти, ніж для мутації заміщення. Для розривів зазвичай діє афінна модель, згідно з якою значення коефіцієнтів для одиничних розривів більше, ніж для протяжних розривів.

Аналогічним способом можна ввести корекцію коефіцієнтів для множинних заміщень, що особливо корисно при аналізі еволюційно сильновіддалених ділянок ДНК і ділянок з швидкими еволюційними змінами. Найбільш простою є модель заміщень одиничних підстав, діючої для нуклеотидних послідовностей. У цьому випадку відстані між нуклеотидними послідовностями відносно прості для обчислень, тому що являють собою суму відмінностей між двома послідовностями. У загальному випадку, всі розбіжності для всіх нуклеотидних підстав вважаються рівноймовірними [13].

Іншою моделлю для нуклеотидних послідовностей є модель сайтозалежних заміщень. Дана модель враховує факт кодування амінокислот трьома нуклеотидами молекули ДНК і велику

взаємозамінність нуклеотидів в третій позиції без зміни кодуємої амінокислоти.

*Методи побудови філогенетичних дерев.* Для побудови філогенетичного дерева існує кілька методів, які зустрічаються в програмних засобах для філогенетичного аналізу. Їх можна розділити на методи основних обчислень відстаней і символні методи. Основні методи обчислюють попарні відстані між послідовностями і потім будують дерево без обліку самих послідовностей. Символьні методи використовують попарні відстані з урахуванням розподілу символів в послідовностях для отримання оптимальної топології дерева. Найбільш популярним і простим серед методів на основі обчислення відстаней є алгоритм попарного угруповання UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages). Алгоритм придбав популярність через свою простоту і високу швидкість. UPGMA алгоритм витягує з матриці відстаней значення для побудови спочатку найбільш прилеглої пари, а потім додає до неї нові пари, поки всі послідовності не будуть оброблені.

Іншим популярним методом є метод приєднання сусідів. Цей алгоритм є модифікацією попереднього, припускаючи різні швидкості еволюції для окремих гілок дерева. Для цього будується модифікована матриця відстаней. Алгоритм дає кращі результати, залишаючись при цьому ефективним в обчислювальному плані [10].

Для отримання кращих результатів застосовуються *метод гілок і меж*, що представляє собою компромісне рішення між швидкими евристичними алгоритмами і ретельним пошуком. Дерево будується за допомогою послідовного додавання вузлів, одночасно розраховується оцінка. Якщо оцінка часткового дерева гірше, ніж знайдена раніше, то відсікається з подальшого розгляду деякий безліч дерев і будується інше часткове дерево. Метод працює швидше, ніж повний пошук, але він все ще не дає оптимального рішення. Для великих баз даних застосування цього методу не рекомендується.

Інший метод це метод максимальної правдоподібності, намагається відновити філогенетичне дерево повною мірою використовуючи модель еволюції. Жоден інший метод не дасть більш точної інформації про дерево, але величезні обчислювальні витрати роблять цей метод самим повільним. У відповідність з обраною моделлю еволюції робляться припущення про ймовірності заміщень за даний відрізок часу одного нуклеотида на інший в даній позиції послідовності для всієї безлічі аналізованих послідовностей.

Оцінки правдоподібності для кожної позиції послідовності формують загальну оцінку. Для максимізації правдоподібності аналізуються всілякі комбінації довжин гілок. Потім шукається найкраща топологія дерева. Методи правдоподібності отримують краще результати, ніж методи на основі розрахунку відстаней і економії, але вони і менш за все поширені через високі обчислювальні витрати при роботі з реальними даними.

*Методи оцінки філогенетичних дерев* Для отриманого філогенетичного дерева корисно провести оцінку стійкості результатів реконструкції по відношенню до шумових даних. Для проведення оцінки філогенетичного дерева в програмних засобах маються реалізації декількох методів. Найбільш популярним методом є непараметричний аналіз [10, 13].

Параметричний аналіз відрізняється від непараметричного тим, що похідні набори даних генеруються з урахуванням деякої моделі еволюції послідовності. Інші методи оцінки мають більш вузьку сферу застосування. Метод відношення правдоподібності застосовуємо при побудові дерева алгоритмом максимальної правдоподібності. Керуючим параметром є значення величини правдоподібності по відношенню до нормального розподілу. Метод випадкових дерев заснований на припущенні, що дерево, побудоване на основі випадкових даних матиме симетричний вид, у тому час дерево на основі реальних даних завжди характеризуються асиметричністю. Тому велика асиметричність говорить про наявність сильно виражених «філогенетичних» даних, в той час як мала асиметричність вказує на значний шум у даних. Метод застосовуємо при побудові дерева алгоритмом максимальної економії. Інший метод для цього алгоритму має назву метод випадкових символів. В основі цього методу лежить перевірка гіпотези про те, що повне дерево або його окремі частини могли бути побудовані за випадковим даними. Для цього випадкові дані змішуються з даними вихідних послідовностей і на безлічі побудованих таким чином дерев помічається наскільки стійкими є включення реальних даних на тлі шуму [10].

#### **Методи аналізу дискретних ознак.**

*Метод Алгоритму.* На першому етапі в матриці дистанцій знаходять два таксона з найменшим значенням дистанції. Ці два таксона об'єднуються в один кластер (або складовий таксон). Оскільки в рамках даного методу приймається рівномірність швидкості молекулярної еволюції, то точка розгалуження (дивергенції) знаходиться на половині від

генетичної дистанції між двома цими таксонами. Надалі цей кластер з двох таксонів вважається єдиним цілим. Матриця дистанцій перераховується, при цьому приймається, що відстань між складовим таксоном і рештою таксонів однакова:

$$d_{uk} = (d_{u1k} + d_{u2k})/2$$

де,  $d$  – генетична дистанція,

$u$  – композитна послідовність,

$u_1$  і  $u_2$  – елементи композитної послідовності,

$k$  – таксони які не входять в композитну послідовність.

Потім знову вибираються два таксона які мають найменшу генетичну дистанцію, об'єднуються в кластер і будується нова матриця дистанцій і так далі.

**Метод Мінімальна еволюція** (*Minimum evolution*), метод базується на припущенні, що найбільш ймовірним буде дерево з найменшою кількістю еволюційних подій. Принципом даного методу є обчислення довжин гілок (яка відображає кількість еволюційних подій) усіх можливих топологій дерев:

$$S \equiv \sum_i^T b_i$$

де,  $b_i$  – оцінка довжин,

$T$  – загальна кількість гілок,

$i$  – елементи композитної послідовності

У якості найкращого, вибирається дерево з найменшою довжиною гілок. Якщо для кількох дерев з різною топологією довжини гілок не має статистично значущих відмінностей, то ці дерева розглядаються як рівномірні [13].

Таким чином, використання молекулярно-генетичних методів для дослідження споріднених відносин між різними породами домашніх тварин та їх дикими формами є перспективним, оскільки історія походження ряду порід, в першу чергу старих, аборигенних, документована недостатньо і у багатьох випадках невідомна. Крім того, вивчення дивергенції відстаней філогенії дозволяє отримати нові дані про еволюцію геномів під впливом гібридизації та селекції, здійснюваної людиною.

## Література.

1. Васильев А. Г. Феногенетическая изменчивость и методы ее изучения / А. Г. Васильев, И. А. Васильева, В. Н. Большаков // Учеб. пособие. – Екатеринбург : Издательство Уральского университета, 2007. – 279 с.
2. Дубинин Н. П. Генетика популяций и селекция / Н. П. Дубинин, Я. Л. Глембоцкий. – М. : Наука, 1967. – 591 с.
3. Генетика сільськогосподарських тварин / [В. С. Коновалов, В. П. Коваленко, М. М. Недвига та ін.] – К. : Урожай, 1996. – 432 с.
4. Гиль М. І. Методичні вказівки для вивчення матеріалу самостійної роботи на тему «Сучасні ДНК-технології у тваринництві» студентами спеціальності 6.130200-, 8.130201-“Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва” / М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2007. – 68 с.
5. Гиль М. І. Системний генетичний аналіз полігенно зумовлених ознак худоби молочних порід : Монографія / М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2008. – 478 с.
6. Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции / С. Г. Инге-Вечтомов // Учеб. для биол. ун-тов. – М. : Высш. шк., 1989. – 591 с.
7. Каратеева О. І. Вплив інтенсивності формування корів різних порід в їх ранньому постнатальному онтогенезі на продуктивність : дис. кандидата с.-г. наук : 06.02.01 / О. І. Каратеева. – Миколаїв, 2013. – 235 с.
8. Коваленко В. П. Моніторинг формування генофонду молочного скотарства країни та методи прискорення породоутворення в ньому / В. П. Коваленко, М. І. Гиль // Вісник аграрної науки Причорномор'я. – Миколаїв : МНАУ, 2010. – Вип. 3(55), Т. 2, Ч.1. – С. 78–93.
9. Крамаренко С. С. Метод использования энтропийно-информационного анализа для количественных признаков / С. С. Крамаренко // Известия Самарского центра Российской академии наук. – Самара, 2005. – Т.7., №1. – С. 242–247.
10. Лукашов В. В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / В. В. Лукашов – М. : БИНОМ, 2009. – 213 с.
11. Методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин / [М. В. Зубець, В. П. Буркат, Ю. Ф. Мельник та ін.; Наук. ред. І. В. Гузев]. – К. : Аграрна наука, 2007. – 120 с.

12. Меркурьева Е. К. Применение энтропийного анализа и коэффициента информативности при оценке селекционных признаков в молочном скотоводстве / Е. К. Меркурьева, А. Б. Бертазин // Доклады ВАСХНИЛ, 1989. – № 2. – С. 21–23.
13. Ней М. Молекулярная эволюция и филогенетика / М. Ней, С. Кумар. – Киев : КВЦ, 2004. – 340 с.
14. Пабат В. О. Фенетика великої рогатої худоби / В. О. Пабат, О. Л. Трофименко, Д. Т. Віннічук. – К. : ТОВ «Оріон», 2000. – 105 с.
15. Поліморфізм генів, асоційованих з господарсько корисними ознаками у великої рогатої худоби / [К. В. Копилова, К. В. Копилов, С. І. Тарасюк, О. І. Метлицька] // Вісник аграрної науки : Науково-теоретичний журнал НААН України. – 2006. – № 10 (642). – С. 52–58.
16. Трофименко О. Л. Генетика популяцій / О. Л. Трофименко, М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2003. – 226 с.
17. Уйллис Малькольм Б. Генетика собак / Малькольм Б. Уйллис. – Москва : Центрполиграф, 2000. – 608 с.

Навчальне видання

## **СПЕЦІАЛЬНА ГЕНЕТИКА**

Методичні рекомендації

Укладачі: **Гиль Михайло Іванович,**  
**Каратєєва Олена Іванівна**

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 3,50  
Тираж 25 прим. Зам. № \_\_

Надруковано у видавничому відділі  
Миколаївського національного аграрного університету  
54029, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013р