

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В. ЗУБЦЯ**

**К. Копилов, Л. Стародуб, А. Шельов, Н. Мохначова, Ю. Лесняк,
М. Добрянська**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
З ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОЦІНКИ ГЕНЕТИЧНОГО
ПОЛІМОРФІЗМУ І МІКРОЕВОЛЮЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА
МОНОЛОКУСНИМИ ТА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ ДІЛЯНКАМИ
ДНК У РІЗНИХ ВИДІВ СВІЙСЬКИХ ТВАРИН**

Чубинське, 2025

Методичні рекомендації схвалено і рекомендовано до друку вченою радою
Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН
14.11.2025 року (протокол № 11)

Рецензенти:

Роман Кулібаба – доктор с.-г. наук, професор, завідувач кафедри біології тварин НУБіП України;

Тетяна Супрович – доктор с.-г. наук, професор, завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби національної поліції України Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

Методичні рекомендації розробили:

Кирило Копилов, д-р с.-г. наук, проф., гол. наук. співроб.;

Любов Стародуб, д-р с.-г. наук, гол. наук. співроб.;

Андрій Шельов, д-р с.-г. наук, пров. наук. співроб.;

Наталія Мохначова, канд. с.-г. наук, пров. наук. співроб.;

Юрій Лесняк, канд. с.-г. наук, наук. співроб.;

Марія Добрянська, канд. с.-г. наук, ст. наук. співроб.

М 54 **Методичні** рекомендації з проведення досліджень та оцінки генетичного поліморфізму і мікроеволюційних процесів за монолокусними та мультилокусними ділянками ДНК у різних видів свійських тварин / К. Копилов, Л. Стародуб, А. Шельов, Н. Мохначова, Ю. Лесняк, М. Добрянська. Чубинське : ІРГТ ім.М.В. Зубця, 2025. 62 с.

У методичних рекомендаціях висвітлено основні теоретичні основи і представлено методичні підходи з проведення молекулярно-генетичних досліджень та математико-статистичного аналізу результатів за мультилокусними та монолокусними ділянками ДНК у різних видів.

Рекомендації розраховані на науковців та фахівців з генетики та розведення тварин, викладачів, аспірантів та студентів закладів вищої освіти аграрного профілю.

УДК 636:575.113:577.21

© К. Копилов, А. Шельов, Л. Стародуб, Н. Мохначова, Ю. Лесняк, М. Добрянська, 2025 р.

© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, 2025 р.

ЗМІСТ

	Ст.
ЗМІСТ.....	3
ВСТУП.....	4
1.1. ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ...	6
1.2. ПРОВЕДЕННЯ МІКРОСАТЕЛІТНОГО АНАЛІЗУ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ.....	8
1.2.1. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у великої рогатої худоби (<i>Bos Taurus</i>).....	9
1.2.2. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у коней (<i>Equus caballus</i>)	13
1.2.3. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у собак (<i>Canis familliaris</i>).....	15
1.2.4. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у свійської курки (<i>Gallus domesticus</i>).....	16
1.3. ДОСЛІДЖЕННЯ МУЛЬТИЛОКУСНИХ МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИХ ПХ) ДІЛЯНОК ДНК У ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ	18
1.3.1. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у великої рогатої худоби (<i>Bos Taurus</i>).....	18
1.3.2. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у кіз (<i>Capra aegagrus hircus</i>).....	19
1.3.3. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у коней (<i>Equus caballus</i>).....	20
1.3.4. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у водяного буйвола (<i>Bubalus bubalis</i>).....	20
1.4. ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ТА МІКРОЕВОЛЮЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА МОНОЛОКУСНИМИ (STR) ТА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ (ISSR) ДІЛЯНКАМИ ДНК У РІЗНИХ ВИДІВ (ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ).....	21
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	58

ВСТУП

У багатьох організмах тільки мала частина загальної послідовності геному кодує білки, а понад 90 % ДНК складається з сателітної ДНК, інтронів, тандемних повторів, транспозонів тощо. Некодуючі послідовності – ділянки ДНК послідовність яких не переводиться безпосередньо в амінокислотну послідовність білків. Причини існування такої великої кількості некодуючої ДНК в еукаріотичних геномах і величезна різниця в розмірах геномів – одна з наукових загадок. Частина некодуючої ДНК безпосередньо задіяна в регуляції активності кодуючих ділянок. Проте, функції її більшої частини невідомі. Численні проекти з сиквенування та аналізу ДНК в останні роки XX-го століття та на початку XI-го призвели до встановлення послідовностей та опису геномів багатьох організмів всіх головних таксономічних груп.

Результати наукових досліджень, отримані при вивченні структури і організації геномної ДНК тварин, рослин і мікроорганізмів, істотно вплинули на методологію їх систематизації, раніше заснованої, головним чином, на аналізі фенотипових ознак. Проблема адекватного віднесення конкретного організму до тієї чи іншої групи не є чисто академічною. Точність критеріїв систематики живих організмів, що визначає еволюційну спорідненість між ними, крім суто теоретичного представляє і практичний інтерес. Зокрема, ідентифікація мікроорганізмів важлива не тільки для медичної практики, а також і в інших областях, наприклад, при сертифікації продуктів харчування, при визначенні екологічної чистоти води, ґрунтів та ін. В даний час молекулярно-генетичні методи дозволяють здійснювати ідентифікацію особистості в судово-медичних дослідженнях, а також вирішувати в спірних випадках проблему визначення батьківства.

Застосування технологій генотипування в сільському господарстві дозволяють виявити особливості геному різних систематичних груп та встановити філогенетичні зв'язки між ними, спільність походження та наявність ідентичних ділянок у геномі різних видів дає можливість прогнозувати функції генів у одного виду, якщо ці функції відомі у близьких чи навіть віддалених видів, відкриває нові можливості для ефективного вирішення різних завдань сучасної селекції, таких як підтримка генетичних колекцій, підбір батьківських форм для схрещування, складання родоводів, контроль інтрогресії генетичного матеріалу, паспортизація і сертифікація сортів рослин та порід тварин, визначення ступеня гомозиготності, генетичної спорідненості, рівня внутрішньопородної та міжпородної генеалогічної диференціації, індивідуального генотипування, генетичного картування, паспортизації тварин, вивчення питань філогенії та походження видів [1–9].

Найбільш важливим підходом у дослідженні генетичного поліморфізму є використання методів молекулярного аналізу, які дозволяють отримувати індивідуальну характеристику окремого генотипу – ДНК-профіль. Існуючі методи ДНК-типування геномів відрізняються за складністю, надійністю і обсягом одержуваної інформації. Для надійного розрізнення та ідентифікації

генотипів, дослідження філогенетичних взаємозв'язків і інтрогресії генетичного матеріалу, перспективним є метод аналізу поліморфізму гіперваріабельних послідовностей геному, який дозволяє отримувати відтворювані, інформативні профілі фрагментів геному.

Послідовності ДНК розділяють на мультилокусні (RAPD, AFLP, ISSR), монолокусні (STMS, SNP, SSCP) та інші. Дослідження мультилокусних маркерів засноване на застосуванні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Суть методу ISSR-ПЛР (*Inter-simple-sequence-repeats*) полягає у використанні мікросателітних локусів як ділянок випалу праймерів, комплементарних мікросателітним повторам (4–12 одиниць повтору) і мають на одному 5' чи 3'–кінці 1–4 якірних нуклеотиди, які визначають місце випалу праймера. Такі праймери уможливають ампліфікацію фрагментів ДНК, які розташовані між мікросателітними послідовностями. Отримані паттерни видоспецифічні. ISSR – маркери відносять до маркерів домінантного типу успадкування поліморфізм яких виявляється наявністю чи відсутністю фрагментів спектр яких істотно відрізнятися між таксонами. Даний метод застосовується для вивчення генетичної структури, як на міжвидовому, так і на внутрішньовидовому рівнях, а також може використовуватися для генетичного картування, паспортизації тварин, і для вивчення питань філогенії та походження видів. [10–16].

Повторювальні послідовності розділяють на два класи: дисперсні послідовності та тандемні повтори. Дисперсні послідовності залежно від довжини класифікують на довгі інтерсперсійні елементи (LINEs) довжиною більш як 1000 п.н. і короткі (SINEs) – менш як 500 п.н. Функція цих елементів наразі до кінця не відома. Тандемні повтори – багатократні повтори окремих послідовностей число яких у тварин різних видів дуже варіює і характеризується ступенем гетерозиготності понад 90 %. Залежно від довжини повторюваних фрагментів їх ділять на декілька класів: максі – (довжина понад 5×10^5 п.н.), міні – (довжина тандемно повторюваної послідовності 10 – 60 п.н.) та мікросателіти з довжиною мотиву 1–6 п.н. Мінісателіти застосовують в «геномній дактилоскопії» (ДНК-фінгерпринт). Основним механізмом виникнення і існування поліморфізму в мінісателітах вважають нерівний кросинговер та генну конверсію, а високу варіабельність зв'язують з ініціатором мутацій, який фланкує повтор та активацією мутагенних систем геному. Мікросателіти дисперговані тандемно повторювальні моно-, ди-, три-, тетра – та пентануклеотидні послідовності, розмір яких становить у середньому не більше 100 п.н. Ці маркери мають декілька назв: мікросателіти, STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Site*), STR (*short tandem repeat*), SSR (*simple sequence repeat*). Поліморфізм STR маркерів визначається різним копіюванням мономерних одиниць у кластері. Перевагою мікросателітних локусів є їх велика гетерозиготність, наявність досить великої кількості алелів (в середньому 6–10 на локус), які мають кодомінантний характер успадкування. Це дає змогу чітко відрізнити гомозиготу від гетерозиготи і контролювати гени, що отримані від батьків. Частота мутацій мікросателітів 10^{-9} – 10^{-10} . У роботах з визначення батьківства у людей встановлена середня частота мутацій на один локус (на

одне покоління) і дорівнює 10^{-3} , а миші, вівці, свині 10^{-3} – 10^{-4} , $1,3 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-5}$, відповідно. Припускають, що така висока частота мутацій мікросателітів виникає або при помилках реплікації окремої ДНК, або в процесі рекомбінації між молекулами ДНК. Вони є універсальною системою генетичних маркерів для аналізу змін, що успадковуються на рівні ядерної ДНК і застосовуються у тваринництві, як для аналізу еволюційних зв'язків між різними породами сільськогосподарських тварин, визначення часу появи тієї чи іншої породи так і при експертизі походження, дослідженнях генетичного поліморфізму різних видів тварин [17–25]. Оскільки алельні варіанти поліморфних систем не змінюються протягом індивідуального розвитку особини, не залежить від віку, хвороб, фізіологічного стану тварини і зовнішніх впливів оточуючого середовища генетичне тестування тварин проводять один раз за життя. Мікросателітні ДНК маркери використовують у дослідженнях генетичної мінливості, картографуванні геномів, аналізі взаємозв'язків особин та популяцій, оцінці рівнів інбридингу (Fis), аналізі генетичної структури субпопуляцій та популяцій, оцінці ефективного розміру популяції (Ne) і дрейфу генів між популяціями у різних видів – великої рогатої худоби, коня свійського [26–35], аналізі та дослідженнях з молекулярно-генетичної еволюції геному курки, оцінці мікроеволюційних процесів та генетичного різноманіття [36–44] дослідженнях собак [45–47] та багатьох інших видів. Відповідно до рекомендацій *International Society of Animal Genetics – ISAG/FAO*, запропоновані панелі найбільш інформативних мікросателітних маркерів, для деяких видів сільськогосподарських тварин, які дають можливість оцінки достовірності походження племінних тварин та племінного матеріалу для їх паспортизації.

1.1. ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для молекулярно-генетичних досліджень придатним є різноманітний біологічний матеріал: кров, біоптати, волосся (шерсть), ембріони, молоко, ооцити, а також нативна, охолоджена та кріоконсервована сперма та інші тканини.

Забір *крові* проводиться з яремної вени одноразовим шприцем об'ємом 5–10 мл або вакуумними системами типу *Venoject*, *Vacutainer* та ін. (з ЕДТА або цитратом натрія). При заборі в шприц, кров переноситься в одноразові пробірки з антикоагулянтом (3 % розчин ЕДТА (трилон Б) із розрахунку 10:1 або 3,8 % розчином цитрата Na у співвідношенні 1:9). *Гепарин як антикоагулянт – не використовувати!*

Пробірку з кров'ю необхідно зберігати у холодильнику при температурі ($+4^{\circ}\text{C}$) до 5 годин. При неможливості швидкої доставки матеріалу для тривалого зберігання кров заморожують при (-20°C). Наступне транспортування здійснюється в замороженому стані.

Сперма відбирається в одноразові стерильні пробірки або паєти. Сперму для виділення ДНК можна використовувати як нативну, так і заморожену. Транспортування та зберігання аналогічне з вимогами зберігання крові.

Відбір біоптатів. Біоптати можуть мати різне походження. Для ДНК-аналізу можна використовувати вищипи з вуха, які залишаються при міченні тварин. Термін зберігання шматочків розміром від 5х5 мм при температурі 4°C – 3–4 доби, у замороженому стані (-20°C і нижче) – необмежений.

Під час відбору кожен пробу маркують індивідуальним номером. Складають акт про відбір проб у довільній формі, в якому вказують повну назву підприємства/власника, де зроблено відбір біоматеріалу, час відбору, його вид, записують номери тварин та відповідні номери проб.

Виділення ДНК проводять за декількома методиками в залежності від мети дослідження. За умови, якщо метою дослідження є скринінговий експрес-аналіз певної групи тварин на наявність генетичних аномалій чи особливостей, ДНК виділяють експрес-методом у невеликій кількості, термін зберігання такої проби – 1–2 доби.

З метою зберігання проби тривалий час і використання для ряду аналізів – ДНК виділяють відповідним методом. Такий ДНК-зразок може зберігатися декілька років.

Методи виділення ДНК:

Експрес-метод виділення ДНК з різних тканин за допомогою реагента "Chelex-100".

Виділення ДНК із крові: до 200–500 мкл крові або гомогенізованих тромбів додають 1000 мкл стерильної дистильованої води та перемішують на мікрозмішувачі типу «Vortex»; суміш інкубують протягом 15–30 хв. за кімнатної температури, періодично перемішують шляхом струшування; центрифугують протягом 1 хв. при 6000 об/хв.; обережно видаляють надосадову рідину, залишають 20–30 мкл рідини над осадом додають 170–180 мкл 5%-ного стерильного водяного розчину «Chelex-100»; інкубують протягом 15–30 хв. за температури 56°C; ретельно перемішують шляхом струшування та витримують 8 хв. на водяній бані за температури 100°C; ретельно перемішують шляхом струшування; центрифугують протягом 5 хв. при 6 000 об/хв.

Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК. Зразки зберігають при температурі -20°C. Після кожного розморожування зразки перемішують та центрифугують протягом 5 хв. при 6000 об/хв.

Виділення ДНК із сперми: до 3 мкл нативної сперми додають 200 мкл 5 % стерильного водного розчину, «Chelex-100»; до суміші додають 2 мкл протеїнази К концентрацією 10 мг/мл та 7 мкл дітіотрейтолу; обережно перемішують шляхом струшування та інкубують зразки 30–60 хв. за температури 56°C; перемішують вміст пробірок на мікрозмішувачі та інкубують 8 хв. при температурі 100°C; перемішують на мікрозмішувачі та центрифугують 2–5 хв. при 8000–10000 об/хв.

Зразки зберігають за температури -20°C. Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК.

Концентрацію та ступінь очищення ДНК визначають спектрофотометрично (спектрофотометр СФ-46) при довжині хвилі 260 та 280 нанометрів. Нативність ДНК визначають шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі за умови відсутності

"шлейфу" фрагментів ДНК та інтенсивності флуоресценції бромистого етидію при ультрафіолетовому опромінюванні електрофореграм.

Виділення ДНК проводять за використанням стандартних наборів для виділення ДНК, відповідно до протоколу виробника.

Обладнання для проведення ПЛР: ампліфікатор (термоциклер); генетичний аналізатор; автоматичні мікропіпетки (0,5–200 мкл) для відбору зразків; центрифуга для пробірок типу «Eppendorf» (частота обертання ротора до 14000 об/хв); прилади для вертикального (у поліакриламідному гелі) та горизонтального (в агарозному гелі) електрофорезу; транслюмінатор; система для фото- або цифрової документації результатів.

Реакційна суміш для проведення ПЛР (уміщує реакційний буфер для проведення ПЛР з $MgCl_2$ або без нього, оптимізований для конкретної термостабільної ДНК-полімерази, суміш чотирьох дезоксинуклеотид-трифосфатів; праймер, високоочищену (деіонізовану) воду. Реактиви поставляються у готовому вигляді фірмами-виробниками.

Електрофоретичне розділення ISSR-маркерів проводять в 2%, 4% агарозному гелях у тріс-боратному електрофорезному буфері (TBE: 0,0879 М Тріс, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА рН 8.0). Для нанесення зразків на гель використовують буфер такого складу: 0,25% бромфеноловий синій, 0,25% ксилолціанол, 30% гліцерин. Електрофорез проводять 1–3 години при напрузі 2 в/см геля. Фарбування гелів здійснюють за допомогою бромистого етидію (0,5 мкг/мл) 10 хв. з послідуною їх багаторазовою відмивкою у дистильованій воді. Візуалізація проводиться на транслюмінаторі в УФ-світлі при довжині хвилі 380 нм після забарвлення гелю етидієм бромідом.

Розміри, отриманих в ПЛР або в результаті рестрикції продуктів, виявляють за допомогою маркеру молекулярних мас, наприклад, *GeneRuler DNA Ladder Mix ready-to-use*, "Fermentas".

1.2. ПРОВЕДЕННЯ МІКРОСАТЕЛІТНОГО АНАЛІЗУ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ

На сьогодні, відповідно до рекомендацій ISAG/FAO (*International Society of Animal Genetics*), запропоновані панелі найбільш інформативних мікросателітних маркерів для різних видів тварин, в тому числі і для ВРХ, які дають можливість оцінки генетичної структури та достовірності походження тварин та племінного матеріалу з вірогідністю 99,99%.

Дослідження генетичної структури за мікросателітними маркерами проводять на генетичних аналізаторах, наприклад ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) з використанням, наприклад, наступного обладнання: програмований термостат (ампліфікатор) Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, США), твердотільний термостат типу "Dray-block", $t = 95\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; УФ-бокс для ПЛР UVC/T (Biosan, Латвія); центрифуга Eppendorff 5715R (Eppendorf, Німеччина); стерильна ламінарна шафа 2-го кл.захисту, БАВп-01 – «Ламінар-С»-1,2;

мікрозмішувач «Vortex»; магнітний змішувач з підігрівом IKA RH basic2 (IKA-WE3RKE, Germany); SpeedVac Concentrator DNA 120 (Therma); набір дозаторів піпеточних змінного об'єму від 0,5 до 200 мкл відповідно до ДСТУ ISO 9001, (Eppendorf, Німеччина); пробірки пластикові одноразові для ПЛР ємністю 0,2–0,5 мл відповідно до ДСТУ ISO 9001, (Eppendorf, Німеччина); одноразові наконечники для ПЛР ємністю 0,2–1,0 мл відповідно до ДСТУ ISO 9001, (Eppendorf, Німеччина); реакційні планшети на 96 лунок, типу «Microamp» (Applied Biosystems, США); транслюмінатор TM 36 LCF 900 122 V, (UVP, США); спектрофотометр СФ – 46; камери для горизонтального гелелектрофорезу; блок живлення (джерело постійного струму 300±10В), «Б-5-50»; холодильна камера на (-20°C), «NORD»; ваги «OHAUS»; термостати «ТС – 80М-2» на 28 – 60°C; магнітна мішалка МН; лабораторний посуд (колби 25–1000 мл, мірні стакани об'ємом 25–1000 мл).

1.2.1. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у великої рогатої худоби (*Bos Taurus*)

Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК, наприклад, (табл. 1).

Таблиця 1

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації великої рогатої худоби

Локус	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п.н.	Структура мікросателітної послідовності
TGLA126	D20S1	111–127	(TG) _n
TGLA122	D21S6	136–182	(AC) _n (AT) _n
INRA023	D3S10	201–225	(AC) _n
ETH003	D19S2	100–128	(GT) _n AC(GT) ₆
ETH225	D9S2	139–157	(TG) ₄ CG(TG)(CA) _n
BM1824	D1S34	176–188	(GT) _n
TGLA227	D18S1	76–104	(TG) _n
BM2113	D2S26	124–146	(CA) _n
ETH10	D5S3	206–222	(AC) _n
SPS115	D15	247–261	(CA) _n TA(CA) ₆

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 2).

Порядок проведення.

1. Відбирають і маркують необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 мл;
2. По 10 мкл готової реакційної суміші (табл. 3) розносять в чисті пробірки;
3. Використовуючи накінецьник для дозатора з аерозольним фільтром додують по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;

4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 4.);

5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 2

Послідовності праймерів для дослідження

Локус	Послідовність праймерів		Барвник
TGLA126	F: R:	CTAATTTAGAAATGAGAGAGGCTTCT TTGGTCCTCTATTCTCTGAATATTCC	TAMRA
TGLA122	F: R:	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC	R6G
INRA023	F: R:	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC	TAMRA
ETH003	F: R:	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	R6G
ETH225	F: R:	GATCACCTTGCCACTATTTCTCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	R6G
BM1824	F: R:	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG	R6G
TGLA227	F: R:	GGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	FAM
BM2113	F: R:	GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	FAM
ETH10	F: R:	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	FAM
SPS115	F: R:	AAAGTGACACAACAGCTTCACCAG AACCGAGTGTCTTAGTTTGGCTGTG	FAM

Таблиця 3

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5x blue 1,5mM Mg ²⁺	3,00
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 1.76 mM	1,5
3.	Taq-polymerase 5 U/мкл	0,25
4.	Суміш праймерів	2,75
5.	Деіонізована вода	1,50
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		10,0

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °C	Час	Кількість циклів
95	10 хв	1
95	45с	35
60	45с	
72	60 с	
72	60 хв	1
25	120 хв	1
4	Зберігання	

Проведення фрагментного аналізу (для всіх видів)

Після закінчення реакції пробірки переміщують в зону для проведення аналізу результатів на генетичному аналізаторі.

Порядок роботи.

1. Ампліфіковану ДНК готують до проведення аналізу на ABI Prism генетичному аналізаторі.

2. Готують суміш з 1 мкл ПЛР-зразку, 20,0 мкл Hi-Di™ формаміду (Sigma, США), 0,5 мкл GeneScan-500 LIZ™ стандарту (Applied Biosystems, США).

3. Суміш ретельно перемішують на вортексі і струшують краплі зі стінок пробірки центрифугуванням за 5 тис. об/хв. протягом 15 с.

4. Зразки 2 хв. денатурують за 94°C, після цього витримують 3 хв. за 0°C.

5. Зразки переносять в реакційну планшету на 96 лунок у відповідні лунки.

6. Планшету поміщують у ABI Prism генетичний аналізатор і виконують аналіз згідно інструкції виробника.

Визначення розмірів алелів здійснюють за допомогою програмного забезпечення “GeneMapper 3.7” (Applied Biosystems, США) із використанням розмірного стандарту GeneScan-500 LIZ™ стандарту (Applied Biosystems, США).

В процесі проведення капілярного електрофорезу досліджуваних зразків комп'ютерна програма «Genescan» (Applied Biosystems, США) визначає розмір флюоресцентно мічених ПЛР-продуктів (у парах нуклеотидів) і зберігає отримані дані. Потім збережені дані експортують в комп'ютерну програму GeneMapper (Applied Biosystems, США) для проведення генотипування.

Результати програмного опрацювання можуть бути надані, у графічному вигляді (карта піків, з вказівкою розмірів фрагментів і відносною інтенсивністю піків) (Рис. 1).

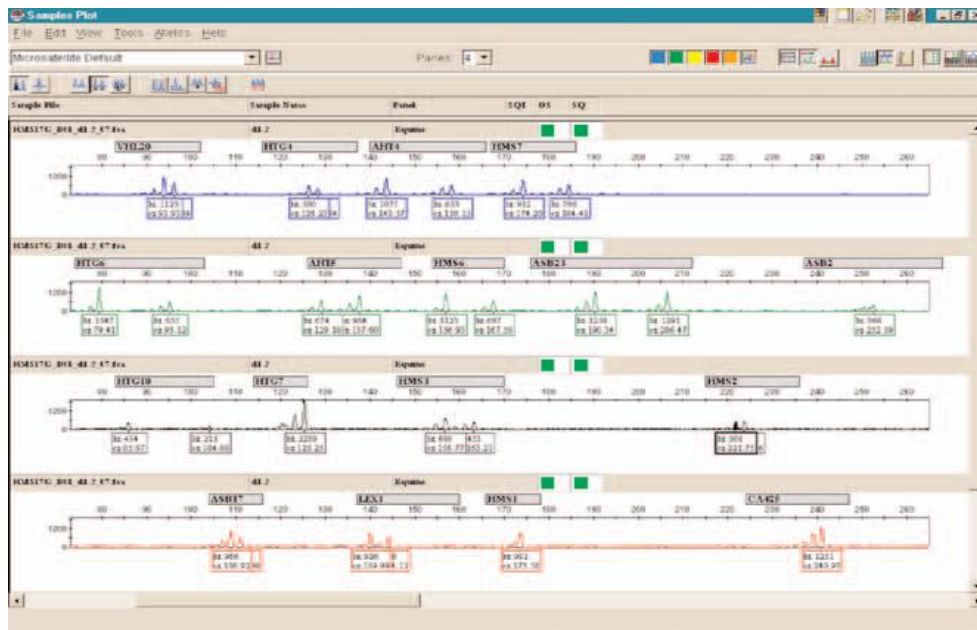


Рис. 1 Результат програмного опрацювання у графічному вигляді.

Результатом успішної ампліфікації алелю є основний пік, що асоціюється з цілою низкою додаткових піків меншої інтенсивності, що отримуються в результаті так званого «ковзання» полімерази. Кількість основних піків залежить від кількості алелів даного локусу в геномі досліджуваної тварини. Якщо кількість піків – один – гомозигота, якщо – два основних піки – гетерозигота.

З метою розробки ефективної системи генотипування за SSR-маркерами та дослідження ДНК-структури порід різних видів ми пропонуємо проведення мультиплексного ампліфікування генотипів за комплексом мікросателітних маркерів, що дозволяє оптимізувати процес аналізу. Для створення мультиплексу враховувано розміри мікросателітних локусів, що були обрані для типування генотипів тварин, барвник яким позначено маркер та співвідношення GC складу. Врахувавши ці показники нами розроблено та відпрацьовано наступні мультиплексні поєднання:

– *велика рогата худоба (Bos Taurus)* – 3 мультиплексні комбінації:

1. TGLA227, BM2113, TGLA122, ETH003;
2. TGLA126, INRA023;
3. ETH225, BM1824;

– *коні (Equus caballus)* – 4 мультиплексні комбінації:

1. HTG04, HMS06, HTG06;
2. ANT04, HTG07, ASB23;
3. VHL20, CA425, HMS03;
4. HMS07; ASB17;

– *собаки (Canis familiaris)* – 2 мультиплексні комбінації:

1. PEZ01, PEZ06, PEZ08;
2. FHC2010, FHC2054

– *свійська курка (Gallus domesticus)* – 2 мультиплексні комбінації:

1. ADL0268, MCW0248, MCW0216;
2. ADL0278, LEI0094.

1.2.2. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у коней (*Equus caballus*)

Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК, наприклад, (табл. 5).

Таблиця 5

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації коней

Назва локусу	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п. н.	Структура мікросателітної послідовності
HTG04	9	127–139	(TG) _n AT(AG) ₅ AAG(GA) ₅ ACAG(AGGG) ₃
HMS06	4	151–169	(GT) _n
АНТ04	24q14	144–164	(AC) _n AT(AC) _n
ASB23	3q22.1–q22	128–154	(TG) _n and (TG) _n TT(TG) ₄
HTG07	4	118–128	(TG) ₁₉
HTG06	15q26–q27	84–102	(TG) _n
CA425	28q18	226–246	(GT) _n
VHL20	30	87–105	(TG) ₁₇
HMS03	9	148–170	(TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n and (TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n GA(CA) ₅
HMS07	1q25	165–185	(AC) ₂ (CA) _n
ASB17	2q14p15	87–129	(AC) _n

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 6).

Порядок проведення.

1. Відбирають і маркують необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 мл;
2. По 15 мкл готової реакційної суміші (табл. 7) розносять в чисті пробірки;
3. Використовуючи накінецьник для дозатора з аерозольним фільтром додають по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;
4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 8.);
5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та пере носять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 6

Послідовності праймерів для дослідження

Назва локусу	Послідовність праймерів		Барвник
HTG04	F: R:	CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	FAM
HMS06	F: R:	GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAACCTCA	R6G
HTG06	F: R:	CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT	R6G
ATH04	F: R:	AACCGCCTGAGCAAGGAAGT GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	FAM
ASB23	F: R:	GCAAGGATGAAGAGGGCAGC CGTGTGGGTAGATGAGAAGTC	R6G
ASB17	F: R:	ACCAGTCAGGATCTCCACCG GAGGGCGGTACCTTTGTACC	TAMRA
CA425	F: R:	AGCTGCCTCGTTAATTCA CTCATGTCCGCTTGTCTC	R6G
HTG07	F: R:	CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	TAMRA
HMS03	F: R:	CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT CCAACCTCTTGCACATAACAAGA	TAMRA
VHL20	F: R:	CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	FAM
HMS07	F: R:	CAGGAAACTCATGTTGATACCATC TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	FAM

Таблиця 7

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5x blue 1,5мМ Mg ²⁺	2,5
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 1.76 мМ	4,0
3.	Taq-polymerase 5 U/мкл	0,5
4.	Суміш праймерів, по 5pM/мкл кожного	4,0
5.	Деіонізована вода	3,0
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		15,0

Таблиця 8

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °C	Час	Кількість циклів
95	10 хв	1
95	30с	30
60	30с	
72	60 с	
72	90 хв	1
4	Зберігання	

Проведення фрагментного аналізу відповідно до 1.2.1.

1.2.3. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у собак (*Canis familiaris*)

Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК, наприклад, (табл. 9).

Таблиця 9

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації собак

Назва локусу	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п. н.	Структура мікросателітної послідовності
PEZ01	CFA8	92–136	TACA
PEZ06	CFA16	164–216	(GAAA) _n
PEZ08	CFA17	215–257	AAAG-
FHC2010	CFA24	208–260	(ATGA) _n
FHC2054	CFA12	131–183	(GATA) _n

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 10).

Таблиця 10

Послідовності праймерів для дослідження

Назва локусу	Послідовність праймерів		Барвник
PEZ01	F: R:	GGCTGTCACTTTTCCCTTTC CACCACAATCTCTCTCATAAATAC	FAM
PEZ06	F: R:	ATGAGCACTGGGTGTTATAC ACACAATTGCATTGTCAAAC	FAM
PEZ08	F: R:	TATCGACTTTATCACTGTGG ATGGAGCCTCATGTCTCATC	FAM
FHC2010	F: R:	AAATGGAACAGTTGAGC ATGCCCCCTTACAGCTTCATTTTCC	FAM
FHC2054	F: R:	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG ATGCTGAGTTTTGAACCTTCCC	FAM

Порядок проведення.

1. Відбирають і маркують необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 мл;
2. По 9 мкл готової реакційної суміші (табл. 11) розносять в чисті пробірки;
3. Використовуючи накінечник для дозатора з аерозольним фільтром додають по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;
4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 12.);
5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 11

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5x blue 15мМ Mg ²⁺	2,00
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 2 мМ	0,50
3.	Taq-polymerase 1,5 U/мкл	0,15
4.	Суміш праймерів, по 5рМ/мкл, кожного	1,0
5.	Деіонізована вода	4,35
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		10,0

Таблиця 12

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °С	Час	Кількість циклів
94	4 хв	1
94	15с	35
60	15с	
72	25 с	
72	5 хв	1
4	Зберігання	

Проведення фрагментного аналізу відповідно до 1.2.1.

1.2.4. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) свійської курки (*Gallus domesticus*)

Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК, наприклад, (табл. 13).

Таблиця 13

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації свійської курки

Назва маркеру	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п. н.	Структура мікросателітної послідовності
ADL0268	1	127–139	(GT) ₁₂
ADL0278	8	108–122	(TG) ₁₈
MCW0248	1	215–223	(AC) ₉
LEI0094	4	259–283	(AC) ₁₆
MCW0216	13	141–145	(GT) ₉

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 14).

Таблиця 14

Послідовності праймерів для дослідження

Назва локусу	Послідовність праймерів		Барвник
ADL0268	F: R:	CTCCACCCCTCTCAGAACTA CAACTTCCCATCTACCTACT	FAM
ADL0278	F: R:	CCAGCAGTCTACCTTCCTAT TGTCATCCAAGAACAGTGTG	FAM
MCW0248	F: R:	GTTGTTCAAAAGAAGATGCAG TTGCATTAACTGGGCACTTTC	FAM
LEI0094	F: R:	GATCTCACCAAGTATGAGCTGC TCTCACACTGTAACACAGTGC	FAM
MCW0216	F: R:	GGGTTTTACAGGATGGGACG AGTTTCACTCCCAGGGCTCG	FAM

Порядок проведення.

1. Відбирають і маркують необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 мл;
2. По 9 мкл готової реакційної суміші (табл. 15) розносять в чисті пробірки;
3. Використовуючи накінецьник для дозатора з аерозольним фільтром додають по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;
4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 16.);
5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 15

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5x blue 15мМ Mg ²⁺	2,0
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 2 мМ	1,0
3.	Taq-polymerase 5 U/мкл	0,15
4.	Суміш праймерів	2,5
5.	Деіонізована вода	1,85
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		10,0

Таблиця 16

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °С	Час	Кількість циклів
94	4 хв	1
94	15с	35
60	15с	
72	25 с	
72	5 хв	1
4	Зберігання	

Проведення фрагментного аналізу відповідно до 1.2.1.

1.3. ДОСЛІДЖЕННЯ МУЛЬТИЛОКУСНИХ (МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИХ) ДІЛЯНОК ДНК У ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ

1.3.1. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у великої рогатої худоби (*Bos Taurus*)

Генотипування тварин за ISSR-маркерами проводять методом ISSR-ПЛР з використанням в якості праймерів мікросателітних локусів, при цьому відбувається ампліфікація ДНК-фрагментів, розташованих між інвертованими послідовностями мікросателітних локусів. В аналіз включають амплікони (фрагменти), які стабільно відтворюються не менш ніж у трьох повторях процедури ампліфікації.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл: H₂O – 3,0 мкл; 5x буфер (67 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 17 мМ (NH₄)₂ SO₂, 2,5 мМ MgCl₂, 0,1% Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% гліцерин) – 1,0 мкл; 10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) –

1,0 мкл; праймер (70 нг) – 0,8 мкл; Таq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл; ДНК 50–100 нг – 4,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагментів тринуклеотидних повторів мікросателітних локусів (GAG)₆C, та (ACC)₆G: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 30 циклів: денатурація – 95°C – 30 сек; випал праймерів – 64°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів динуклеотидних повторів (GA)₉C та (AG)₉C: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 30 циклів: денатурація – 95°C – 30 сек; випал праймерів – 57°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2% агарозному гелі методом електрофорезу в 1 x TBE-буфері. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

1.3.2. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у кіз (*Capra aegagrus hircus*)

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл: H₂O – 3,0 мкл; 5x буфер (67 mM Трис-НС1 (рН 8,3), 17 mM (NH₄)₂ SO₂, 2,5 mM MgCl₂, 0,1% Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% гліцерин) – 1,0 мкл; 10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл; праймер (70 нг) – 0,8 мкл; Таq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл; ДНК 50–100 нг – 4,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагментів тринуклеотидних повторів мікросателітних локусів (GAG)₆C, (CTC)₆C та (ACC)₆G: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 30 циклів: денатурація – 95°C – 30 сек; випал праймерів – 64°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів динуклеотидних повторів (GA)₉C та (AG)₉C: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 30 циклів: денатурація – 95°C – 30 сек; випал праймерів – 57°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів повторів (GA)₆CC та (AG)₈CA: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 30 циклів: денатурація – 95°C – 30 сек; випал праймерів – 54°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймера повтору (AG)₈CG: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 30 циклів: денатурація – 95°C – 30 сек; випал праймерів – 56°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2% агарозному гелі методом електрофорезу в 1 x TBE-буфері. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера

молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

1.3.3. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у коней (*Equus caballus*)

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл: H₂O – 3,0 мкл.; 5х буфер (67 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 17 мМ (NH₄)₂ SO₂, 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 % Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% гліцерин) – 1,0 мкл; 10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл; праймер (70 нг) – 0,8 мкл; Taq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл; ДНК 50–100 нг – 4,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагменту тринуклеотидного повтору мікросателітного локусу (СТС)₆C : початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 30 циклів: денатурація – 95°C – 30 сек ; випал праймерів – 64°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів динуклеотидних повторів (GA)₉C та (AG)₉C: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 30 циклів: денатурація – 95°C – 30 сек ; випал праймерів – 57°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні (AG)₈CA: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 30 циклів: денатурація – 95°C – 30 сек ; випал праймерів – 54°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні (AG)₈CG: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 30 циклів: денатурація – 95°C – 30 сек ; випал праймерів – 56°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2% агарозному гелі методом електрофорезу в 1 х TBE-буфері. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

1.3.4. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у водяного буйвола (*Bubalus bubalis*)

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл: H₂O – 4,4 мкл, 5х буфер (67 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 17 мМ (NH₄)₂ SO₂, 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 % Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8 % гліцерин) – 2,0 мкл; 10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл; праймер (70 нг) – 0,4 мкл; Taq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл; ДНК 50-100 нг – 2,0 мкл.

Режим проведення ПЛР: при використанні в якості праймерів фрагментів тринуклеотидних повторів мікросателітних локусів (GAG)₆C, (СТС)₆C та (ACC)₆G: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 35 циклів: денатурація – 94,5°C

– 30 сек ; випал праймерів – 64°C – 30 сек; синтез – 72°C – 2 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймера динуклеотидного повтора (AG)₉C: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 35 циклів: денатурація – 94,5°C – 30 сек ; випал праймерів – 57°C – 30 сек; синтез – 72°C – 2 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів повторів (GA)₆CC та (AG)₈CA: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 35 циклів: денатурація – 94,5°C – 30 сек.; випал праймерів – 54°C – 30 сек.; синтез – 72°C – 2 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів повтора (AG)₈CG: початкова денатурація – 2 хв. при 95°C; 35 циклів: денатурація – 94,5°C – 30 сек.; випал праймерів – 56°C – 30 сек.; синтез – 72°C – 2 хв.; термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2% агарозному гелі методом електрофорезу в 1 х TBE-буфері. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

1.4. ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ТА МІКРОЕВОЛЮЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА МОНОЛОКУСНИМИ (STR) ТА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ (ISSR) ДІЛЯНКАМИ ДНК У РІЗНИХ ВИДІВ

Основні формули, що використовуються для обчислення основних популяційно-генетичних характеристик наведено нижче.

Для розрахунку генної частоти за відсутності домінування використовували наступну формулу:

$$P_i = \frac{2n_{ii} + n_{12} + n_{13} + n_1(k-1)}{2n},$$

де n_{ii} – кількість гомозиготних особин за одним з алелів, n_{12} , n_{13} – кількість гетерозиготних тварин, n – загальна кількість тварин досліджених за даним локусом;

Стандартну похибку для частот алеля P_i обчислюють за формулою:

$$m = \frac{\sqrt{P_i(1-P_i)}}{2n},$$

Достовірність різниці частот алелів серед різних популяцій тварин, що досліджуються розраховували за методом Фішера:

$$F_\phi = (\phi_1 - \phi_2)^2 \frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2},$$

Де n_1 та n_2 об'єми груп, що порівнюються, а $\phi = 2 \frac{\pi}{180} \arcsin \sqrt{P}$, де P – частота алеля.

Перевірка популяції на відповідність генетичній рівновазі Харді-Вайнберга проводять за допомогою критерію χ^2 Пірсона:

$$\chi^2 = \frac{\sum (\Phi - T)^2}{T}$$

де χ^2 – стандартні значення критерію;

Φ – фактична кількість генотипів;

T – теоретична кількість генотипів.

При оцінці рівня генетичної мінливості ми використовували показники фактичної гетерозиготності:

$$H_o = \frac{1}{n} \sum_j^n h_j,$$

де h_j – кількість гетерозигот на об'єм вибірки, осереднене за всіма досліджуваними локусами (n);

очікуваної гетерозиготності:

$$H_E = \frac{1}{n} \sum_j^n (1 - \sum_i^k P_{ij}^2)$$

де n – кількість досліджених локусів, P_{ij} – частота і алеля в j локусі, k – кількість алелів в j локусі.

Формула Роджерса.

$$D_r = \frac{1}{n} \sum_j^n \left[\frac{1}{2} \sum_i^k (X_{ij} - Y_{ij})^2 \right]^{1/2},$$

де X_{ij} , Y_{ij} – частоти і алеля j локусу в популяціях, які порівнюються; k – число алелів в j локусі; n – кількість досліджених локусів

Частка поліморфних локусів (P) – це відношення поліморфних локусів до загальної кількості:

$$P = n_{pj} / n_{total}$$

P – частка поліморфних локусів;

n_{pj} – кількість поліморфних локусів;

n_{total} – загальна кількість локусів.

Індекс поліморфізму (PIC)

$$PIC = 2f(1-f),$$

де f – частота одного з двох алелів, і $f = \sqrt{R}$, де R – частота варіантів, у яких відсутній фрагмент ДНК, відповідної довжини

Примітка: $PIC < 0,250$ (низькополіморфні), $PIC = 0,250 - 0,500$ (помірнополіморфні); $PIC > 0,500$ (високополіморфні локуси).

Середнє на локус генне різноманіття (H_e) – це оцінка рівня генетичної мінливості в популяції.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

де $p_1, p_2, \dots, p_n$ – частоти алелів

Показник внутрішньопопуляційного різноманіття (μ) – середня кількість морф/алелів у вибірці:

$\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m})^2$ де, p – частка поліморфних алелів.

$$H' = - \sum_{i=1}^n (p_i \times \ln p_i)$$

Індекс Шеннона:

H' – індекс Шеннона, де $p_1, p_2, \dots, p_n$ – частоти поліморфних алелів.

Механізм існування великої кількості некодуючої ДНК в еукаріотичних геномах і величезна різниця в їх розмірах – одна з нерозв'язаних наукових загадок. Частина некодуючої ДНК безпосередньо задіяна в регуляції активності кодуючих ділянок. Проте, функції її більшої частини невідомі.

Оцінку генетичного поліморфізму та мікроеволюційних процесів за монолокусними (*STR*) та мультилокусними (*ISSR*) ділянками ДНК у досліджених нами різних видів свійських тварин ми пропонуємо проводити за наступними показниками.

Для аналізу алелофондів популяцій свійських тварин нами було розраховано частоти фактично виявлених алелів (N_a), породоспецифічних ($N_{a_{unic}}$), та рідкісних алелів (N_{a_1}) – алелів що зустрічались в популяції лише один раз.

Спектри алельної мінливості визначали для кожного мікросателітного локусу та оцінювали характер їх розподілу в популяціях. Ступінь відмінностей між тваринами різних порід за частотами алелів було розраховано за використання критерію χ^2 К. Пірсона із визначенням рівня значущості. Дані, одержані за використання критерію χ^2 Пірсона, при аналізі малочисельних виборок та поліалельних локусів можуть бути зсунуті. В зв'язку з тим, що ми маємо справу з поліалельними системами, і невеликим об'ємом вибірок, на нашу думку, більш прийнятним є розрахунок рівноваги за Харді-Вайнбергом за допомогою процедури марківських ланцюгів Монте-Карло (MCMC). Розрахунки проводили за використання програмного забезпечення PAST [48].

З метою оцінки відповідності характеру розподілу виявлених алелів певній мутаційній моделі, яка відображає, як алельну різноманітність, так і характер розподілу алелів мікросателітної ДНК за певним локусом. Теоретичну кількість алелів для різних мікросателітних локусів було розраховано за моделями: модель нескінченної кількості алелів (*IAM – infinite alleles model*) та покрокова мутаційна модель (*SMM – stepwise mutation model*) за використання програмного забезпечення MICROSATELLITE ANALYSER [49]. Для всіх досліджених нами видів і порід модель *SMM* була більш адекватною для апроксимації рівня алельного різноманіття за всіма, без виключень, дослідженими мікросателітними локусами, ніж модель *IAM*, яка значно завищує фактичні величини, як по кожній породі зокрема, так і по виду в цілому.

Для аналізу генотипового поліморфізму досліджуваних популяцій свійських тварин нами було розраховано частоти фактично виявлених генотипів (N_g), частоти породоспецифічних генотипів ($N_{g_{unic}}$) та рідкісних генотипів (генотипи, які виявлялись в популяції лише один (N_{g_1}), чи два (N_{g_2}) рази).

Для оцінки та порівняння генетичної структури та поліморфізму окремих порід різних видів, а також різних видів свійських тварин було визначено середні значення перерахованих показників.

Статистичну вірогідність отриманих результатів обчислювали методами математичної статистики та біометрії за критеріями χ^2 , Ст'юдента, Фішера з використанням стандартних комп'ютерних програм Gen Alex 6.5, STATISTICA 6 [50].

Оцінку популяційно-генетичних процесів в досліджуваних популяціях, проводили за допомогою програмного забезпечення PowerStats V12 (Promega) та PowerMarker V3.0 за наступними показниками: фактична кількість алелів (N_a) та кількість ефективних алелів (A_e) на локус; фактична (H_o), очікувана (H_e) та індивідуальна (H_i) гетерозиготність; індекс поліморфізму (PIC); індекс фіксації (F); індекс Шеннона (I); вірогідність виключення випадкового збігу алелів (PE); комбіновану вірогідність виключення випадкового збігу алелів (CPE) для мікросателітних локусів ДНК було визначено за допомогою програмного забезпечення Cervus 3.0.3.

Оцінку стану генетичної рівноваги за кожним мікросателітним локусом виконано за методом MCMC за використання програмного забезпечення GeneALEx та GENEPOP [51].

Індекси фіксації (або F-статистика Райта), що дозволяють визначити ступінь генетичної диференціації, було розраховано за методом Б. Вейром і К. Кохерманом у праці [52], як для всіх мікросателітних локусів, в цілому, так і для кожного, зокрема, за використання програмного забезпечення FSTAT [53].

З метою оцінки генетичної структури популяцій було розраховано значення потоку генів та здійснено аналіз молекулярної мінливості (AMOVA) на основі емпіричного розподілу генотипів за дослідженими локусами мікросателітної ДНК із визначенням рівня значущості оцінки F_{st} за допомогою permutation-методу (використано 999 перестановок) за допомогою програмного забезпечення GenALEx.

Оцінку ефективної чисельності популяції (N_e) було розраховано за мультилокусними генотипами досліджених мікросателітів ДНК використовуючи програмне забезпечення NeEstimator [54].

За результатами аналізу мультилокусних генотипів з використанням програмного забезпечення GenALEx проведено assignment-тест та розраховано матрицю попарних генетичних відстаней [55] за останнім алгоритмом було побудовано дендрограму подібності (метод UPGMA – незваженого попарного арифметичного середнього – *unweighted pair-group method using arithmetic averages*).

Для аналізу мікроеволюційних процесів було розраховано оцінки M-ratio. У 2001 році Дж. Гарза та Є Вілльямсоном було показано [56], що досить адекватним маркером прояву генетико-автоматичних процесів є співвідношення кількості визначених алелів (за певним мікросателітним локусом) до розмаху між довжиною крайніх за розмірами алелів за цим локусом, що і було названо авторами *M-ratio* (тест знаків: $p < 0,001$). Даний показник характеризує інтенсивність зменшення рівня генетичного різноманіття внаслідок дії генетико-автоматичних процесів, насамперед, коливань чисельності, інбридингу та ефекту «пляшкового горлечка». Відповідно, низькі його значення свідчать про більшу вразливість субпопуляції до дії вищевказаних процесів, а також можуть бути свідченнями дії штучного добору. Гіпотезу відсутності прояву ефекту «пляшкового горлечка» було перевірено за використання непараметричного тесту знаків [57, 58]. Наявність нерівноваги за

зчепленням (LD) між всіма парами використаних для кожного виду свійських тварин мікросателітних локусів ДНК було проаналізовано за допомогою програмного забезпечення PopGene [59]. Оцінки ефективної чисельності популяції (N_e) було розраховано за мультилокусними генотипами досліджених мікросателітів ДНК використовуючи програмне забезпечення NeEstimator [54].

Оскільки в різних популяціях проаналізовано відмінну кількість особин, для коректного порівняння (як між породами, так і між окремими локусами мікросателітної ДНК) проаналізованих популяцій (груп тварин) різного розміру, було використано різні непараметричні методи, які дозволяють оцінити потенційне різноманіття (за умови, що розмір оцінюваної вибірки прагне до нескінченості), це непараметричний метод А. Чао [60] та *rarefaction*-метод із застосуванням програмного забезпечення HP-Rare [61].

Застосування запропонованого нами комплексного підходу щодо проведення молекулярно-генетичних досліджень з подальшою оцінкою генетичного поліморфізму та мікроеволюційних процесів, за монолокусними та мультилокусними ділянками ДНК у різних видів свійських тварин надало нам можливість отримати наступні загальні результати.

Аналіз генетичного поліморфізму та оцінка мікроеволюційних процесів за мультилокусними та монолокусними ділянками ДНК у досліджених популяціях тварин різних порід великої рогатої худоби.

В результаті досліджень щодо генетичної структури представників *Bos taurus* за поліморфізмом мікросателітних локусів ДНК нами було виявлено 279 різних алельних варіантів локусів, діапазон яких варіював від 76–110 п. н. (TGLA227) до 246–264 п. н. (SPS115). Кількість виявлених алельних варіантів для української червоно-рябої молочної (УЧЕР) породи становила від 7-ми (за ETH3, ETH10) до 13-ти – за TGLA227, в середньому $9,5 \pm 0,637$ алеля на локус. Середня кількість ефективних алелів – $6,757 \pm 0,484$ від 4,465 (ETH3) до 8,617 (BM2113). У тварин чорно-рябої молочної (УЧР) встановлено від 6-ти (TGLA126) до 14-ти (TGLA227) алельних варіантів, що становило в середньому $9,2 \pm 0,841$ алеля на локус при середній кількості ефективних алелів $6,023 \pm 0,605$ в діапазоні від 3,216 (TGLA126) до 9,732 (TGLA227). Для сірої української породи (СУ) кількість алельних варіантів була від 6-ти за TGLA126 до 14-ти за TGLA122, і становила в середньому $9,2 \pm 0,712$ алеля на локус при середній кількості ефективних алелів $5,707 \pm 0,504$ від 3,986 (BM2113) до 9,142 (TGLA122).

Генетична структура популяцій великої рогатої худоби за 10 мікросателітними локусами ДНК українських червоно- та чорно-рябої молочних та сірої української порід представлена у табл. 16, 17, 18.

Таблиця 16

Генетична структура популяції української червоно-рябої молочної (УЧер)
за дослідженими мікросателітними локусами

Локус	Na	Ae	I	Ho	He	F	PIC	PE
ETH3	7,000	4,465	1,676	0,844	0,776	-0,088	0,75	0,684
ETH10	7,000	5,938	1,849	0,822	0,832	0,011	0,81	0,641
ETH225	8,000	7,232	2,019	0,778	0,862	0,097	0,85	0,558
TGLA122	11,000	6,947	2,114	0,756	0,856	0,117	0,84	0,519
TGLA126	8,000	4,490	1,702	0,667	0,777	0,142	0,75	0,379
TGLA227	13,000	8,438	2,292	0,778	0,881	0,118	0,87	0,558
BM1824	10,000	7,514	2,146	0,800	0,867	0,077	0,85	0,599
BM2113	11,000	8,617	2,275	0,867	0,884	0,020	0,87	0,728
INRA023	11,000	8,149	2,228	0,733	0,877	0,164	0,87	0,482
SPS115	9,000	5,777	1,906	0,800	0,827	0,033	0,80	0,599
Середнє	9,5	6,757	2,021	0,785	0,844	0,069	0,826	0,575
<i>CPE</i>								0,99985

Таблиця 17

Генетична структура популяції української чорно-рябої молочної (УЧР)
породи за дослідженими мікросателітними локусами

Локус	Na	Ae	I	Ho	He	F	PIC	PE
ETH03	7,000	4,594	1,701	0,860	0,782	-0,100	0,77	0,684
ETH10	7,000	5,031	1,781	0,814	0,801	-0,016	0,78	0,599
ETH225	8,000	5,194	1,838	0,907	0,807	-0,123	0,80	0,818
TGLA122	11,000	6,247	2,041	0,744	0,840	0,114	0,84	0,519
TGLA126	6,000	3,216	1,377	0,628	0,689	0,089	0,68	0,348
TGLA227	14,000	9,732	2,444	0,930	0,897	-0,037	0,88	0,864
BM1824	11,000	6,153	2,039	0,814	0,837	0,028	0,83	0,641
BM2113	9,000	6,174	1,947	0,767	0,838	0,084	0,82	0,558
INRA23	12,000	8,640	2,275	0,884	0,884	0,001	0,88	0,773
SPS115	7,000	5,245	1,793	0,860	0,809	-0,063	0,79	0,728
Середнє	9,200	6,023	1,924	0,821	0,819	-0,003	0,807	0,653

Таблиця 18

Генетична структура популяції сірої української породи дослідженими
мікросателітними локусами

Локус	Na	Ae	I	Ho	He	F	PIC	PE
ETH03	8,000	4,856	1,768	0,689	0,794	0,132	0,77	0,411
ETH10	8,000	4,505	1,701	0,600	0,778	0,229	0,75	0,291
ETH225	11,000	6,358	2,027	0,844	0,843	-0,002	0,82	0,684
TGLA122	14,000	9,142	2,355	0,622	0,891	0,301	0,88	0,318
TGLA126	6,000	4,726	1,646	0,444	0,788	0,436	0,76	0,143
TGLA227	11,000	7,068	2,092	0,889	0,859	-0,035	0,84	0,773
BM1824	9,000	5,938	1,919	0,733	0,832	0,118	0,81	0,482
BM2113	8,000	3,986	1,583	0,244	0,749	0,674	0,71	0,043
INRA023	9,000	6,289	1,969	0,756	0,841	0,102	0,82	0,519
SPS115	8,000	4,201	1,650	0,911	0,762	-0,196	0,73	0,818
Середнє	9,200	5,707	1,871	0,673	0,814	0,176	0,789	0,449
CPE								0,99924

Встановлено подібність та більшу генетичну мінливість українських порід молочного напрямку продуктивності у порівнянні з аборигенною сірою українською породою (табл. 19).

Таблиця 19

Популяційно-генетичні характеристики у різних порід виду *Bos taurus*

Порода	Na	Ae	I	Ho	He	F	PIC	PE	CPE
УЧеР	9,5	6,757	2,021	0,784	0,844	0,069	0,826	0,575	0,99985
УЧР	9,2	6,023	1,924	0,821	0,819	-0,003	0,807	0,653	0,99999
СУ	9,2	5,707	1,871	0,673	0,814	0,176	0,789	0,449	0,99924
Середнє	9,3	6,162	1,939	0,760	0,825	0,081	0,807	0,559	0,99969

Для цих порід (УЧеР/УЧР/СУ) виявилось характерним вищі середні значення таких показників як: ефективна кількість алелів (Ae – 6,7/6,0/5,7); індекс Шеннона-Уівера (I – 2,0/1,9/1,8); фактична гетерозиготність (Ho – 0,7/0,8/0,6); очікувана гетерозиготність (He – 0,84/0,82/0,81); індекс поліморфізму досліджених локусів (PIC – 0,82/0,80/0,78); вірогідність виключення випадкового збігу алелів (PE – 0,57, 0,65, 0,44) за показником комбінованої вірогідності виключення випадкового збігу алелів (CPE) в середньому становила 0,99.

Відхилення від стану генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом (проводили за МСМС, за допомогою програмного забезпечення GeneALEX та GENEPOP) встановлено у УЧеР – за локусами BM1824, TGLA122 ($p < 0,001$), TGLA126 ($p < 0,01$) та ETH225 ($p < 0,05$); УЧР – за ETH225 та BM2113 ($p < 0,05$);

СУ – за всіма дослідженими локусами крім ETH225, що може бути наслідком малої чисельності та замкнутості існуючої популяції сірої української худоби. Тільки для СУ було встановлено достовірний надлишок гетерозигот за локусом SPS115 ($p < 0,05$) та відсутність повних гетерозигот ($H_i - 1$). В результаті проведених розрахунків середні значення індексів фіксації Райта (F_{is} та F_{it}) мають позитивне значення та достовірно відхиляються від нуля ($F_{is} = 0,033$, $F_{it} = 0,092$), що свідчить про значний рівень генетичної консолідованості популяцій за всіма локусами крім ETH3 таблиця 20.

Таблиця 20

Індекси фіксації С. Райта у великої рогатої худоби різних порід

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}
ETH3	0,005	-0,005	-0,001
ETH10	0,072	0,085	0,151
ETH225	0,018	0,006	0,024
TGLA122	0,018	0,192	0,206
TGLA126	0,027	0,241	0,262
TGLA227	0,017	0,027	0,044
BM1824	0,015	0,086	0,101
BM2113	0,070	0,253	0,305
INRA23	0,029	0,101	0,127
SPS115	0,052	-0,061	-0,005
Середнє	$0,033 \pm 0,008$	$0,092 \pm 0,033$	$0,122 \pm 0,034$
95% CI	[0,019; 0,048]	[0,032; 0,155]	[0,060; 0,187]

Примітка: 95% CI – 95% довірчий інтервал

Тварини різних порід характеризувались достовірним рівнем генетичної диференціації (для 10 локусів у середньому $F_{st} = 0,122$), найбільшу генетичну варіабільність спостерігали за локусами BM2113, TGLA126, TGLA122 ETH10, INRA23 та BM1824, а внесок локусів ETH3 та SPS115 був мінімальним. Розрахунки були проведені за використання програмного забезпечення FSTAT.

Результати аналізу молекулярної мінливості (AMOVA, здійснено за допомогою програмного забезпечення GenALEx (табл. 21) вказують на те, що на 6% генетична мінливість досліджуваного поголів'я була зумовлена їхнім походженням (породною належністю), а на 94% – індивідуальною мінливістю. Водночас, незважаючи на відносно низьке значення (0,058) генетична диференціація досліджуваних порід мала високий рівень значущості ($p \leq 0,001$)

Таблиця 21

Результати аналізу генетичної мінливості (AMOVA) різних порід великої рогатої худоби за мікросателітними локусами

Мінливість	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>E(MS)</i>	<i>Φ_{st}</i>	<i>p</i>
Між групами	2	68,297	34,148	0,564		
В середині груп	130	1186,801	9,129	9,129	0,058	0,001
Загальна	132	1255,098	43,278	9,694		

Результати assignment-тесту (на підставі емпіричного розподілу мультилокусних генотипів, GenALEx) вказують на те, що в цілому точність прогнозу щодо віднесення певної тварини до однієї з порід становила близько 84%. Причому, найвищою є точність прогнозу щодо СУ породи (89%), а УЧеР та УЧР (82 та 81%, відповідно).

Показником прояву генетико-автоматичних процесів в популяціях є співвідношення кількості визначених алелів (за певним мікросателітним локусом) до розмаху між довжиною крайніх за розмірами алелів за цим локусом є показник *M-ratio* (тест знаків: $p < 0,001$), який характеризує інтенсивність зменшення рівня генетичного різноманіття внаслідок дії генетико-автоматичних процесів (коливань чисельності, інбридингу та ефекту «пляшкового горлечка»). Низькі його значення вказують на дію цих процесів, а також факторів штучного добору. Серед досліджених нами тварин великої рогатої худоби найнижчі значення *M-ratio* (0,268 та 0,378) було зафіксовано за локусами BM1824 та TGLA122, відповідно (табл. 22).

Таблиця 22

Показник *M-ratio* для мікросателітних локусів різних порід великої рогатої худоби

Локус	УЧеР		УЧР		СУ		В цілому	
	Na	<i>M-ratio</i>	Na	<i>M-ratio</i>	Na	<i>M-ratio</i>	Na	<i>M-ratio</i>
ETH3	7	0,412	7	0,538	8	0,533	9	0,529
ETH10	7	0,538	7	0,538	8	0,471	9	0,471
ETH225	8	0,533	8	0,533	11	0,524	11	0,524
TGLA126	8	0,533	6	0,462	6	0,546	8	0,533
TGLA122	11	0,244	11	0,478	14	0,326	17	0,378
TGLA227	13	0,419	14	0,400	11	0,524	16	0,457
BM1824	10	0,526	11	0,268	9	0,529	11	0,268
BM2113	11	0,524	9	0,474	8	0,381	11	0,524
INRA23	11	0,524	12	0,480	9	0,429	13	0,481
SPS115	9	0,474	7	0,412	8	0,471	10	0,526

Нами не було встановлено суттєвих відмінностей за показником *M-ratio* серед досліджених порід, що свідчить про приблизно однаковий рівень мікроеволюційних процесів в даних популяціях. Таким чином, можна очікувати, що у випадку різкого зниження чисельності, в першу чергу в генофонді популяції будуть зникати рідкісні алелі, але не завжди із найменшою чи найбільшою довжиною. Відповідно, алельне різноманіття буде зменшуватись швидше, ніж розмах розмірів алелів, що призводить до зниження оцінок *M-ratio*. Оцінку дрейфу генів проводили за методами SMM, IAM та TPM, програмного забезпечення Bottleneck. Гіпотезу відсутності прояву ефекту «пляшкового горлечка» було перевірено за використання непараметричного тесту знаків.

З іншого боку, проявом дії генетико-автоматичних процесів є зниження рівня гетерозиготності. В цьому випадку фактична гетерозиготність буде значно нижчою за рівноважну (*Heq*), оскільки дрейф генів переважатиме дію мутаційного процесу. Оцінка фактичної та рівноважної гетерозиготності представлено у таблиці 23. Найбільшу різницю спостерігали у тварин породи УЧеР для семи локусів було виявлено переважання рівноважної гетерозиготності над фактичною, у тварин УЧР це співвідношення було чотири до п'яти, а у породи СУ – вісім до двох.

Таблиця 23

Стан гетерозиготності мікросателітних локусів великої рогатої худоби

Локус	УЧеР		УЧР		СУ	
	Ho	Heq	Ho	Heq	Ho	Heq
ETH3	0,844	0,772	0,860	0,773	0,689	0,803
ETH10	0,822	0,769	0,814	0,772	0,600	0,802
ETH225	0,778	0,802	0,907	0,803	0,844	0,860
TGLA122	0,756	0,861	0,744	0,861	0,622	0,895
TGLA126	0,667	0,803	0,628	0,728	0,444	0,730
TGLA227	0,778	0,886	0,930	0,896	0,889	0,861
BM1824	0,800	0,844	0,814	0,862	0,733	0,826
BM2113	0,867	0,862	0,767	0,828	0,244	0,802
INRA23	0,733	0,861	0,884	0,876	0,756	0,824
SPS115	0,800	0,824	0,860	0,771	0,911	0,801
Тест знаків	0,066		0,605		0,014	

Одержані результати вказують на тенденцію прояву ефекту «пляшкового горлечка» для популяції тварин СУ, оскільки нульову гіпотезу в їхньому випадку можна відкинути з рівнем значущості 0,014.

Відповідно до результатів тесту Вілкоксона (*Wilcoxon test*) у УЧеР та СУ порід достовірно ($p < 0,05$, та $p < 0,01$) має місце дефіцит гетерозигот.

Відмічаються випадки зчепленого успадкування різних локусів у тварин всіх досліджених порід великої рогатої худоби (табл. 24).

Таблиця 24

Результати аналізу *LD* досліджених порід за поліморфізмом мікросателітних локусів

Порода	N_{LD}	HWD	df	χ^2	p
УЧеР	12	0,117	10	8,56	0,575
УЧР	7	-0,021	10	7,30	0,696
СУ	39	0,328	10	41,96	0,000

В цілому, оцінка міри не випадкового об'єднання гамет (HWD) у тварин породи СУ (0,328) достовірно ($p < 0,001$) переважала відповідну у тварин інших порід, а значення даного показника у тварин УЧР породи є близьким до нуля (-0,021), що є свідченням того, що об'єднання гамет в даній популяції є практично випадковим. Велике значення N_{LD} для СУ (39 випадків з 45) вказує на високий ступінь інбредованості даної популяції.

Найбільшу кількість (38 ампліфікованих фрагментів або 13,62% від загальної кількості ампліконів), як і велику кількість алельних варіантів (16) загалом по виду серед локусів з низькою вагою виявлено за локусом TGLA227, з коровою послідовністю (TG)_n й спектром ампліконів 76–110 п. н., та (36 ампліконів, 12,90% і найбільшу кількість алелів – 17), з великою вагою – за TGLA122 з коровою послідовністю (AC)_n(AT)_n зі спектром ампліконів 114–188 п. н. Слід відзначити, що саме за цими локусами виявлено найбільшу кількість породоспецифічних алельних та генотипових варіантів (у УЧеР – 13 та 11, УЧР – 14 та 11, СУ – 11 та 14, за TGLA227 та TGLA122, відповідно). У ЧеРМ та ЧРМ порід, як і в цілому по виду, найбільшу кількість ампліконів (13, 14 та 38, відповідно) виявляли за локусом TGLA227, а у СУ – найбільшу кількість ампліконів було зафіксовано за локусом TGLA122 – 14 (36 по виду й по 11 у УЧеР та УЧР порід). Велику кількість ампліконів в даного виду було виявлено, також, у представників всіх трьох порід за локусом (AC)_n INRA023 (11, 12, 9 та 32, відповідно). Таким чином, за результатами досліджень ми спостерігаємо тенденцію, що для тварин великої рогатої худоби за такими показниками, як фактична кількість алелів (Na) (38, 32 та 36), генотипів (Ng) (60, 54 та 48), рідкісних генотипів Ng₁/Ng₂) (31/12, 21/14 та 14/13) та породоспецифічних (Ng_{unik}) (38, 30 та 33) найбільш інформативними виявились мікросателітні локуси TGLA227 (TG)_n, INRA023 (AC)_n та TGLA122, з динуклеотидною структурою (AC)_n та (TG)_n та з коровим тандемним мотивом (AC)_n(AT)_n.

З метою оцінки генетичних процесів, які відбувались при створенні вітчизняних порід різного напрямку продуктивності (української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід та південної м'ясної) ми провели порівняльний аналіз генетичної структури цих порід з аборигенною сірою українською породою оскільки вона свого часу була маточною породою при формуванні

місцевих та перших вітчизняних порід, які згодом стали материнськими для сучасних вітчизняних порід молочної та м'ясної худоби.

В результаті проведеного аналізу виявлено 138 алельних варіантів. Ступінь алельного різноманіття різних порід тварин представлено у таблиці 25.

Таблиця 25

Загальна кількість алелів (*NAT*), кількість/частка рідкісних ($\leq 0,050$) та поширених ($\geq 0,200$) алелів для 10 локусів МС-ДНК

Порода	<i>NAT</i>	Частота/Частка алелів із даною частотою	
		$\leq 0,050$	$\geq 0,200$
Молочні	110 (79,7%)	36 / 0,327	6 / 0,055
Аборигенна	94 (68,1%)	35 / 0,372	16 / 0,170
М'ясна	102 (73,9%)	48 / 0,471	18 / 0,176
χ^2 (<i>P</i>)	-	4,73 (ns)	8,79 (0,013)

Примітка: ns – $P > 0,05$.

Для різних порід від третини до майже половини кількості відмічених алелів представлені рідкісними алелями (із часткою $\leq 0,050$). При цьому, достовірні відмінності (критерій Хі-квадрат Пірсона: $\chi^2 = 8,79$; $df = 2$; $P = 0,013$) встановлено між породами лише за часткою найпоширеніших алелів, оцінки якої коливалися від 0,055 (молочного напрямку продуктивності) до 0,176 (південна м'ясна).

Оцінки показників генетичного різноманіття та оцінки *M-ratio* для 10 локусів мікросателітної ДНК худоби різної селекції (в середньому на один локус) наведено в таблиці 26. Лише стосовно оцінок ефективної кількості алелів (*Ae*) та очікуваної гетерозиготності (*He*) відмічено достовірний зв'язок між породою та мікросателітним локусом (критерій Фрідмана: у обох випадках ($P < 0,01$)). Таким чином, патерни генетичної мінливості за цими показниками для окремих локусів суттєво різнилися серед особин належних до різних груп худоби.

Таблиця 26

Показники (*Mean* $\pm$ *SE*) генетичного різноманіття та оцінки *M-ratio* для 10 локусів МС-ДНК (в середньому на один локус)

Порода	Показник					
	<i>Na</i>	<i>Ae</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>	<i>M-ratio</i>
Молочні	11,00 $\pm 1,05$	7,56 $\pm 0,55$	0,802 $\pm 0,021$	0,861 $\pm 0,010$	0,069 $\pm 0,022$	0,895 $\pm 0,053$
Аборигенна	9,40 $\pm 0,78$	6,02 $\pm 0,50$	0,672 $\pm 0,064$	0,824 $\pm 0,013$	0,185 $\pm 0,078$	0,898 $\pm 0,041$
М'ясна	10,20 $\pm 0,83$	4,74 $\pm 0,49$	0,642 $\pm 0,060$	0,773 $\pm 0,019$	0,160 $\pm 0,080$	0,874 $\pm 0,053$
Критерій Фрідмана χ^2 (<i>P</i>)	4,638 (ns)	9,604 (0,008)	5,446 (ns)	10,612 (0,005)	0,495 (ns)	1,202 (ns)

Середня кількість алелів була найвищою у тварин молочного напрямку продуктивності (11,0 алелів на локус), м'ясної худоби (10,2 алелів на локус), а найнижчою – серед тварин сірої української породи (9,4 алеля на локус). Але при цьому, серед м'ясної худоби було встановлено найнижчу оцінку ефективної кількості алелів (4,74 алелів на локус), що була більш ніж вдвічі нижчою, ніж середня кількість алелів. Це може бути наслідком наявності у цієї породи великої кількості алелів, як із дуже низькою, так й дуже високою частотою (18 алелів із 102 зареєстрованих). Середні оцінки фактичної гетерозиготності варіювали від 0,642 (м'ясна худоба) до 0,802 (молочна худоба), тоді як середні оцінки очікуваної гетерозиготності варіювали від 0,773 (м'ясна худоба) до 0,861 (молочна худоба). У всіх випадках було відмічено переважання оцінок очікуваної гетерозиготності над фактичною, що призвело до отримання позитивних й відносно великих оцінок індексу гетерозиготності – від 0,069 (молочна худоба) до 0,185 (аборигенна худоба) в середньому на локус. Це свідчить про наявність значного дефіциту гетерозигот серед особин досліджених порід, особливо, серед молочної худоби, що може слугувати проявом активної селекційної роботи, що проводиться із тваринами цих порід. Характерним є те, що на фоні зниження рівня алельного різноманіття, не було виявлено звуження спектру цього різноманіття, як й серед тварин інших двох груп, що підтверджується дуже близькими для всіх трьох груп тварин оцінками *M-ratio*, які були значно вищими за критичну величини у 0,600. У розрізі окремих локусів, лише для локусу *TGLA122* нами було виявлено низькі оцінки *M-ratio* (0,500–0,652), що свідчить про швидшу втрату алельного різноманіття за даним локусом, ніж в середньому для 10 досліджених локусів мікросателітної ДНК. Особливо, це було характерним для м'ясної худоби, для якої велика кількість алелів були відсутніми у досліджених тварин (*TGLA122*¹⁴⁷, *TGLA122*¹⁵⁵, *TGLA122*¹⁵⁷, *TGLA122*¹⁵⁹, *TGLA122*¹⁶³, *TGLA122*¹⁶⁵ та *TGLA122*¹⁶⁷).

Що стосується мультилокусної гетерозиготності (MLH), то найвищі оцінки цього показника було зафіксовано у молочної худоби ($0,802 \pm 0,015$), для якої з 10 досліджених мікросателітних ДНК-локусів вісім (в середньому) знаходилися у гетерозиготному стані. В той час, як для аборигенної та м'ясної худоби ці оцінки були досовірно нижчими – $0,672 \pm 0,021$ та $0,677 \pm 0,011$, відповідно (однофакторний дисперсійний аналіз: $F_{2; 315} = 23,63$; $P < 0,001$). Для трьох (*TGLA122*, *INRA023* та *ETH10*) достовірного відхилення від стану генотипової рівноваги Гарді-Вайнберга не було виявлено (табл. 27).

Оцінка індексу інбридингу *Fis* (в цілому для трьох груп) варіювала від – 0,040 (локус *SPS115*) до 0,262 (локус *ETH225*) і становила $0,138 \pm 0,030$ (в середньому на локус), що свідчить про значний дефіцит гетерозиготності серед досліджуваних тварин (табл. 28).

Таблиця 27

Результати перевірки генотипової рівноваги Гарді-Вайнберга для 10 мікросателітних локусів ДНК на підставі G-тесту максимальної правдоподібності (likelihood ratio G-test)

Локус	Худоба		
	Молочна	Аборигенна	М'ясна
<i>TGLA126</i>	0,041	< 0,001	ns
<i>TGLA122</i>	ns	ns	ns
<i>INRA023</i>	ns	ns	ns
<i>ETH3</i>	0,009	ns	< 0,001
<i>ETH225</i>	0,001	ns	< 0,001
<i>BM1824</i>	0,009	ns	0,036
<i>TGLA227</i>	ns	0,050	ns
<i>BM2113</i>	0,004	< 0,001	ns
<i>ETH10</i>	ns	ns	ns
<i>SPS115</i>	ns	< 0,001	0,028

Таблиця 28

Оцінки індексів Фішера (*Fis* та *Fst*) для 10 локусів МС-ДНК

Локус	<i>Fis</i>	<i>P</i>	<i>Fst</i>	<i>P</i>
<i>TGLA126</i>	0,186	ns	0,093	< 0,001
<i>TGLA122</i>	0,186	0,038	0,051	< 0,001
<i>INRA023</i>	0,070	ns	0,079	< 0,001
<i>ETH3</i>	0,191	ns	0,044	< 0,001
<i>ETH225</i>	0,262	ns	0,032	0,002
<i>BM1824</i>	0,113	ns	0,060	< 0,001
<i>TGLA227</i>	0,070	ns	0,064	< 0,001
<i>BM2113</i>	0,252	< 0,001	0,057	< 0,001
<i>ETH10</i>	0,090	ns	0,087	< 0,001
<i>SPS115</i>	-0,040	ns	0,033	< 0,001
<i>В середньому ± SE</i>	0,138 ± 0,030	< 0,001	0,060 ± 0,007	< 0,001

Оцінка індексу генетичної диференціації між породами (*Fst*) також варіювала в значних межах – від 0,032 (локус *ETH225*) до 0,093 (локус *TGLA126*) і в середньому становила $0,060 \pm 0,007$. Для всіх мікросателітних локусів, а також для середньої оцінки *Fst*, було встановлено достовірні відмінності між породами відносно розподілу частот алелів. Високий рівень специфічності підтверджується й результатами *Assignment*-тесту на підставі розподілу частот

мультилокусних генотипів за 10 локусами мікросателітної ДНК (табл. 29). Генетична унікальність досліджуваної худоби варіювала від 90,7% (сіра українська) до 100% (південна м'ясна).

Таблиця 29

Результати Assignment-тесту між різними породами ВРХ на підставі розподілу частот мультилокусних генотипів за 10 локусами МС-ДНК

Порода	Порода (передбачена)			Точність віднесення особини до власної породи, %
	Молочна	Аборигенна	М'ясна	
Молочні	78	5	0	94,0
Аборигенна	4	39	0	90,7
М'ясна	0	0	192	100,0

Незважаючи на те, що *a priori* мікросателітні локуси ДНК є нейтральними молекулярно-генетичними маркерами, нами було встановлено, що серед використаних нами 10 локусів, були присутні локуси, для яких гіпотеза щодо їхньої нейтральності достовірно відхилялась на підставі результатів тесту Евенса-Ваттерсона (табл. 30). Як й можна було очікувати, зважаючи на активну селекційну роботу із цими породами, найбільша кількість таких локусів (7 із 10) було відмічено у молочної худоби. В той час, як для аборигенної та м'ясної худоби кількість таких локусів була значно нижчою (три та два), при цьому, половина з них мали оцінки *Obs. F* дуже близькі до нижньої межі 95% довірчого інтервалу.

Таблиця 30

Результати тесту на нейтральність Евенса-Ваттерсона (Ewens-Watterson test) для 10 локусів МС-ДНК (наведено лише локуси, для яких гіпотезу щодо нейтральності вірогідно відхилено)

Порода	Локус	<i>Obs. F</i>	<i>L95 – U95</i>
Молочні	<i>INRA023</i>	0,1088	0,1395 – 0,5182
	<i>ETH3</i>	0,1495	0,1682 – 0,6210
	<i>ETH225</i>	0,1555	0,1957 – 0,6884
	<i>BM1824</i>	0,1353	0,1567 – 0,5398
	<i>BM2113</i>	0,1008	0,1489 – 0,5292
	<i>ETH10</i>	0,1585	0,2167 – 0,7683
	<i>SPS115</i>	0,1542	0,1761 – 0,6511
Аборигенна	<i>TGLA126</i>	0,2155	0,2299 – 0,7480
	<i>INRA023</i>	0,1652	0,1668 – 0,5489
	<i>TGLA227</i>	0,1214	0,1374 – 0,4321
М'ясна	<i>TGLA122</i>	0,1891	0,1977 – 0,7205
	<i>ETH225</i>	0,1150	0,1200 – 0,3882

Примітка: *Obs. F* – фактична сума квадратів частот алелів; *L95, U95* – нижня та верхня межі 95% довірчого інтервалу оцінки *Obs. F*, розраховані на підставі 1000 симуляцій.

З іншого боку, для цих двох груп було відмічено достовірний прояв ефекту «пляшкового горлечка» (*bottleneck effect*) в минулому на підставі оцінок гетерозиготності 10 мікросателітних локусів (табл. 31).

Таблиця 31

Результати перевірки гіпотези щодо прояву ефекту «пляшкового горлечка» в минулому на підставі оцінок гетерозиготності 10 локусів МС-ДНК (наведено теоретично очікувану та фактичну кількість локусів, що мають надлишок гетерозиготності)

Порода	Модель		
	IAM	TPM	SMM
Молочні	6,01/9 (ns)	5,90/5 (ns)	5,85/4 (ns)
Аборигенна	5,99/5 (ns)	5,92/3 (ns)	5,89/2 (0,015)
М'ясна	5,96/5 (ns)	5,97/5 (ns)	5,98/0 (0,001)

Аналогічно, негативні наслідки популяційно-демографічних процесів у сірої української та південної м'ясної худоби, було відмічено й стосовно їхніх оцінок середньої кореляції між алелями (r) використаних в аналізі локусів, що достовірно перевищували 0, а також значної кількості достовірних випадків нерівноваги за зчепленням (N_{LD}) між окремими алелями 10 мікросателітних локусів ДНК (табл. 32).

Таблиця 32

Оцінки середньої кореляції між алелями (r) та кількість вірогідних випадків нерівноваги за зчепленням (N_{LD}) між окремими алелями 10 локусів ДНК

Худоба	r	df	χ^2	P	N_{LD}
Молочні	0,127	45	38,01	ns	13
Аборигенна	0,262	45	66,66	0,020	24
М'ясна	0,138	45	102,03	< 0,001	32

Наслідками цих процесів, насамперед, пов'язаних із обмеженою кількістю особин та низьким рівнем їхньої гетерозиготності, стали низькі оцінки ефективної чисельної популяції (N_e) та ефективної чисельності плідників (N_{eb}) для аборигенної та м'ясної худоби (табл. 33).

Таблиця 33

Оцінки середньої кореляції між алелями (r) та кількість вірогідних випадків нерівноваги за зчепленням (N_{LD}) між окремими алелями 10 локусів ДНК

Порода	r	df	χ^2	P	N_{LD}
Молочні	0,127	45	38,01	ns	13
Аборигенна	0,262	45	66,66	0,020	24
М'ясна	0,138	45	102,03	< 0,001	32

В цілому, оцінка ефективної чисельної популяції досліджуваної худоби становила 61–78 особин (з 95% довірчим інтервалом від 40 до 127 особин), тоді як, для молочної худоби оцінка *Ne* складала 709 особин (із відкритою верхньою межею 95% довірчого інтервалу). Оцінка ефективної чисельності плідників (*Neb*) для цих тварин, також, була в 2,0–2,5 рази вище, ніж для аборигенних та м'ясних порід.

В результаті проведених досліджень за мультилокусними ділянками ДНК (ISSR) було одержано 59 фрагментів різної довжини (28 за динуклеотидними ISSR маркерами та 31 за тринуклеотидними). Найбільшу кількість фрагментів за локусом (GAG)₆C – 19 фрагментів, найменшу за (ACC)₆G – 12. Встановлено фрагменти характерні для всіх порід за кожним з досліджених локусів, а саме: (AG)₉C (діапазон 280–1050 п. н.) – фрагменти розміром 300, 420, 450 та 500 п. н., (GA)₉C (діапазон 220–1500 п. н.) – 220, 250, 320, 460 та 550 п. н., (ACC)₆G (300–1600 п. н.) – чотири фрагменти – 300, 380, 650 і 900 п. н., (GAG)₆C (280–950 п. н.) – фрагменти 280, 450 та 650 п. н.

За кожним з досліджених ISSR локусів було виявлено породоспецифічні фрагменти, які зустрічались у однієї породи і були відсутні у представників інших порід. За (AG)₉C для УЧеР (380 п. н.), УЧР (400 та 1000 п. н.), південної м'ясної (530 п. н.); (GA)₉C – УЧеР (1200 п. н.), у УЧР (350 п. н.), для волинської м'ясної (400, 500 п. н.); (ACC)₆G – УЧеР (980 та 1300 п. н.), південної м'ясної (1600 п. н.), поліська м'ясна порода мала найменший спектр ампліфікованих фрагментів і серед них не було виявлено жодного унікального; (GAG)₆C – УЧеР (300, 420 та 950 п. н.), УЧР – (580, 620, 700, 880 та 900 п. н.), південної м'ясної (400 п. н.). В результаті проведених досліджень встановлено, що використання в якості праймерів інвертованих фрагментів динуклеотидних (AG)₉C, (GA)₉C та тринуклеотидних (ACC)₆G, (GAG)₆C мікросателітних локусів виявляє значний поліморфізм серед досліджених представників різних порід.

Таким чином, в результаті проведеного аналізу за 10 мікросателітними локусами виявлено найбільш характерні спектри для кожної з досліджених порід. Встановлено, що найбільший рівень поліморфізму за мікросателітними локусами ДНК спостерігався у тварин молочних порід великої рогатої худоби. Застосування запропонованого нами підходу аналізу надає можливість оцінювання ступеня консолідованості та генетичної диференціації досліджуваних популяцій, генеалогічних породних зв'язків та наслідків селекційних заходів, що підтверджується спільністю походження та наявністю ідентичних тенденцій у формуванні генетичної структури у тварин вітчизняної селекції.

Популяційно-генетична структура та мікроеволюційні процеси у різних порід коней за монолокусними та мультилокусними ділянками ДНК.

В результаті проведеного аналізу за 11 мікросателітними локусами (табл. 34), в залежності від нуклеотидної структури мікросателітних локусів, тварин гуцульської породи коней, а саме за 6 динуклеотидними мікросателітними локусами ДНК: VHL20, HTG06, HTG07, HMS06, CA425,

ASB17 було виявлено 59 алельних варіантів в діапазоні від 76 п.н. за локусом HTG06 (15q26-q27) до 171 п.н. за HMS06 з однаковою частотою (0,013).

Таблиця 34

Генетична структура тварин гуцульської породи за 11 мікросателітними локусами ДНК.

Локус	Кількість	Розмір п.н. / (частота) алелів											
ASB17	13	90 (0,019)	92 (0,051)	94 (0,006)	96 (0,013)	98 (0,013)	100 (0,058)	102 (0,006)	104 (0,192)	106 (0,090)	108 (0,051)	110 (0,071)	
		112 (0,173)	114 (0,256)										
HMS06	9	155 (0,006)	157 (0,019)	159 (0,083)	161 (0,167)	163 (0,263)	165 (0,045)	167 (0,155)	169 (0,288)	171 (0,013)			
CA425	7	230 (0,006)	232 (0,083)	234 (0,103)	236 (0,038)	238 (0,173)	240 (0,462)	242 (0,135)					
HTG06	11	76 (0,013)	82 (0,006)	84 (0,154)	88 (0,038)	90 (0,115)	92 (0,083)	94 (0,032)	96 (0,026)	98 (0,154)	100 (0,372)	102 (0,006)	
HTG07	8	118 (0,019)	120 (0,199)	122 (0,019)	124 (0,103)	126 (0,218)	128 (0,372)	130 (0,058)	132 (0,013)				
VHL20	11	83 (0,006)	85 (0,051)	87 (0,321)	89 (0,032)	93 (0,141)	95 (0,109)	97 (0,109)	99 (0,071)	101 (0,083)	103 (0,058)	105 (0,019)	
ATH04	11	140 (0,006)	144 (0,135)	146 (0,154)	148 (0,026)	150 (0,077)	152 (0,038)	154 (0,064)	156 (0,032)	158 (0,122)	160 (0,276)	162 (0,071)	
ASB23	11	128 (0,103)	130 (0,109)	132 (0,269)	134 (0,071)	140 (0,013)	144 (0,013)	146 (0,026)	148 (0,115)	150 (0,045)	152 (0,128)	154 (0,109)	
HTG04	10	119 (0,013)	121 (0,019)	125 (0,038)	127 (0,090)	129 (0,199)	131 (0,372)	133 (0,103)	135 (0,058)	137 (0,083)	139 (0,026)		
HMS07	9	168 (0,006)	170 (0,032)	172 (0,071)	174 (0,244)	176 (0,160)	178 (0,090)	180 (0,359)	182 (0,032)	184 (0,006)			
HMS03	10	150 (0,019)	152 (0,090)	158 (0,026)	160 (0,269)	162 (0,019)	164 (0,128)	166 (0,288)	168 (0,103)	170 (0,032)	172 (0,026)		

За локусом VHL20 з структурою мікросателітної послідоверсті (TG)17 було виявлено 11 алельних варіантів в діапазоні від 83 до 105 п.н., серед яких з найбільшою частотою (0,321) зустрічався алель VHL2087, а з найменшою (0,006) – VHL2083. За даним локусом було встановлено 32 генотипових варіанти. Найбільш поширеними були тварини з генотипами VHL20^{87/93}, VHL20^{87/95} та VHL20^{87/97}. Тварин з різноманітними рідкісними генотипом (Ng₁), які

зустрічались в популяції лише по одному разу було 17, а по 2 рази (Ng_2) – шість. За цим локусом розподіл генотипів достовірно не відрізнявся від стану генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом. Загалом популяція коней за дослідженим мікросателітним локусом характеризувалось наступними генетичними показниками: $Na = 11$, $Na_{unik} = 0,420$, $Ng = 32$, $Ng_1 = 17$, $Ng_2 = 6$, $Ng_{unik} = 14$, $Ae = 6,036$, $I = 2,054$, $Ho = 0,833$, $He = 0,834$, $F = 0,001$, $PI_C = 0,820$, $PE = 0,062$. Генетична структура дослідженої популяції за мікросателітним локусом (TG)₁₉ – HTG07 була наступною: розмір одержаних алельних варіантів варіював від 118 до 132 п. н., серед яких, з найбільшою частотою (0,372) зустрічався алель HTG07¹²⁸, з найменшою (0,013) – HTG07¹³² і який є породоспецифічним. У популяції встановлено 17 різних генотипових варіанти, з яких найпоширенішими були HTG07^{128/128} та HTG07^{126/128} і спостерігались у 14 та 13 голів, відповідно. За цим локусом п'ять різних генотипових варіанти зустрічались лише по одному разу та 2 генотипи – по два рази. За цим локусом було виявлено достовірну різницю за розподілом генотипів за Гарді-Вайнбергом ($p < 0,01$). Загалом встановлено, що за HTG07 для дослідженої популяції було характерно: $Na = 8$, $Na_{unik} = 0,870$, $Ng = 17$, $Ng_1 = 5$, $Ng_2 = 2$, $Ng_{unik} = 3$, $Ae = 4,167$, $I = 1,627$, $Ho = 0,679$, $He = 0,760$, $F = 0,106$, $PI_C = 0,730$, $PE = 0,397$. У дослідженій популяції коней гуцульської породи за локусом HTG06 (15q26–q27) було виявлено 11 алельних варіантів розміром від 76 до 102 п.н., серед яких з найбільшою частотою (0,372) зустрічався алель HTG06¹⁰⁰, а з найменшою (0,006) – HTG06⁸² та HTG06¹⁰². За цим локусом виявлено 24 різних генотипи тварин. Тварини з генотипом HTG06^{100/100} найбільш часто спостерігали у популяції (12 голів). За цим локусом виявлено 18 тварин з рідкими генотипами, породоспецифічна алель HTG06¹⁰² спостерігалась з частотою 0,006. За HMS07 було виявлено достовірну різницю за розподілом генотипів за Гарді-Вайнбергом ($p < 0,001$) і для дослідженої популяції виявилось характерними наступне: $Na = 11$, $Na_{unik} = 0,790$, $Ng = 24$, $Ng_1 = 9$, $Ng_2 = 3$, $Ng_{unik} = 12$, $Ae = 4,779$, $I = 1,850$, $Ho = 0,692$, $He = 0,791$, $F = 0,125$, $PI_C = 0,770$, $PE = 0,416$. За локусом HMS06 виявлено 9 алельних варіантів розміром від 155 до 171 п.н., серед яких з найбільшою частотою (0,288) зустрічався алель HMS06¹⁶⁹, а найменшою (0,006) – HMS06¹⁵⁵. За даним локусом було встановлено 24 різних генотипових варіанти. Найбільш поширеними були тварини з генотипами HMS06^{163/169}. Тварин з різноманітними рідкісними генотипом (Ng_1), які зустрічались в популяції лише по одному разу було 11, а по 2 рази (Ng_2) – три. За цим локусом розподіл генотипів достовірно не відрізнявся від стану генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом. Загалом популяція коней за дослідженим мікросателітним локусом характеризувалось наступними генетичними показниками: $Na = 9$, $Na_{unik} = 0,03$, $Ng = 24$, $Ng_1 = 11$, $Ng_2 = 3$, $Ng_{unik} = 4$, $Ae = 4,928$, $I = 1,768$, $Ho = 0,808$, $He = 0,797$, $F = 0,013$, $PI_C = 0,77$, $PE = 0,613$. Генетична структура дослідженої популяції за мікросателітним локусом CA425 була наступною: розмір одержаних алельних варіантів варіював від 230 до 242 п. н., серед яких, з найбільшою частотою (0,462) зустрічався алель CA425²⁴⁰, з найменшою (0,006) – CA425²³⁰. У популяції встановлено 17 різних генотипових варіанти, з яких найпоширенішими був CA425^{240/240}. За цим

локусом шість різних генотипових варіанти зустрічались лише по одному разу та 4 генотипи – по два рази. За цим локусом розподіл генотипів достовірно не відрізнявся від стану генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом. Загалом встановлено, що за CA425 для дослідженої популяції було характерно: $N_a = 7$, $N_{a_{unik}} = 0,0003$, $N_g = 17$, $N_{g_1} = 6$, $N_{g_2} = 4$, $N_{g_{unik}} = 2$, $A_e = 3,570$, $I = 1,529$, $H_o = 0,756$, $H_e = 0,720$, $F = -0,051$, $PIC = 0,690$, $PE = 0,521$. За локусом ASB17 (2q14p15) було виявлено 13 алельних варіантів розміром від 90 до 114 п.н., серед яких з найбільшою частотою (0,256) зустрічався алель ASB17¹¹⁴, а з найменшою (0,006) – ASB17⁹⁴ та ASB17¹⁰². За цим локусом виявлено 34 різних генотипи тварин. Тварини з генотипом ASB17^{106/114} найбільш часто спостерігали у популяції. Розподіл генотипів достовірно не відрізнявся від стану генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом і для дослідженої популяції виявилось характерними наступне: $N_a = 13$, $N_{a_{unik}} = 0,06$, $N_g = 34$, $N_{g_1} = 17$, $N_{g_2} = 4$, $N_{g_{unik}} = 10$, $A_e = 6,448$, $I = 2,095$, $H_o = 0,885$, $H_e = 0,845$, $F = -0,047$, $PIC = 0,830$, $PE = 0,764$. Одержані результати вказують, що максимальні значення за низкою основних генетичних параметрів одержані за локусом ASB17 можуть бути пов'язані з його нуклеотидною послідовністю (AC)_n в порівнянні з іншими локусами для яких характерні послідовності (GT)_n – HMS06, CA425 та (TG)_n – HTG07, HTG06 VHL20.

За мікросателітними локусами з більш складною молекулярно-генетичною структурою, а саме: HTG04 ((TG)_nAT(AG)₅AAG(GA)₅ACAG(AGGG)₃), HMS03 ((TG)₂(CA)₂TC(CA)_n (TG)₂(CA)₂TC(CA)_nGA(CA)₅), АНТ04 ((AC)_nAT(AC)_n), ASB23 ((TG)_nTT(TG)₄), HMS07 ((AC)₂(CA)_n) було виявлено 51 алельний варіант в діапазоні від 119 п.н. (HTG04) до 184 п.н. (HMS07). За локусом HTG04 одержано 10 алельних варіантів розміром від 119 до 139 п.н., серед яких з найбільшою частотою (0,372) зустрічався алель HTG04¹³¹, а найменшою (0,013) – HTG04¹¹⁹. За даним локусом було встановлено 25 різних генотипових варіанти. Найбільш поширеними були тварини з генотипами HTG04^{129/131}. Тварин з різноманітними рідкісними генотипом (N_{g_1}), які зустрічались в популяції лише по одному разу було 7, а по 2 рази (N_{g_2}) – сім. Виявлено породоспецифічну алель у 139 п.н. з частотою 0,026. За цим локусом розподіл генотипів достовірно не відрізнявся від стану генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом. Загалом популяція коней за дослідженим мікросателітним локусом характеризувалось наступними генетичними показниками: $N_a = 10$, $N_{a_{unik}} = 0,340$, $N_g = 25$, $N_{g_1} = 7$, $N_{g_2} = 7$, $N_{g_{unik}} = 5$, $A_e = 4,779$, $I = 1,862$, $H_o = 0,808$, $H_e = 0,791$, $F = -0,021$, $PIC = 0,770$, $PE = 0,613$. Генетична структура за мікросателітним локусом HMS03 була наступною: розмір одержаних 10 алельних варіантів варіював від 150 до 172 п.н., серед яких, з найбільшою частотою (0,288) зустрічався алель HMS03¹⁶⁶, з найменшою (0,019) – HMS03¹⁵⁰ та HMS03¹⁶². У популяції встановлено 30 різних генотипових варіанти, з яких найпоширенішими був HMS03^{152/152}. За цим локусом сімнадцять генотипів зустрічались лише по одному разу та 3 генотипи – по два рази. За цим локусом розподіл генотипів достовірно не відрізнявся від стану генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом. Загалом встановлено, що за HMS03 було характерно: $N_a = 10$, $N_{a_{unik}} = 0,130$, $N_g = 30$, $N_{g_1} = 17$, $N_{g_2} = 3$, $N_{g_{unik}} = 6$, $A_e = 5,160$,

I – 1,875, Ho – 0,718, He – 0,806, F = 0,109, PIC – 0,780, PE – 0,457. За локусом АНТ04 з структурою мікросателітної послідоверсті (AC)_nAT(AC)_n було виявлено 11 алельних варіантів в діапазоні від 140 до 162 п.н., серед яких з найбільшою частотою (0,276) зустрічався алель АТН04¹⁶⁰, а з найменшою (0,006) – АТН04¹⁴⁰. За даним локусом було встановлено 29 генотипових варіанти. Найбільш поширеними були тварини з генотипами АНТ04^{146/160}. Тварин з різноманітними рідкісними генотипом (Ng₁), які зустрічались в популяції лише по одному разу було 13, а по 2 рази (Ng₂) – шість. За цим локусом було виявлено достовірну різницю за розподілом генотипів за Гарді-Вайнбергом ($p < 0,001$). Загалом популяція коней за дослідженим мікросателітним локусом характеризувалось наступними генетичними показниками: Na – 11, Na_{unik} – 0,200, Ng – 29, Ng₁ – 13, Ng₂ – 7, Ng_{unik} – 8, Ae – 6,631, I – 2,092, Ho – 0,910, He – 0,849, F – 0,072, PIC – 0,830, PE – 0,816. Генетична структура дослідженої популяції за мікросателітним локусом (TG)_nTT(TG)₄ – ASB23 була наступною: розмір одержаних алельних варіантів варіював від 128 до 154 п. н., серед яких, з найбільшою частотою (0,269) зустрічався алель ASB23¹³²⁸, з найменшою (0,013) – ASB23¹⁴⁰ та ASB23¹⁴⁴. У популяції встановлено 34 різних генотипових варіанти, з яких найпоширенішими був генотип ASB23^{132/148}. За цим 16 різних генотипових варіанти зустрічались лише по одному разу та 15 генотипів – по два рази. За цим локусом розподіл генотипів достовірно не відрізнявся від стану генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом. Загалом встановлено, що за ASB23 для дослідженої популяції було характерно: Na – 11, Na_{unik} – 0,180, Ng – 34, Ng₁ – 16, Ng₂ – 9, Ng_{unik} – 5, Ae – 6,922, I – 2,114, Ho – 0,859, He – 0,856, F – (-0,004), PIC – 0,840, PE – 0,713. У дослідженій популяції коней гуцульської породи за локусом HMS07 ((AC)₂(CA)_n) було виявлено 9 алельних варіантів розміром від 168 до 184 п.н., серед яких з найбільшою частотою (0,359) зустрічався алель HMS07¹⁸⁰, а з найменшою (0,006) – HMS07¹⁶⁸ та HMS07¹⁸⁴. За цим локусом виявлено 20 різних генотипів тварин. Тварини з генотипом HMS07^{180/180} найбільш часто спостерігали у популяції (15 голів). За цим локусом 8 генотипів зустрічались лише по одному разу та 5 генотипів по два рази. За HMS07 було виявлено достовірну різницю за розподілом генотипів за Гарді-Вайнбергом ($p < 0,001$). Для дослідженої популяції виявилось характерним наступне: Na – 9, Na_{unik} – 0,001, Ng – 20, Ng₁ – 8, Ng₂ – 2, Ng_{unik} – 1, Ae – 4,366, I – 1,694, Ho – 0,577, He – 0,771, F – 0,252, PIC – 0,740, PE – 0,264.

Загалом, у дослідженій популяції гуцульських коней виявлено 110 алельних варіантів за 11 мікросателітними локусами від 7-и (CA425) до 13-ти (ASB17), що становило в середньому $10 \pm 0,5$ алеля на локус, а середня кількість ефективних алелів $5,253 \pm 0,331$ в діапазоні 3,570 (CA425) – 6,922 (ASB23). З найбільшою частотою (0,372) зустрічались алелі НТГ06¹⁰⁰, НТГ07¹²⁸, з найменшою (0,006) – HMS06¹⁵⁵, CA425²³⁰, VHL20⁸³, АНТ04¹⁴⁰, HMS07^{168, 184}. За мікросателітними локусами НТГ04 НТГ06, НТГ07 було виявлено породоспецифічні алельні варіанти розміром 139 п.н. з частотою 0,026., 102 (0,006), 132 (0,013), відповідно. За всіма локусами було встановлено 286 генотипових варіанти, найбільшу кількість 34 за локусами ASB17 та CA425, а

найменшу по 17 за CA425 та HTG07. Виявлено найбільш характерні генотипи за кожним з досліджених локусів, а саме: VHL20^{87/93}, VHL20^{87/95}, VHL20^{87/97}, HTG07^{128/128}, HTG07^{126/128}, HTG06^{100/100}, HMS06^{163/169}, CA425^{240/240}, ASB17^{106/114}, HTG04^{129/131}, HMS03^{152/152}, АНТ04^{146/160}, ASB23^{132/148}, HMS07^{180/180}. За дослідженими локусами розподіл генотипів достовірно не відрізнявся від стану генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом, за винятком HTG06 (достовірна різниця за розподілом генотипів ($p < 0,001$), HMS07 ($p < 0,001$) та АНТ04 ($p < 0,01$), HTG07 ($p < 0,01$). В цілому, для дослідженої популяції встановлено наступні генетичні показники (табл. 35).

Таблиця 35

Популяційно-генетична структура коней гуцульської породи за 11 мікросателітними локусами

Локус	Na	Ae	I	Ho	He	F	PIC	PE
VHL20	11,000	6,036	2,054	0,833	0,834	0,001	0,82	0,062
HMS06	9,000	4,928	1,768	0,808	0,797	-0,013	0,77	0,613
HTG06	11,000	4,779	1,850	0,692	0,791	0,125	0,77	0,416
ASB17	13,000	6,448	2,095	0,885	0,845	-0,047	0,83	0,764
CA425	7,000	3,570	1,529	0,756	0,720	-0,051	0,69	0,521
HTG07	8,000	4,167	1,627	0,679	0,760	0,106	0,73	0,397
АНТ04	11,000	6,631	2,092	0,910	0,849	-0,072	0,83	0,816
ASB23	11,000	6,922	2,114	0,859	0,856	-0,004	0,84	0,713
HTG04	10,000	4,779	1,862	0,808	0,791	-0,021	0,77	0,613
HMS03	10,000	5,160	1,875	0,718	0,806	0,109	0,78	0,457
HMS07	9,000	4,366	1,694	0,577	0,771	0,252	0,74	0,264
Середнє	10,00	5,253	1,869	0,775	0,802	0,035	0,779	0,512
CPE								0,999882

За локусами ASB17 та HMS07 встановлено мінімальні та максимальні значення за низкою основних генетичних параметрів, що може бути пов'язане з їх нуклеотидною послідовністю та $(AC)_2(CA)_n$ в порівнянні з іншими локусами для яких характерна наявність послідовностей $(GT)_n$ – HMS06, CA425 та $(TG)_n$ – HTG07, HTG06, HTG04; VHL20, ASB23, HMS03. Для дослідженої популяції встановлено широкий спектр генотипової мінливості (Lim_{Ng}) (за 6 мікросателітними локусами ДНК з 11) з переважання в них генотипів з більшим розміром алелів та середнім рівнем поліморфізму ($Na - 10$, $Ng - 26$, $Ng_1 - 11,64$, $Na_1 - 7$, $Ng_2 - 5,09$, $Na_{unik} - 3$, $Ng_{unik} - 70$ $Ne - 5,253$ $Ho - 0,775$, $He - 0,802$, $Hi - 0,673$, $I - 1,869$, $PIC - 0,779$) та наявністю гомозиготних тварин за 5 генотипами з 18 найбільш представлених: (HTG04^{129/129}–12%, HMS06^{169/169}–17%, HTG06^{100/100}–12%, CA425^{240/240}–17%, HTG07^{128/128}–14%).

З метою подальших досліджень поліморфізму мікросателітних локусів нами був проведений порівняльний аналіз генетичної структури, в залежності від нуклеотидної послідовності мікросателітних локусів, гуцульської породи коней з представниками англійської чистокровної верхової та новоствореної

української верхової порід. Всього за 11 мікросателітними локусами виявлено 355 алельних варіантів (ГУЦ – 110, ЧВ – 88 та УВП – 154). Для тварин ЧВ кількість алельних варіантів (5 за HTG04 – 13 за ASB23) становила в середньому $8 \pm 0,632$ алелю на локус при середній кількості ефективних алелів $3,963 \pm 0,473$ в межах 1,917 (CA425) – 6,652 (ATH04). Для тварин УВП кількість алельних варіантів (11 за HTG07 – 16- за ASB17) становила в середньому $14,273 \pm 0,506$ алелю на локус при середній кількості ефективних алелів $7,627 \pm 0,403$ в межах 5,256 (CA425) – 10,041 (ASB17).

Порівняльний аналіз генетичної структури різних порід коней за основними популяційно-генетичними показниками представлено у таблиці 36.

Таблиця 36

Порівняльний аналіз популяційно-генетичних показників
досліджених порід коней

Порода	Na	Ae	Ng	Ng ₁	Ng ₂	Ng _{unik}	I	Ho	He	F	PIС
Гуцульська	10,00	5,25	26	11,6	5,1	6,4	1,869	0,775	0,802	0,035	0,779
Чистокровна верхова	8,00	3,96	15,4	6,6	3	1,5	1,539	0,653	0,707	0,081	0,670
Українська верхова	14,27	7,63	43,8	21,3	9	27,9	2,250	0,812	0,865	0,062	0,842
Середнє	10,758	5,61	28,4	13,2	5,7	11,9	1,886	0,747	0,791	0,059	0,764

Загалом, кількість різних генотипів всіх порід за дослідженими локусами знаходилась в межах від 8 за локусом HTG06 у чистокровної верхової породи до 57 за локусом HMS03 в української верхової породи. Встановлено наявність значної кількості гомозиготних генотипів за всіма мікросателітними локусами у тварин гуцульської породи (5 з 18 генотипів – HTG04^{129/129} – 12%, HMS06^{169/169} – 17%, THG06^{100/100} – 12%, CA425^{240/240} – 17%, HTG07^{128/128} – 14%), у чистокровної верхової – 7 з 16 за локусами: HTG04^{127/127} – 9%, HMS06^{169/169} – 16%, THG06^{90/90} – 16%, ASB17^{106/106} – 7%, CA425^{240/240} – 29%, HTG07^{128/128} – 11%, HMS03^{152/152} – 16%), а в української верхової – 3 з 18 за АНТG04^{160/160} – 13%, CA425^{240/240} – 29%, HTG07^{128/128} – 21%) ($p < 0,0001$). В кожній породі виявлено наявність породоспецифічних алелей, які зустрічались в одній породі і були відсутні в іншій. Найбільшу кількість алелей і локусів встановлено у тварин УВП (41 алель (82%), максимальна кількість 8 за CA425); ГУЦ (3 (27,3%) за локусами HTG04 (139 п. н.), HTG06 (102 п. н.) та HTG07 (132 п. н.); ЧВ (2 (9,1%) за локусом ASB23 (124 п. н. та 126 п. н.).

В результаті проведеного аналізу встановлено, що популяція коней УВП мала найвищі, а ЧВ найнижчі значення, ефективної кількості алелів (Ae – 7,63/3,96); індекс Шеннона (I – 2,25/1,54); фактичної (Ho – 0,812/0,653), очікуваної (He – 0,865/0,707) гетерозиготностей, індексу поліморфізму досліджених локусів (PIС – 0,842/0,670), виключення випадкового збігу алелів (PE – 0,610/0,386), за показником комбінованої вірогідності виключення випадкового збігу алелів (CPE) в середньому становила 0,99. Аналіз рівня індивідуальної гетерозиготності показав, що генетичні профілі всіх досліджених

порід були подібними між собою і відрізнялись лише за рівнем частот та серед ГУЦ не було виявлено особин з $H_i < 0,45$. Для тварин УВП був характерним найбільший рівень поліморфізму серед досліджених порід (табл. 37) на що вказують такі показники, як (найбільші середня кількість алелів (14,3), розмах алельного поліморфізму ($Lim_{Na} = 11-16$)), кількість породоспецифічних алелів (41 (89%)) та локусів в яких їх виявлено (9 (82%)), а найнижчий рівень поліморфізму спостерігали у тварин чистокровної верхової породи.

Таблиця 37

Алелофонд різних порід коней

Порода	Na/ Lim_{Na}	Na_{unic}	Частота Na_{unic}	Rarefaction (25)	
				Na	Na_{unic}
Гуцульська	10 (7–13)	3	0,015	$9,54 \pm 0,471$	$0,28 \pm 0,092$
Чистокровна верхова	8 (5–13)	2	0,01	$7,97 \pm 0,629$	$0,24 \pm 0,175$
Українська верхова	14,3 (11–16)	41	0,019	$12,96 \pm 0,434$	$2,93 \pm 0,314$

Встановлено нижчий рівень фактичної гетерозиготності ніж очікуваної в середньому по виду та за всіма породами, що вказує на тенденцію до консолідації порід.

За результатами розрахунку Гарді-Вайнбергом (MCMC) встановлено, що у популяції ГУЦ за 7 локусами розподіл генотипів достовірно не відхилявся від стану генетичної рівноваги, а достовірну різницю було виявлено лише за локусами АТН04, НТГ07 ($p < 0,01$) та НТГ06, НМС07 ($p < 0,001$); У ЧВ породи лише чотири локуси знаходились у стані рівноваги (НТГ06, НТГ07, VHL20 та НМС07), а 7 мали достовірні відхилення, а у УВП лише за локусами VHL20 та НМС07 не спостерігали відхилення від стану генетичної рівноваги. За локусом АТН04 в усіх порід було достовірно встановлено відхилення від стану генетичної рівноваги і лише один локус VHL20 знаходився у стані генетичної рівноваги в усіх трьох порід коней. Значення індексів С. Райта ($F_{is} = 0,062$ та $F_{it} = 0,108$) свідчать про значний рівень генетичної консолідованості популяцій коней (табл. 38).

Водночас, тварини досліджених порід характеризувались незначним але достовірним рівнем генетичної диференціації ($F_{st} = 0,049$) ($p < 0,001$, крім НТГ07, що підтверджується результатами аналізу молекулярної мінливості (AMOVA) (відносно низьке значення (0,089) генетичної диференціації порід є високо достовірним ($p \leq 0,001$)) таблиця 39. Середнє значення потоку генів для цього виду становило 5,599.

Таблиця 38

Індекси фіксації С. Райта у коней різних порід

Локус	<i>F_{is}</i>	<i>F_{it}</i>	<i>F_{st}</i>
ASB17	0,012	0,054	0,043
VHL20	-0,021	0,039	0,059
HTG07	0,120	0,126	0,007
HTG06	0,039	0,151	0,116
HMS06	0,033	0,083	0,052
CA425	0,121	0,167	0,052
АНТ04	0,059	0,071	0,013
ASB23	0,046	0,063	0,017
HMS07	0,083	0,106	0,025
HMS03	0,116	0,174	0,066
HTG04	0,082	0,158	0,084
В середньому	0,062±0,014	0,108±0,015	0,049±0,010
95% CI	[0,035; 0,087]	[0,080; 0,136]	[0,031; 0,069]

Примітка: 95% CI – 95% довірчий інтервал

Таблиця 39

Результати аналізу генетичної мінливості (AMOVA)

мінливість	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>E(MS)</i>	<i>Φ_{st}</i>	<i>p</i>
між групами	2	176,033	88,017	0,934		
В середині груп	278	2672,910	9,615	9,615	0,089	0,001
Загальна	280	2848,943	97,632	10,549		

Точність прогнозу щодо віднесення певної тварини до однієї з порід (*assignment*-тест, табл. 40) становив близько 89,8%.

Таблиця 40

Assignment-тест між різними породами коней

Фактична група	Теоретична група			Точність прогнозу
	ГУЦ	ЧВ	УВП	
ГК	73	3	2	93,6
БЧ	3	47	1	92,2
УВП	15	10	127	83,6
	91	60	130	89,8

Суттєвих відмінностей за показником *M-ratio* не було встановлено серед досліджених порід коней, що, як і у ВРХ, свідчить про приблизно однаковий рівень мікроеволюційних процесів в даних популяціях (табл. 41).

Таблиця 41

Показник *M-ratio* для мікросателітних локусів різних порід коней

Локус	ГУЦ		ЧВ		УВП		В цілому	
	Na	<i>M-ratio</i>	Na	<i>M-ratio</i>	Na	<i>M-ratio</i>	Na	<i>M-ratio</i>
ASB17	13	0,520	8	0,348	16	0,457	16	0,457
VHL20	11	0,478	7	0,467	15	0,517	15	0,517
HTG07	8	0,533	7	0,539	11	0,524	12	0,522
HTG06	11	0,407	7	0,333	15	0,484	16	0,516
HMS06	9	0,529	7	0,467	12	0,522	12	0,522
CA425	7	0,539	7	0,467	16	0,485	16	0,485
АНТ04	11	0,478	9	0,429	15	0,484	15	0,484
ASB23	11	0,407	13	0,448	14	0,519	16	0,516
HMS07	9	0,529	8	0,533	14	0,519	14	0,519
HMS03	10	0,435	10	0,476	16	0,485	16	0,485
HTG04	10	0,476	5	0,556	13	0,482	14	0,519

Результати порівняльної оцінки фактичної та рівноважної гетерозиготності вказують на тенденцію прояву ефекту «пляшкового горлечка» для всіх досліджених порід коней, оскільки нульову гіпотезу можна відкинути для ГУЦ – $p < 0,05$, УВП $p < 0,01$, ЧВ – $p < 0,001$ (тест знаків) (табл. 42).

Таблиця 42

Гетерозиготність мікросателітних локусів коней різних порід

Локус	ГУЦ		ЧВ		УВП	
	<i>Ho</i>	<i>Heq</i>	<i>Ho</i>	<i>Heq</i>	<i>Ho</i>	<i>Heq</i>
ASB17	0,885	0,877	0,706	0,800	0,901	0,896
VHL20	0,833	0,851	0,725	0,769	0,914	0,889
HTG07	0,679	0,791	0,647	0,769	0,724	0,845
HMS06	0,808	0,818	0,647	0,767	0,796	0,860
CA425	0,756	0,762	0,314	0,768	0,691	0,896
АНТ04	0,910	0,851	0,765	0,823	0,789	0,890
ASB23	0,859	0,851	0,824	0,884	0,816	0,882
HMS07	0,577	0,816	0,765	0,797	0,862	0,880
HMS03	0,718	0,836	0,588	0,843	0,796	0,896
HTG04	0,808	0,832	0,588	0,671	0,783	0,871
Тест знаків	0,03863		0,00006		0,00801	

Випадки зчепленого успадкування різних локусів спостерігали в усіх досліджених порід (табл. 43), оцінка міри не випадкового об'єднання гамет (HWD) у тварин достовірно не відрізнялась між породами і була близька до 0.

Таблиця 43

Результати аналізу LD

Порода	N_{LD}	HWD	df	χ^2	p
ГУЦ	29	0,0101	11	7,77	0,7341
ЧВ	24	0,0106	11	7,67	0,7425
УВП	106	0,0557	11	13,67	0,2516

В результаті проведеного аналізу за 11 мікросателітними локусами виявлено найбільш характерні спектри для кожної з досліджених порід. Встановлено, що найбільший рівень поліморфізму за мікросателітними локусами ДНК спостерігався у тварин новоствореної української верхової породи.

Генетична структура різних порід *Equus caballus* за мультилокусними ділянками ДНК. За ISSR маркерами у коней гуцульської породи (табл. 44) одержано 54 локуси, 33 з яких були поліморфними. За локусами $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(GA)_6CC$, $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$, $(CTC)_6C$ рівень інформативності PIC становив 0,290 – 0,401, за $(AG)_8CA$ PIC – 0,600, а за $(AG)_8CG$ спектр фрагментів був консервативним.

Таблиця 44

Характеристика тварин гуцульської породи за ISSR-локусами

Локус	$(GA)_9C$	$(AG)_9C$	$(AG)_8C$	$(AG)_8C$	$(GA)_6C$	$(ACC)_6G$	$(GAG)_6C$	$(CTC)_6C$	Σ
К-сть локусів	8	5	9	6	8	5	9	4	54
Діапазон	280-930	320-1050	260-1230	300-870	380-1750	380-1050	280-870	680-1750	260-1750
Поліморфні локуси	6	4	6	0	4	4	6	3	33
PIC	0,32	0,30	0,60	0	0,41	0,29	0,31	0,29	0,31
P, %	75	60	67	0	50	80	67	75	59,2

У коней арабської породи за ISSR-маркерами (табл. 45) виявлено 53 фрагменти в діапазоні 280–1900 пн, 9 з яких – поліморфні.

В результаті міжпородного аналізу (табл. 46) встановлено, що найбільша частка поліморфних локусів була характерна для коней гуцульської породи (0,494), а для арабської (0,172), середнє генне різноманіття на локус (H_s) – 0,603 та 0,546, алельне різноманіття (H') – 0,311 та (0,116), ступень різноманітності (μ) – 25,97 та 3,99, відповідно. Частка рідкісних локусів h_u у коней арабської породи становила 0,560, а в коней гуцульської породи 0,200.

Таблиця 45

Характеристика тварин арабської породи за ISSR-локусами

Локус	(GA) ₉ C	(AG) ₉ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ CG	(GA) ₆ CC	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(CTC) ₆ C	Σ
К-сть локусів	4	5	6	7	12	5	6	8	53
Діапазон (п.н.)	380- 870	280- 590	380- 1050	320-870	340- 1750	380- 1050	340- 1050	500- 1900	280 - 190 0
Поліморф ні локуси	0	2	1	1	1	0	2	2	9
РІС	0	0,14	0,16	0,05	0,03	0	0,14	0,1	0,08
Р, %	0	40	17	14,2	8,3	0	33,3	25	17,2 2

Таблиця 46

Міжпородний аналіз коней гуцульської та арабської порід за ISSR-маркерами

Порода	Р	H _s	H'	μ	h _μ
Гуцульська	0,498	0,603	0,311	25,9 ± 3,96***	0,20 ± 0,12
Арабська	0,172	0,546	0,116	3,99 ± 1,99***	0,56 ± 0,22

Примітка: Р – частка поліморфних локусів, H_s – середнє на локус генне різноманіття, H' – інформаційний індекс Шеннона, μ – показник внутрішньопопуляційного різноманіття, h – частка рідкісних локусів; *** P > 0,999.

Загалом, встановлено, що для популяції коней гуцульської характерними є вищий рівень генетичного різноманіття. Оцінка стану генофондів коней гуцульської та арабської порід за ISSR – локусами ДНК проводили за наступними показниками генетичного різноманіття: частка поліморфних локусів – Р, середнє на локус генне різноманіття – H_s, інформаційний індекс Шеннона – H', показник внутрішньопопуляційного різноманіття – μ та частку рідкісних локусів – h_μ. Найбільша частка поліморфних локусів була встановлена для коней гуцульської породи (0,494), у порівнянні з конями арабської породи (0,172) (табл. 47).

Таблиця 47

Основні показники генетичного різноманіття коней
гуцульської та арабської порід

Порода	Р	H _s	H'	μ	h _μ
Гуцульська	0,498	0,603	0,311	25,9 ± 3,96***	0,20 ± 0,12
Арабська	0,172	0,546	0,116	3,99 ± 1,99***	0,56 ± 0,22

Примітка: Р – частка поліморфних локусів, H_s – середнє на локус генне різноманіття, H' – інформаційний індекс Шеннона, μ – показник внутрішньопопуляційного різноманіття, h – частка рідкісних локусів; *** P > 0,999.

Середнє на локус генне різноманіття (H_s), яке визначає гетерозиготність за всіма локусами, для гуцульської породи коней було найвище і складало 0,603, у коней арабської породи – 0,546. Найбільші показники алельного різноманіття (H') властиві коням гуцульської породи (0,311) і найменш виражена ця різноманітність (0,116) у коней арабської породи. Середнє число поліморфних локусів μ (ступінь різноманіття за поліморфною ознакою) становив у гуцульської породи μ (25,97), арабської μ (3,99), відповідно. Високі значення μ можуть вказувати на нерівномірність розподілу частот алелів, так частка рідкісних локусів ($h_{\mu} = 0,56$) була у коней арабської породи, а в коней гуцульської породи дорівнювала - 0,20. За результатами оцінки стану генофондів досліджених коней встановлено, що найвище генетичне різноманіття притаманне коням гуцульської породи. Для встановлення внутрішньопородної та міжпородної мінливості у досліджуваних коней застосовували генофондний профіль (сукупність всіх виявлених фрагментів ISSR-PCR локусів та їх частоту) та породоспецифічні патерни (фрагменти ДНК, які зустрічалися з найбільшою частотою (частота $> 0,4$)). В результаті проведеної роботи встановлено, що найбільша міжпородна відмінність спостерігалась за локусом $(GA)_6CC$. Так, коні арабської породи відрізнялися 9 фрагментами від коней порід гуцульської, які різнилися між собою лише одним фрагментом (гуцульські коні – фрагментом A28). У гуцульської породи коней за локусом $(AG)_8C$ міжпородна відмінність з кінями арабської породи не проявилася. Відсутність міжпородної відмінності за локусом $(AG)_8CA$ спостерігалась і в арабської породи коней по відношенню до інших досліджуваних порід. В результаті проведеної роботи були встановлені породоспецифічні фрагменти за дослідженими локусами (для коней гуцульської породи за локусом $(GA)_9C$ (880–930 п. н), $(AG)_9C$ (760–810 п. н), $(AG)_8CA$ (1180–1230 п. н), $(CTC)_6C$ (1400–1450 п. н), $(GAG)_6C$ (470–490 п. н; 260–270 п. н); для арабської породи $(GA)_6CC$ (1300–1350, 1060–1110, 560–590, A – 440–460, A – 340–350), $(GAG)_6C$ (440–460; 340–350), $(CTC)_6C$ (1800–1900; 880–930).

Аналіз генетичної структури свійської курки (Gallus domesticus) в залежності від нуклеотидної послідовності та кількості тандемних повторів за монолокусними ділянками ДНК. В результаті проведеного аналізу за 5 досконалими динуклеотидними мікросателітними локусами MCW0248, LEI094, MCW0216, ADL0268, ADL0278 п'яти спеціалізованих промислових яєчних кросів *Gallus domesticus*. було виявлено 164 алельних варіантів в діапазоні від 104 п.н. за локусами ADL0268, ADL0278 до 283 п. н. за LEI094. За локусом MCW0248 з структурою мікросателітної послідоверсті $(AC)_9$ загалом було виявлено 9 різних за розміром алельних варіантів в діапазоні довжин 207 – 223 п.н., для птиці кросу ЛБ – 3 алельні варіанти розміром 211 – 221 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,785) зустрічався алель MCW248²¹³, а найменш часто (0,010) – MCW248²²¹; кросу ЛК 9 алельних варіанти розміром від 207 до 223 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,331) зустрічався алель MCW248²¹³, а найменш часто (0,006) – MCW248²⁰⁷; кросу ХСБ 6 алельних варіантів розміром від 211 до 221 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,418) зустрічався алель MCW248²¹⁵, а найменшою частотою (0,033) – MCW248²¹¹ та MCW248²²¹, кросу

ХЛБ 4 алельні варіанти розміром від 213 до 219 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,636) зустрічався алель MCW248²¹³, а найменш часто (0,045) – MCW248²¹⁹; кросу ХСК 6 алельних варіантів розміром від 213 до 223 п.н., серед яких з найбільшою частотою (0,272) зустрічався алель MCW248²²¹, а найменш часто (0,037) – MCW248²²³. Частота окремих алельних варіантів локусу MCW0248 достовірно відрізнялась у різних кросів птиці ($p = 0,0001$). За даним локусом було встановлено 26 різних генотипових варіантів (N_g). У птиці кросу ЛК – 21, ХСК – 14, ХСБ – 8, ЛБ та ХЛБ – по 4. Найбільш поширеними була птиця з генотипом MCW0248^{213/213} (31,6%). Загалом для досліджених кросів птиці встановлено наступні генетичні показники: рідкісних генотипів (N_{g1}), які зустрічались в популяції лише по одному разу було шість, по 2 рази (N_{g2}) – чотири; кількість породоспецифічних генотипів ($N_{g_{unic}}$) дванадцять.

Генетична структура досліджених кросів за мікросателітним локусом (AC)₁₆ – LEI094 була наступною: діапазон різних за розміром 25 алельних варіантів варіював від 143 до 283 п. н., у птиці кросу ЛБ виявлено 8 алельних варіантів розміром від 143 до 279 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,725) зустрічався алель LEI094²⁵⁹, а найменш часто (0,010) – LEI094²⁴⁷; кросу ЛК 17 алельних варіантів розміром від 165 до 283 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,259) зустрічався алель LEI094²⁵⁹, а найменш часто (0,006) – LEI094¹⁶⁵ та LEI094²⁵⁵, кросу ХСБ 9 алельних варіантів розміром від 241 до 281 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,262) зустрічався алель LEI094²⁶¹, а найменш часто (0,008) – LEI094²⁴¹, кросу ХЛБ 6 алельних варіантів розміром від 245 до 263 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,477) зустрічався алель LEI094²⁶¹, а найменш часто (0,023) – LEI094²⁴⁵, LEI094²⁴⁷ та LEI094²⁵⁵, кросу ХСК – 11 алельних варіантів розміром від 245 до 281 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,204) зустрічався алель LEI094²⁴⁵, а найменш часто (0,006) – LEI094²⁵³ та LEI094²⁸¹. Частота окремих алельних варіантів достовірно відрізнялась у птиці різних кросів ($\chi^2 = 595,42$; $df = 84$; $p_{mc} = 0,0001$). Найбільший розмах спостерігали у птиці кросів ЛБ (LEI094¹⁴³ – LEI094²⁷⁹) та ЛК (LEI094¹⁶⁵ – LEI094²⁸³), а найменший поліморфізм у ХЛБ (LEI094²⁴⁵ – LEI094²⁶³). Найвищою частотою, з виявлених алелів, характеризувався алель LEI094²⁵⁹ у ЛБ (0,725). Слід відмітити, що алелі LEI094¹⁴³ та LEI094¹⁵⁷ було виявлено тільки у ЛБ; LEI094¹⁶⁵, LEI094²⁶⁷, LEI094²⁷¹, LEI094²⁷³, LEI094²⁷⁷, LEI094²⁸³ – лише у ЛК; LEI094²⁴¹ – у ХСБ, а LEI094²⁵³ – у ХСК. За цим локусом встановлено 55 (13,48%) різних генотипових варіантів (ХСК – 32, ЛК – 27, ХСБ – 19, ЛБ – 11 та ХЛБ – 8). У птиці кросу ЛК найчастіше зустрічався генотип – LEI094^{259/263} (21,69%), у ХСБ – LEI094^{259/261} (14,75%), ХЛБ – LEI094^{261/261} (27,27%), у ХСК – генотип LEI094^{245/247} (14,82%). Найпоширенішим був генотип LEI094^{259/259} (20,34%) і у кросі ЛБ він становив 58 особин (58 %). Загалом для досліджених кросів птиці встановлено наступні генетичні показники: рідкісних генотипів (N_{g1}), які зустрічались в популяції лише по одному разу було 13, по 2 рази (N_{g2}) – 13; кількість породоспецифічних генотипів ($N_{g_{unic}}$) – 31.

Таким чином, в результаті порівняльного аналізу генетичної структури свійської курки (*Gallus domesticus*) за локусами MCW0248 (AC)₉, та LEI 094

(AC)₁₆ з однаковими пурін-піримидиновими нуклеотидними послідовностями AC але різною кількістю тандемних повторів, встановлено, що за більшістю основних генетичних показників найбільш інформативним виявився локус з більшою кількістю тандемних повторів LEI 094 (AC)₁₆ у порівнянні з (AC)₉ за MCW0248, а саме: за цим локусом, як за кожними кросом так і за видом загалом, спостерігали найбільшу кількість (25) різних за розміром алельних варіантів в діапазоні довжин (143 до 283 п. н.) в порівнянні з 9 (207 – 223 п. н.) за MCW0248, генотипових варіантів 55/26, рідкісних генотипів (Ng₁) 13/6, Ng₂ – 13/4 та породоспецифічних генотипів (Ng_{unic}) 31/12, відповідно.

За локусом ADL0278 з нуклеотидною структурою мікросателітної послідовності (TG)₁₈ у локусів MCW0248 (AC)₉, та LEI 094 (AC)₁₆ загалом було виявлено 10 різних за розміром алельних варіантів в діапазоні 104 п.н. – 122 п. н. У птиці кросу ЛБ виявлено 4 алельних варіантів розміром від 106 до 116 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,470) зустрічався алель ADL278¹¹⁴, а найменш часто (0,110) – ADL278¹⁰⁶, кросу ЛК – 7 алельних варіантів розміром від 104 до 118 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,343) зустрічався алель ADL278¹¹⁴, а найменш часто (0,030) – ADL278¹⁰⁴, кросу ХСБ – 8 алельних варіантів розміром від 106 до 122 п. н., з найбільшою частотою (0,451) зустрічався алелі ADL278¹²⁰, а найменш часто (0,016) – ADL278¹²², кросу ХЛБ – 6 алельних варіантів розміром від 106 до 118 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,386) зустрічався алель ADL278¹¹⁴, а найменш часто (0,023) – ADL278¹¹⁸, кросу ХСК – 7 алельних варіантів розміром від 108 до 122 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,185) зустрічався алель ADL278¹⁰⁸, а найменш часто (0,099) – ADL278¹¹⁰. Частота алельних варіантів достовірно відрізнялась у птиці різних кросів ($p = 0,0001$). Найбільш розповсюдженим алелем у птиці кросів ЛБ, ЛК та ХЛБ був ADL0278¹¹⁴, у ХСБ – ADL0278¹²⁰, а у ХСК частоти алелів були приблизно однаковими. Алель ADL0278¹⁰⁴ було визначено лише у особин кросу ЛК, алелі ADL0278¹¹⁰, ADL0278¹²⁰ та ADL0278¹²², було виявлено тільки у кросах ХСБ та ХСК. За локусом ADL0278 виявлено 36 різних генотипових варіанти, у птиці кросу ЛК – 22 (61,11%), ХСК – 21 (58,33%), ХСБ – 13 (36,11%), ХЛБ – 10 (27,78%) та ЛБ – 8 (22,22%). Найпоширенішим серед досліджуваних представників був генотип ADL0278^{108/114} (13,97%). Цей генотип найбільш часто зустрічався в кросах ЛБ (40%) та ЛК (16,87%), для кросі ХСБ найчастіше зустрічається генотип – ADL0278^{120/120} (31,15%), ХЛБ – ADL0278^{106/114} (27,27%), у ХСК – генотипи ADL0278^{110/116} та ADL0278^{120/122} (по 11,11%). За дослідженням локусом встановлено 16 породоспецифічних генотипи (Ng_{unic}): у ХСК – 9, у ЛК – 5, у ХСБ – 2, у ЛБ та ХЛБ – жодного.

За локусом MCW0216 з нуклеотидною структурою мікросателітної послідовності (GT)₉ загалом було виявлено 11 різних за розміром алельних варіантів в діапазоні 125 п. н. – 147 п. н. У птиці кросу ЛБ виявлено 4 алельні варіанти розміром від 125 до 137 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,920) зустрічався алель MCW216¹³⁷, а найменш часто (0,010) – MCW216¹³⁵, кросу ЛК – 8 алельних варіантів розміром від 125 до 141 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,398) зустрічався алель MCW216¹³⁵, а найменш часто (0,006) –

MCW216¹²⁷, кросу ХСБ – 5 алельних варіантів розміром від 135 до 143 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,393) зустрічався алель MCW216¹³⁷, а найменш часто (0,008) – MCW216¹⁴³, кросу ХЛБ – виявлено 4 алельні варіанти розміром від 137 до 143 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,384) зустрічався алель MCW216¹³⁹, а найменш часто (0,045) – MCW216¹⁴³, кросу ХСК – 7 алельних варіантів розміром від 135 до 147 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,241) зустрічався алель MCW216¹³⁹, а найменш часто (0,074) – MCW216¹⁴⁷. Частота алельних варіантів дослідженого локусу достовірно відрізнялась у птиці різних кросів ($p = 0,0001$). У птиці кросів ЛБ та ХЛБ з найбільшою частотою виявлявся алель MCW0216²¹³, у ХСБ – MCW0216²¹⁵, у птиці кросів ХЛБ та ХСК частоти алелів були розподілені приблизно порівну. Встановлено специфічні алельні варіанти притаманні лише птиці відповідного кросу: MCW0216¹⁴⁵ та MCW0216¹⁴⁷ було виявлено лише у ХСК, MCW0216¹²⁹ та MCW0216¹³³ – ЛК, MCW0216¹²⁵ та MCW0216¹²⁷ виявляли в кросах ЛБ та ЛК. Найбільший розмах алельного поліморфізму за даним локусом зафіксовано у кросу ЛК (MCW0216²⁰⁷ – MCW0216²²³), а найменший – у ХЛБ (MCW0216²¹³ – MCW0216²¹⁹). За цим локусом встановлено 20 різних генотипових варіантів, у птиці кросу ЛК – 12 (60%), ХСК – 9 (45%), ХСБ – 7 (35%), ХЛБ – 5 (25%) та 4 (20%) у ЛБ). Найпоширенішим був генотип MCW0216^{137/137} (133 (32,6%). Цей же генотип є наймасовішим в кросах ЛБ (84 особини (84%) та ХСБ (38 особин (31,15%). У птиці кросу ЛК наймасовішим був алель MCW0216^{135/137} (21 особина (25,3%), у ХЛБ – MCW0216^{137/141} та MCW0216^{139/141} (по 7 особин (31,82%), а у ХСК найчастіше зустрічається генотип – MCW0216^{137/139} (у 13 особин (16,05%,). За цим локусом виявлено 14 породоспецифічних генотипів (у кросі ХСК – 7, ЛК – 5, в ЛБ та ХЛБ по 1, ХСБ – жодного. Загалом для досліджених кросів птиці встановлено наступні генетичні показники: рідкісних генотипів (Ng_1), які зустрічались в популяції лише по одному разу не було виявлено, по 2 рази (Ng_2) – 1; кількість породоспецифічних генотипів (Ng_{unic}) – 14.

За локусом ADL268 з нуклеотидною структурою мікросателітної послідовності (GT)₁₂ загалом було виявлено 6 різних за розміром алельних варіантів в діапазоні 104 п. н. – 114 п. н. У птиці кросу ЛБ виявлено 4 алельні варіанти розміром від 106 до 112 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,485) зустрічався алель ADL268¹⁰⁸, а найменш часто (0,060) – ADL268¹⁰⁶, кросу ЛК – 5 алельних варіантів розміром від 104 до 112 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,367) зустрічався алель ADL268¹¹⁰, а найменш часто (0,024) – ADL268¹⁰⁴, кросу ХСБ – 4 алельні варіанти розміром від 106 до 112 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,367) зустрічався алель ADL268¹¹⁰, а найменш часто (0,016) – ADL268¹⁰⁶, кросу ХЛБ – 4 алельні варіанти розміром від 104 до 114 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,500) зустрічався алель ADL268¹⁰⁸, а найменш часто (0,023) – ADL268¹⁰⁴, кросу ХСК – 6 алельних варіантів розміром від 104 до 114 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,265) зустрічався алель ADL268¹¹⁰, а найменш часто (0,019) – ADL268¹⁰⁴. Частота окремих алельних варіантів локусу ADL268 достовірно відрізнялась у птиці різних кросів ($p_{mc} = 0,0001$) при нерівномірності їх розподілу. В окремих кросах

спостерігається значна ($> 30\%$) консолідація за окремими алельними варіантами, а саме: у ЛБ – за ADL268¹¹⁰ (30%) та ADL268¹⁰⁸ (48,5%); у ЛК – за ADL268¹⁰⁸ (33,7%) та ADL268¹¹⁰ (36,7%); у ХСБ – за ADL268¹¹⁰ (49%); у ХЛБ – за ADL268¹¹² (31,8%) та ADL268¹⁰⁸ (50%); і у ХСК – за ADL268¹⁰⁸ (31%). За локусом ADL268 з 6 виявлених алельних варіантів відносно високу частоту (0,2–0,3) мали лише 3, а інші ADL268¹⁰⁴ зустрічався з частотою меншою за 0,025. Найбільший розмах встановлено у кросах ХЛБ та ХСК (ADL268¹⁰⁴ – ADL268¹¹⁴), середній – ЛК (ADL268¹⁰⁴ – ADL268¹¹²) та ХСБ (ADL268¹⁰⁶ – ADL268¹¹⁴) і найбільш консолідованими за даним показником виявилась птиця кросу ЛБ (ADL268¹⁰⁶ – ADL268¹¹²). Найвищою частотою, з виявлених алелів, характеризувались ADL268¹⁰⁸ (0,500 у ХЛБ та 0,485 у ЛБ), а також ADL268¹¹⁰ (0,490 у ХСБ). Серед особин кросу ХСБ не було виявлено алелю ADL268¹⁰⁴, а алель ADL268¹¹⁴ був відсутній в кросах ЛБ та ЛК. Спектри алельного різноманіття продемонстрували спільні для всіх досліджуваних кросів тенденції. За цим локусом виявлено 20 різних генотипових варіантів, 5 (25%) у ХЛБ, по 8 у кросів ЛБ (40%) та ХСБ (40%), 12 (60%) у ЛК, та 17 (85%) у ХСК. Генотип ADL268^{108/110} був найбільш розповсюдженим як загалом (108 особин (26,47%) так і за кросами ЛК 19 (22,89%), ХСБ 26 (21,31%) та ЛБ 50 (50%). У кросах ХСК та ХЛБ найбільш поширені були генотипи ADL268^{108/108} (17,28%) та ADL268^{108/112} (63,64%), відповідно. Породоспецифічні генотипи (14) за локусом ADL268 були виявлені лише у кросі ХСК – 7 та ХЛБ – 5.

Таким чином, в результаті порівняльного аналізу генетичної структури свійської курки (*Gallus domesticus*) за двома локусами MCW0248 (AC)₉ та LEI 094 (AC)₁₆ з однаковими пурін-пиримидиновими нуклеотидними послідовностями AC з трьома мікросателітними локусами ADL0268 (GT)_n, MCW021 (GT)_n, ADL0278 (TG)_n встановлено, що найбільш інформативними, як за кожними кросом так і за видом загалом, є мікросателітні локуси з коровим мотивом тандемних послідовностей (AC)_n за цими локусами встановлено найбільшу кількість різних за розміром алельних варіантів 34 в порівнянні з 27 локусів з послідовністю (GT)_n та (TG)_n, генотипів (Ng) 81/76; рідкісних генотипів (Ng₁) 19/9, Ng₂ – 17/7 та породоспецифічних генотипів (Ng_{unic}) 43/38, відповідно.

Серед мікросателітних локусів з однаковою нуклеотидною структурою але різною кількістю тандемних повторів найбільш інформативним виявився локус з більшою кількістю тандемних повторів LEI 094 (AC)₁₆ у порівнянні з (AC)₉ MCW0248: за цим локусом, спостерігали найбільшу кількість (25) різних за розміром алельних варіантів в діапазоні довжин (143 до 283 п.н.) в порівнянні з 9 (207 – 223 п.н.) за MCW0248, генотипових варіантів 55/26, рідкісних генотипів (Ng₁) 13/6, Ng₂ – 13/4 та породоспецифічних генотипів (Ng_{unic}) 31/12, відповідно. Однак ця тенденція не спостерігалась за іншими локусами ADL0268 (GT)₁₂ та MCW0216 (GT)₉, що може бути пов'язано з нуклеотидною структурою мікросателітного повтору та невеликої різниці у кількості тандемних повторів у цих локусах.

Аналіз генетичної структури двох порід собак (Canis familiaris) в залежності від нуклеотидної послідовності та кількості тандемних повторів за монолокусними ділянками.

В результаті проведеної роботи кількість виявлених алельних варіантів для собак породи НВ знаходилась в межах від 5-и PEZ06 до 13-ти PEZ08 і становила в середньому 9,2 алеля на локус, а середня кількість ефективних алелів 6,451 від 5,053 (FHC2010) до 10,04 (PEZ08), а у собак НД ці показники були - від 6-ти PEZ01 до 13-ти PEZ08; 8,4 алеля на локус при ефективній кількості алелів 6,244 в діапазоні 4,469 (PEZ01) - 7,843 (PEZ08), відповідно. При порівняльному аналізі генетичної структури двох порід собак (*Canis familiaris*) НВ та НД за локусами PEZ06 та PEZ08 з пуріновими тетра nukлеотидними послідовностями (GAAA)_n, (AAAG)_n, відповідно, було одержано наступні результати: для тварин НВ кількість алельних варіантів (N_a) за PEZ06 – 5 (від 166 до 174 п. н., серед яких з найбільшою частотою (0,359) зустрічались алель PEZ06¹⁸², а найменшою (0,077) – PEZ06¹⁹⁰), PEZ08 – 13 (210 до 258 п. н., з частотою (0,179) зустрічався алель PEZ08²¹⁸, (0,026) – PEZ08²³⁴, PEZ08²⁵⁸), у НД – 8 (від 166 до 206 п. н., з найбільшою частотою (0,250) зустрічався алель PEZ06¹⁷⁰, а найменш часто (0,050) – PEZ06¹⁸²) та 13 (від 210 до 258 п.н., з найбільшою частотою (0,200) PEZ08²²², PEZ08²⁴⁶, а (0,025) – PEZ08²¹⁰, PEZ08²¹⁸, PEZ08²⁴², PEZ08²⁵⁰ та PEZ08²⁵⁴), відповідно; середня кількість ефективних алелів становила у НВ – 10,04 (PEZ08) у НД – 7,843. Найбільший рівень алельного різноманіття встановлено у тварин породи НД за локусом PEZ08 (13), а найнижчий – у НВ за локусом PEZ06 (5). За PEZ06 у НВ – 11 різних генотипових варіантів (найпоширеніший PEZ06^{186/202}), НД – 8 (PEZ06^{166/178} та PEZ06^{170/202}). За PEZ08 виявлено НВ – 24 різних генотипових варіантів (PEZ08^{218/218}) у НД – 13 (PEZ08^{222/246}). За локусом PEZ08 серед НВ встановлено 3 породоспецифічних генотипи, за PEZ06 – 7, а у собак НД таких генотипів виявлено не було. В результаті аналізу встановлено, що найбільш поліморфним, як за видом, так і за породами є локус PEZ08 в порівнянні з PEZ06 (кількість виявлених алельних варіанти 26/13, генотипових (N_g) – 37/19, N_{g1} (генотипи, які виявлено в популяції один раз) – 20/6, (N_{g2}) (генотипи, які виявлено в популяції два рази) – 13/3.

Загалом, в результаті аналізу генетичної структури двох порід собак за 5 мікросателітними локусами встановлено високий рівень консолідованості за одним чи двома алельними варіантами зафіксовано у НВ – за PEZ06¹⁸⁶ (0,359), НД – за PEZ01¹²⁰ (0,300), а у РТ – за PEZ01¹⁰⁰ (0,275), PEZ01¹⁰⁸ (0,300), PEZ08²²⁶ (0,325) та FHC2010²³⁶ (0,575) та генотиповими (за 3 з 5 МСЛ (PEZ01, PEZ08 та FHC2010) у представників порід НВ та НД ці генотипи були однаковими. Генотипи PEZ06^{186/202}, PEZ06^{174/178}, FHC2054^{166/168}, FHC2054^{148/162} та FHC2054^{160/162} є породоспецифічними для НВ. Найбільшим поліморфізмом характеризувались тварини породи НВ, про що свідчать найширший та найповніший спектр (Lim_{N_a} = 5–13), найбільша кількість виявлених алелів (N_a = 9,2) та генотипів (N_g = 18,4), рідкісних (N_{g1} = 8,6 N_{g2} = 4,8) та породоспецифічних (N_{g_{unik}} = 5,8) генотипів, ефективних алелів (A_e = 6,451) та значення індексу Шеннона (I = 1,958). Високий рівень генетичного поліморфізму зафіксовано, також, у собак породи

НД. Для цієї породи характерними виявились найбільші значення фактичної ($H_o = 0,754$), очікуваної ($H_e = 0,833$) та індивідуальної ($H_i = 0,820$) гетерозиготностей та індексу поліморфізму ($PIC = 0,812$), середній розмах алельних спектрів ($Lim_{Na} = 6-11$), середня кількість виявлених ($N_a = 8,4$) та ефективних алелів ($A_e = 6,244$), а також індексу Шеннона ($I = 1,920$), найменша кількість виявлених ($N_g = 10,4$) та рідкісних ($N_{g1} = 5$, $N_{g2} = 3$) генотипів, $F = 0,012$, а також відсутність породоспецифічних алелів та генотипів. Загальна кількість генотипових варіантів у особин даного виду коливалась від 15 (за локусом FHC2010) до 27 (за локусом FHC2054). При цьому, найвищий рівень генотипового поліморфізму було зафіксовано за локусом PEZ08 у особин, що належать до породи НВ ($N_g = 24$). Загалом по виду *Canis familiaris* має місце подібність генетичних процесів в досліджених породах, про що свідчать однакові діапазони та межі розмаху спектрів алельного ($Lim_{Na} = 5-13$) і генотипового ($Lim_{Ng} = 7-24$) поліморфізму та практично однакові кількість виявлених алельних варіантів ($N_a = 8,2-9,2$) (різниця не перевищувала 3 алелів/локус), що вказує про приблизно однаковий рівень генетико-автоматичних процесів в даних популяціях.

Генетична мінливість досліджених таксонів свійських тварин. З метою оцінки генетичної мінливості проведено порівняльний аналіз особливостей генетичного поліморфізму у представників видів *Bos taurus*, *Equus caballus*, *Canis familiaris*, *Gallus domesticus* за монолокусними ділянками ДНК. В результаті проведеної роботи встановлено, що: середня кількість виявлених алелів становила 12,1 від 10,8 у *Canis familiaris* до 14,8 *Equus caballus*, середня кількість виявлених генотипових варіантів (N_g) 38,09 від 22,4 (*Canis familiaris*) до 57,36 (*Equus caballus*) (табл. 48, 49). Кількість породоспецифічних алелів ($p < 0,001$) знаходилась в діапазоні від 3 (0,033) у собак до 46 (0,018) у коней, а найбільшу кількість породоспецифічних генотипів виявлено у коней (35,73) породи українська верхова (27,91). Для представників *Gallus domesticus* було встановлено найнижчі значення за такими показниками як: кількості виявлених (6,6) та ефективних (3,85) алелів, індекс Шеннона (1,42) та поліморфізму (0,644), фактичної (0,684) та очікуваної (0,624) гетерозиготностей, також для цього таксона було характерними найнижчі значення PE (0,39) та CPE (0,921).

Таблиця 48

Алельний поліморфізм різних видів свійських тварин

Вид	N_a	$N_{a_{unic}}$	Частота $N_{a_{unic}}$	Rarefaction (25)	
				N_a	$N_{a_{unic}}$
<i>Bos taurus</i>	11,3 (8–16)	23	0,031	$8,763 \pm 1,938$	$0,74 \pm 0,827$
<i>Equus caballus</i>	14,8 (12–16)	46	0,018	$10,154 \pm 2,691$	$1,149 \pm 1,453$
<i>Canis familiaris</i>	10,8 (9–13)	3	0,033	$8,393 \pm 2,35$	$0,344 \pm 0,581$
<i>Gallus domesticus</i>	11,6 (6–22)	17	0,022	$5,865 \pm 2,077$	$0,570 \pm 0,910$

Таблиця 49

Генотиповий поліморфізм різних видів свійських тварин

Вид	Ng	Ng ₁	Ng ₂	Ng _{unic}
<i>Bos taurus</i>	41,2	15,4	7,8	22,6
<i>Equus caballus</i>	57,36	21	9,81	35,73
<i>Canis familliaris</i>	22,4	5,4	4,2	7,2
<i>Gallus domesticus</i>	31,4	5,6	4,8	18,4
	38,09 ± 14,9675	11,85 ± 7,6809	6,65 ± 2,6289	20,98 ± 11,7849

Тварини всередині таксонів характеризувались незначним, але достовірним рівнем генетичної диференціації (Fst) (велика рогата худоба – 0,122, коні – 0,049, собаки – 0,047, курка – 0,143) (табл. 50), що підтверджувалось результатами аналізу молекулярної мінливості (AMOVA) – відносно низькі значення генетичної диференціації (Fst) між досліджуваними породами (велика рогата худоба – 0,058, коні – 0,089, собаки – 0,082 та курка – 0,228) ($p < 0,001$). На достатній рівень достовірності результатів вказує значущість різниці між частотами виявлених алельних ($p < 0,001$) та генотипових ($p < 0,001$) варіантів. В кожному таксоні був встановлений локус за яким значення потоку генів було вище за інші і саме за ним переважно і відбувається дрейф генів у ВРХ – ЕТН03 (23,4), у коней – НТГ07 (27,7), у собак – FHC2054 (12,3), у курей – ADL268 (4,2).

Таблиця 50

Індекси фіксації С. Райта

Вид	Fis	Fit	Fst
<i>Bos taurus</i>	0,033	0,092	0,122
<i>Equus caballus</i>	0,062	0,108	0,049
<i>Canis familliaris</i>	0,100	0,142	0,047
<i>Gallus domesticus</i>	0,131	0,257	0,143

Примітка: 95% CI – 95% довірчий інтервал

Встановлено значний рівень консолідації порід та видів, відхилення від стану генетичної рівноваги за Гарді-Вайнбергом (MCMC) спостерігали тільки: українська червоно-ряба молочна – за локусами BM1824, TGLA122 ($p < 0,001$), TGLA126 ($p < 0,01$) та ЕТН225 ($p < 0,05$); українська чорно-ряба молочна – за ЕТН225 та BM2113 ($p < 0,05$); сіра українська – за всіма локусами крім ЕТН225 з 10 досліджених локусів; гуцульська порода коней – за АТН04, НТГ07 ($p < 0,01$), НТГ06 та HMS07 ($p < 0,001$); чистокровна верхова – за 7 локусами крім НТГ06, НТГ07, VHL20 та HMS07; українська верхова – за локусами VHL20 та HMS07 з 11 локусів, німецький дог – за PEZ01, PEZ06, FHC2010 та FHC2054 та німецька вівчарка – за PEZ08 ($p < 0,001$) та FHC2010 ($p < 0,01$) з 5 локусів. Визначено дефіцит гетерозигот в середньому за видами та породами (для великої рогатої

худоби $F_{is} = 0,033$, $F_{it} = 0,092$; для коней $F_{is} = 0,062$, $F_{it} = 0,108$; для собак $F_{is} = 0,100$, $F_{it} = 0,142$).

Відносно новостворені породи (УЧер, УЧР великої рогатої худоби, УВП коней та собаки породи Німецька вівчарка) характеризувались більш високим рівнем генетичного поліморфізму у порівнянні з іншими, на що вказують наступні показники: ефективна кількість алелів (A_e) – 6,7/6,02/7,6/6,5, відповідно, середня кількість генотипів (N_g) – 24,0/22,3/47,91/18,4), рідкісних генотипів (N_{g1}) – 13,8/13,1/21,27/8,6; (N_{g2}) – 5,0/5,3/9,4/8, відповідно), породоспецифічних генотипів ($N_{g_{unik}}$) – 9/8,1/3,7 та 5,8, відповідно), індекс Шеннона (I) – 2,02/1,92/2,25/1,95. Для УЧер, УЧР порід великої рогатої худоби та УВП коней встановлено найвищі значення фактичної (H_o) – 0,784/0,821/0,812, очікуваної (H_e) – 0,844/0,819/0,865 та індивідуальної (H_i) – 0,784/0,821/0,784 гетерозиготності та індексу поліморфізму досліджених локусів (PIC) – 0,826/0,807/0,842, відповідно). Найбільш консолідованими і менш поліморфними, як за кількістю виявлених, так і за розмахом алельних спектрів були найдавніші за історією формування породи (ЧВ($p \leq 0,001$), НД($p < 0,05$), що може бути наслідком більш тривалого та спрямованого штучного добору. Для усіх досліджених видів розподіл частот виявлених алельних варіантів відповідав покроковій мутаційній моделі (SMM) (вона була більш адекватною для апроксимації рівня алельного різноманіття за всіма, без виключень, дослідженими мікросателітними локусами, в порівнянні з моделлю IAM ($p < 0,001$), яка значно завищувала фактичні величини, як по кожній породі, зокрема, так і по кожному з досліджених видів в цілому).

Застосування запропонованого нами підходу аналізу надає можливість оцінювання генетичної структури, ступеня консолідованості та генетичної диференціації досліджуваних популяцій, генеалогічних породних зв'язків та наслідків селекційних заходів, що підтверджується спільністю походження та наявністю ідентичних тенденцій у формуванні генетичної структури у тварин вітчизняної селекції.

Зрозуміло, що сама техніка аналізу геному, так само як і методи обробки даних розвиваються і вдосконалюються по шляху все більшої автоматизації експериментальної частини та ускладнення математичних алгоритмів. Тому, планування майбутніх досліджень в галузі молекулярних досліджень безпосередньо пов'язане з накопиченням інформації та обґрунтування вибору генів, які з найбільшою достовірністю відображають еволюцію формування ділянок геному різних видів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Poultry genetics, breeding, and biotechnology / ed. : W. M. Muir, S. E. Aggrey. Wallingford : CABI publishing, 2003. 744 p.
2. Fulton J. E. Molecular genetics in a modern poultry breeding organization. *World's poultry science journal*. 2008. Vol. 64. P. 171–176.
4. Duran C., Appleby N., Edwards D., Batley J. Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualization. *Current bioinformatics*. 2009. Vol. 4. P. 16–27.
5. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994. Vol. 20. P. 176–183.
6. Ye C., Yu Z., Kong F., Wu S., Wang B. R-ISSR as a new tool for genomic fingerprinting, mapping, and gene tagging. *Plant molecular biology reporter*. 2005. Vol. 23. P. 167–177.
7. Schlotterer C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion. *Nature reviews: genetics*. 2004. Vol. 5. P. 63–69.
8. Rajendrakumar P., Biswal A. K., Balachandra S. M., Srinivasarao K., Sundaram R. M. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics*. 2007. Vol. 23. P. 1–4.
9. Li Y., Korol A. B., Fahima T., Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 2004. Vol. 21 (6). P. 991–1007. DOI: 10.1093/molbev/msh073
10. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994. Vol. 20. P. 176–183.
11. Habza-Kowalska E., Grela M., Gryzińska M., Listos P. Molecular techniques for detecting food adulteration. *Medycyna Weterynaryjna*. 2019. Vol. 75 (7). P. 404–409.
12. Tanchev Sv. Conservation of genetic resources of autochthonous domestic livestock breeds in Bulgaria. A review. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2015. Vol. 21. P. 1262–1271.
13. Xi M., Sun L., Qiu, S., Liu J., Xu J., Shi J. In vitro mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Reports*. 2012. Vol. 31. P. 1043–1051. doi: 10.1007/s00299-011-1222-8.
14. Nahid A., Mohammadreza M. A., Amin B. ISSR markers for assessing dna polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iranian journal of biotechnology*. 2011. Vol. 9 (3). P. 222–229.
15. Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 2002. Vol. 128. P. 9–17. doi: 10.1023/A:1020691618797.
16. Li S., Jia J., Wei X., Zhang X., Li L., Chen H., Fan Y. D., Sun H., Zhao X., Lei T., Xu Y., Jiang F., Wang H. Li L. A intervarietal genetic map and QTL analysis

for yield traits in wheat. *Molecular Breeding*. 2007. Vol. 20. P. 167–178. doi: 10.1007/s11032-007-9080-3.

17. Vieira M. L., Santini L., Diniz A. L., Munhoz C. F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*. 2016. Vol. 39 (3). P. 312–328. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027

18. Powell W., Machray G. C., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*. 1996. Vol. 1. P. 215–222.

19. Orr H. T., Zoghbi H. Y. Trinucleotide repeat disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 2007. Vol. 30. P. 575–621.

20. Gymrek M., Golan D., Rosset S., Erlich Y. lobSTR: A short tandem repeat profiler for personal genomes. *Genome Research*. 2012. Vol. 22. P. 1154–1162.

21. Kashi Y., King D. G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics*. 2006. Vol. 22. P. 253–259.

22. Neff B. D., Gross M. R. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*. 2001. Vol. 55 (9). P. 1717–1733.

23. Pei J., Bao P., Chu M., Liang C., Ding X., Wang H., Wu X., Guo X., Yan P. Evaluation of 17 microsatellite markers for parentage testing and individual identification of domestic yak (*Bos grunniens*). *Peer J*. 2018. Vol. 6 (1). e5946. doi: 10.7717/peerj.5946

24. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 2004. Vol. 5 (6) P. 435–445.

25. Jin L., Macaubas C., Hallmayer J., Kimura A., Mignot E. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. Vol. 93. P. 15285–15288.

26. Selkoe K. A., Toonen R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 2006. Vol. 9 (5). P. 615–629.

27. Jakabová D., Trandžík J., Chrastina J., Hudecová L', Zetochová E., Bulla J., Bugarský A., Jakab F., Kozlík P. Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases in Thoroughbred horses in Slovakia. *Czech Journal of Animal Science*. 2002. Vol. 47. P. 497–501.

28. Tozaki T., Kako H., Mashima S., Hirota K., Hasegawa T., Ishida N., Miura N., Choi-Miura N.H., Tomita M. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2001. Vol. 63 (11). P. 1191–1197. doi: 10.1292/jvms.63.1191.

29. Vostrá Vydrová H., Vostrý L., Hofmanová B., Veselá Z., Schmidová J., Majzlík I. Population studies of Czech Hucul horses. *Poljo Privreda*. 2015. Vol. 21 (1). P. 41–43.

30. Khanshour A., Juras R., Blackburn R., Cothranet G. The legend of the Canadian horse: genetic diversity and breed origin. *Journal of Heredity*. 2015. Vol. 106 (1) P. 37–44. doi:10.1093/jhered/esu074.

31. Mackowski M., Mucha S., Cholewinski G., Cieslak J. Genetic diversity in Hucul and Polish primitive horse breeds. *Archives Animal Breeding*. 2015. Vol. 58 (1). P. 23–31. doi: 10.5194/aab-58-23-2015.

32. Kusza S., Priskin K., Ivankovic A., Jedrzejewska B., Podgorski T., Javor A., Mihok S. Genetic characterization and population bottleneck in the Hucul horse based on microsatellite and mitochondrial data. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2013. Vol. 109. P. 54–65. doi: 10.1111/bij.12023.
33. Dimsoski P. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. *Croatian Medical Journal*. 2003. Vol. 44 (3). P. 332–335.
34. Cho G. J. Genetic relationship and characteristics using microsatellite DNA loci in horse breeds. *Journal Life Science*. 2007. Vol. 17. P. 699–705.
35. van de Goor L. H. P., van Haeringen W. A. and Lenstra J. A. Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis. *Animal Genetics*. 2011. Vol. 42. P. 627–633. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x.
36. Nedup D., Monchai D., Yupin P. Genetic characterization of Bhutanese native chickens based on an analysis of Red Junglefowl (*Gallus gallus gallus* and *Gallus gallus spadecius*), domestic Southeast Asian and commercial chicken lines (*Gallus gallus domesticus*). *Genetics and Molecular Biology*. 2012. Vol. 35 (3). P. 603–609. doi: 10.1590/S1415-47572012005000039.
37. Romanov M. N., Weigend S. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and Jungle fowl using microsatellite markers. *Poultry Science*. 2001. Vol. 80. P. 1057–1063.
38. Mahammi F., Gaouar S., LaloË D., Faugeras R., Tabet-Aoul N., Rognon X., Tixier-Boichard M., Saidi-Mehtar N. A molecular analysis of the patterns of genetic diversity in local chickens from western Algeria in comparison with commercial lines and wild jungle fowls. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2016. Vol. 33. P. 59–70.
39. Hariyono D. N. H., Maharani D., Cho S., Manjula P., Seo D., Choi N., Sidadolog J. H. P., Lee J. H. Genetic diversity and phylogenetic relationship analyzed by microsatellite markers in eight Indonesian local duck populations. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2019. Vol. 32. P. 31–37.
40. Huo J. L., Wu G. S., Chen T., Huo H. L., Yuan F., Liu L. X., Ge C. R., Miao Y. W. Genetic diversity of local Yunnan chicken breeds and their relationships with Red Junglefowl. *Genetics and molecular research*. 2014. Vol. 13 (2). P. 3371–3383. doi: 10.4238/2014.April.29.16.
41. Crittenden L. B., Provencher L., Levin I., Abplanalp H., Briles R. W. Characterization of a Red Jungle Fowl by White Leghorn back crossreference population for molecular mapping of the chicken genome. *Poultry Science*. 1993. Vol. 72. P. 334–348.
42. Hillel J., Groenen M. A. M., Tixier-Boichard M., Korol A. B., David L., Kirzhner V. M. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection Evolution*. 2003. Vol. 35. P. 533–557.
43. Carvalho D. A., Martínez A. M., Carolino I., Barros M. C., Vallejo M. E. C., Santos-Silva F., de Oliveira Almeida M. J., Carolino N., Delgado Bermejo Bermejo J. V., Sarmiento J. L. R. Diversity and Genetic Relationship of Free-Range

Chickens from the Northeast Region of Brazil. *Animals. Open Access Journal From MDPI*. 2020. Vol. 10 (10). P. 1857. doi: 10.3390/ani10101857.

44. Agatep R. C., Lambio A. L., Vega R. S. A., Capitan S. S., Mendiore M. S., Yebron M. G. N. Microsatellite-based genetic diversity and relationship analyses of three genetic groups of domesticated Mallard ducks (*Anas Platyrhynchos Domesticus* L). *Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2016. Vol. 42 (2). P. 102–111.

45. Savolainen P., Zhang Y. P., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*. 2002. Vol. 298. P. 1610–1613.

46. Yilmaz O. Controversies of Origin of Domestic Dog-III-References of Modern Dogs until 2006. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 2017. Vol. 4 (11). P. 484-490.

47. Ye J.-H., Ren D., Xie A.-F., Wu X.-P., Xu L., Fu P.-F., Zhao H.-A., Yang Q.-Y. Microsatellite-based Genetic Diversity and Evolutionary Relationships of Six Dog Breeds. *Psychology Faculty Publications*. 2009. Vol. 22 (8). P. 112–1106.

48. Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001. Vol. 4. P. 1-9.

49. Dieringer D. Schlötterer C. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*. 2003. Vol. 3. P. 167-169. 10.1046/j.1471-8286.2003.00351.x

50. Peakall R., Smouse P.E. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. P. 2537-2539.

51. Raymond M., Rousset F. GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995. Vol. 86. P. 248-249.

52. Weir B. S., Cockerham C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 1984. Vol. 38. P. 1358-1370.

53. Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate Fstatistics. *Journal of Heredity*. 1995. Vol. 86. P. 485-486.

54. Do C., Waples R. S., Peel D., Macbeth G. M., Tillett B. J., Ovenden J. R. NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*. 2014. Vol. 14. P. 209-214.

55. Nei M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 1972. Vol. 106. P. 283-392.

56. Garza J. C., Williamson E. G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*. 2001. Vol. 10. P. 305-318.

57. Шебаніна О. В., Крамаренко С. С., Ганганов В. М. Практикум з біометрії: Методи непараметричної статистики. Миколаїв : МДАУ, 2008. 166 с.

58. Крамаренко С. С., Луговий С. І., Лихач А. В., Крамаренко О. С. Аналіз біометричних даних у розведенні та селекції тварин : навч. посіб. Миколаїв : МНАУ, 2019. 211 с.

59. Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T. PopGene. Microsoft Windows based freeware for population genetic analysis: Quick User Guide. University of Alberta. 1999. 28 p.

60. Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*. 1984. Vol. 11. P. 265-270.

61. Kalinowski S. T. HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes*. 2005. Vol. 5. P. 187-189.

62. Ohta T., Kimura M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research*. 1973. Vol. 22. P. 201-204.

63. Piry S., Luikart G., Cornuet J. M. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*. 1999. Vol. 90. P. 502-503.

Основна інформація про програмне забезпечення

1. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного пакету *Statistica 6.0* та *Exel (Microsoft Office 2007)*. Статистичний обробіток даних проводили в стандартному пакеті *Microsoft Excel* із використанням інтегрованої надбудови програми *Statisti XL 2.0* (<http://www.statistixl.com/>).

2. Microsatellite analyzer (MSA) 4.05 <https://mybiosoftware.com/msa-4-05-microsatellite-analyzer.html> - програма розрахунку теоретичної кількості алелів для різних мікросателітних локусів.

3. GenAlEx 6.51b2 <https://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html>

4. Popgene for Windows https://download.cnet.com/popgene/3000-2054_4-75328340.html - програми розрахунку оцінки стану генетичної рівноваги за кожним локусом PAv3.17 / Palaeontological Statistics.

5. PAST <https://rsload.net/soft/cam/19204-past.html> - програма розрахунку ступеня відмінності між тваринами різних груп за частотами алелів 12 мікросателітних локусів (критерію Хі-квадрат (χ^2) К. Пірсона).

6. FSTAT <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> - індекс фіксації або F-статистики С.Райта - програма розрахунку ступеня генетичної диференціації для кожного локусу мікросателітів окремо, так і для всіх локусів в цілому.

7. NeEstimator <https://www.molecularfisherieslaboratory.com.au/neestimator-software> - програма розрахунку оцінки ефективної кількості алелів.

ДЛЯ НОТАТОК

НАУКОВО-ПРАКТИЧНЕ ВИДАННЯ

Кирило Вячеславович КОПИЛОВ

Любов Теофілівна СТАРОДУБ

Андрій Володимирович ШЕЛЬОВ

Наталія Борисівна МОХНАЧОВА

Юрій Іванович ЛЕСНЯК

Марія Леонідівна ДОБРЯНСЬКА

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ З ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОЦІНКИ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ І МІКРОЕВОЛЮЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА МОНОЛОКУСНИМИ ТА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ ДІЛЯНКАМИ ДНК У РІЗНИХ ВИДІВ СВІЙСЬКИХ ТВАРИН

Комп'ютерна верстка та макетування Н. В. Швець

Підписано до друку 14.11.25 р.
Формат 60 x 84 ¹/₁₆. Папір офсетний.
Гарнітура Times New Roman.
Ум. друк. 3,8 арк. Наклад 100 прим.

Видання та друк – Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН,
08321, Київська обл., Бориспільський район, с. Чубинське, вул. Погребняка, 1.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 7292 від 25.03.2021 р.