

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

СТАРОДУБ ЛЮБОВ ФЕОФІЛІВНА

УДК 636.2.033 /.034:575

**ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ АБОРИГЕННИХ ПОРІД  
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ТА КОНЕЙ  
ЗА РІЗНИМИ ТИПАМИ МАРКЕРІВ**

03.00.15 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора сільськогосподарських наук

с. Чубинське Київської області-2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Інституті розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця  
Національної академії аграрних наук України

**Науковий  
консультант:**

доктор сільськогосподарських наук, професор  
**Копилов Кирило Вячеславович,**  
Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця  
Національної академії аграрних наук України,  
головний науковий співробітник відділу генетики та  
біотехнології

**Офіційні опоненти:**

доктор сільськогосподарських наук, професор  
**Димань Тетяна Миколаївна,**  
Білоцерківський національний аграрний університет  
Міністерства освіти і науки України,  
проректор з освітньої, виховної та міжнародної діяльності

доктор сільськогосподарських наук, старший науковий  
співробітник, **Кулібаба Роман Олександрович,**  
Національний університет біоресурсів і  
природокористування України, професор кафедри біології  
тварин

доктор сільськогосподарських наук, старший науковий  
співробітник, **Балацький Віктор Миколайович,**  
Інститут свинарства і агропромислового виробництва  
Національної академії аграрних наук України,  
завідувач лабораторії генетики

Захист відбудеться 30 вересня 2021 року о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 27.355.01 Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН за адресою: вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН за адресою: вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321.

Автореферат розіслано 26 серпня 2021 року

В.о. ученого секретаря  
спеціалізованої вченої ради

В.П.Хвостик

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Збереження породного різноманіття одомашнених видів є важливим для забезпечення сталого розвитку сільського господарства, розв'язання глобальних проблем продовольчої безпеки, розвитку нових ринків, зменшення екологічних проблем, є захистом від невідомих на сьогодні селекційних, природних та інших ризиків (FAO, 2007). У процесі розвитку нових технологій виробництва продукції тваринництва велика увага приділяється породам сільськогосподарських тварин, які найбільш відповідають їх вимогам. Таким чином, існує небезпека втрати генетичного різноманіття, притаманного тваринам аборигенних порід з їх широким спектром генотипів, адаптованих до різних умов проживання. Ці тварини можуть стати селекційним матеріалом, необхідним для створення нових порід і удосконалення існуючих. Тому нині особливо гостро постає питання збереження генофонду локальних порід сільськогосподарських тварин, що за рівнем продуктивності поступаються перед сучасними породами, але в їхньому генотипі є цінні алелі, які сучасні породи поступово втрачають (Буркат В.П., Подоба Б.Є., Гузєв І.В., 2006). На жаль нині поза увагою науковців та практиків-селекціонерів залишається генетичний потенціал тварин аборигенних порід – носіїв рідкісних алелів, що еліміновані внаслідок створення нових порід. Видоспецифічність та породоспецифічність їх мінливості під впливом факторів різної природи (історії створення і розведення, паратипових факторів) до цього часу досліджено недостатньо (Глазко Т.Т., 2010; Коновалов В.С., 2010; Костенко С.О., 2017).

Нині в Україні відсутні цілісні науково-методичні підходи до системи аналізу впливу різних факторів на формування генетичної структури аборигенних порід свійських тварин із застосуванням молекулярно-генетичних та цитогенетичних методів. Для збереження та розведення локальних порід сільськогосподарських тварин необхідні знання про структуру їх генофонду, ефективні методи оцінювання генетичного різноманіття і диференціації. Одним із найбільш ефективних і перспективних підходів, який успішно застосовують в практичній роботі генетичних лабораторій у всьому світі є аналіз поліморфізму ДНК з використанням мультилокусних міжмікросателітних маркерів. Застосування мультилокусного міжмікросателітного аналізу ДНК є інформаційним для проведення популяційно-генетичних досліджень, встановлення філогенетичних зв'язків сучасних порід з їх давніми предками. Для з'ясування наявності дії факторів мутагенного впливу на організм, адаптацію тварин до певних умов середовища та виявлення темпів соматичного мутагенезу використовують показники цитогенетичної мінливості. (Костенко С.О., 2017). Такі дослідження мають теоретичне та практичне значення.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота виконана у відповідності програм 24.01.01.01.Ф«Розробити методологію оцінки генотипу тварин різних за напрямком продуктивності порід великої рогатої худоби за генами кількісних ознак» (ДР № 0111U003282) впродовж 2011-2015 років та 37.00.01.01. Ф«Дослідження генетичної структури аборигенних, локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин України для визначення молекулярно-генетичних маркерів продуктивності та адаптації» (ДР №

0116U000524) впродовж 2016-2020 років відділу генетики та біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН.

**Мета і завдання досліджень.** Мета роботи – теоретично обґрунтувати та оптимізувати методичні підходи комплексного застосування молекулярно-генетичного і цитогенетичного методів у системі аналізу впливу різних факторів на формування генетичної структури популяцій аборигенних порід свійських тварин.

Для досягнення цієї мети було поставлено такі завдання:

- дослідити каріотип аборигенних та малочисельних порід (сірої української, червоної польської, білоголової української, бурої карпатської) великої рогатої худоби;
- провести порівняльне оцінювання параметрів генетичної мінливості каріотипу аборигенних порід великої рогатої худоби та тварин комерційних порід (українська чорно-ряба молочна та українська червоно-ряба молочна);
- визначити вплив токсинів (сірководню у воді) на цитогенетичні показники соматичного мутагенезу великої рогатої худоби;
- дослідити спонтанну мінливість каріотипу аборигенних та малочисельних порід коней (гуцульської та коника польського);
- провести ретроспективний аналіз архівних матеріалів, з вивчення історії формування аборигенних порід коней та результатів палеонтологічних досліджень щодо поширення плейстоцен-голоценових коней на території України;
- провести дослідження генетичної структури різних популяцій аборигенних порід коней (гуцульської, коника польського та арабської порід) за полілокусними ISSR маркерами;
- оптимізувати методику виділення ДНК з викопних решток кісток плейстоценового коня, тарпана та давнього свійського коня;
- встановити філогенетичні зв'язки між сучасними кінями та древніми еквідами за ISSR- PCR маркерами.

*Об'єкт дослідження*—генетична мінливість генофонду популяцій аборигенних порід свійських тварин

*Предмет дослідження*—параметри мінливості за цитогенетичними і молекулярно-генетичними маркерами, цитогенетичні показники спонтанного соматичного мутагенезу аборигенних порід свійських тварин.

*Методи дослідження:* цитогенетичні (одержання та аналіз метафазних пластинок клітин периферійної крові сільськогосподарських тварин, визначення частки в проміле лімфоцитів з мікроядром, двоядерних лімфоцитів, мітотичного індексу); молекулярно-генетичні (виділення ДНК, проведення ампліфікації дослідних фрагментів, проведення горизонтального електрофорезу); популяційно-генетичні (визначення індексу поліморфності локусу, частки поліморфних локусів, кількість поліморфних локусів, середнє число морф/алелів, частку рідкісних морф/алелів, індекс Шенона-Вінера, критерії Пірсона, розрахунок генетичних дистанцій за Nei); метод домінантних летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* (використовується під час тестування мутагенності природних середовищ: води та ґрунту); статистичні (біометрична обробка даних досліджень).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше здійснено порівняльний аналіз параметрів спонтанної цитогенетичної мінливості аборигенних та малочисельних порід великої рогатої худоби, зокрема: сірої української, білоголової української, червоної польської, бурої карпатської з тваринами комерційних порід (українська чорно-ряба молочна, українська червоно-ряба молочна) та помісних тварин.

Вперше в Україні застосовано тест «Спосіб визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster*» для встановлення причин підвищеної мінливості у соматичних клітинах великої рогатої худоби.

Оптимізовано методику виділення ДНК із викопних решток кісток коней, що дає змогу ефективно проводити типування тварин за полілокусними ДНК-маркерами.

Вперше в Україні здійснено виділення ДНК з викопних кісток плейстоценових коней, справжнього тарпана та давнього свійського коня для встановлення зв'язку між сучасними і давніми еквідами з використанням ISSR-маркерів.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати досліджень із порівняльного аналізу спонтанної цитогенетичної мінливості аборигенних та комерційних порід великої рогатої худоби різних напрямів продуктивності можна використовувати як додатковий критерій для добору тварин з низьким рівнем соматичного мутагенезу з метою збереження переваг, які мають тварини локальних та аборигенних порід. З урахуванням отриманих експериментальних даних розроблено методичні рекомендації «Методика з проведення молекулярно-генетичних досліджень аборигенних та малочисельних порід сільськогосподарських тварин», «Визначення адаптаційної здатності племінних ресурсів молочної худоби та молекулярно-генетичні методи у системі збереження біологічного різноманіття»

Проведено оптимізацію методу виділення ДНК із викопних решток древніх коней, що дає можливість встановлювати зв'язок між сучасними і давніми еквідами за допомогою ISSR-PCR методу. За допомогою ISSR-фінгерпринтингу одержані дані, що дають змогу характеризувати особливості кожної дослідженої породи коней та доповнюють інформаційну базу даних геному. Проведено ретроспективний аналіз архівних матеріалів з питань вивчення історії розведення та збереження гуцульських коней на українських землях у господарствах гуцулів.

Отримані результати дисертаційної роботи впроваджено у Яворівському національному природному парку та національному природному парку «Гуцульщина». Матеріали наукових досліджень використовуються у навчальному процесі Національного університету біоресурсів і природокористування України у рамках дисциплін «Генетика кількісних і якісних ознак тварин» при підготовці фахівців освітнього ступеня «Бакалавр» та «Магістр» за спеціальністю «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва», яка викладається на кафедрі генетики, розведення та біотехнології тварин факультету «Тваринництва та водних біоресурсів».

Тест «Спосіб визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster*», можна рекомендувати для виявлення мутагенності природних

середовищ (води і ґрунту), хімічних речовин та як тест на канцерогени, що впливають на організм сільськогосподарських тварин.

**Особистий внесок здобувача.** Автором сформульовано тему і мету роботи, визначено основні напрями та методи досліджень, опрацьовано та проаналізовано опубліковані за темою дисертації наукові праці вітчизняних та зарубіжних вчених. Дисертантом особисто здійснено всі заплановані лабораторні дослідження: культивування лімфоцитів крові, аналіз цитогенетичних препаратів, інтерпретація одержаних результатів, статистична обробка отриманих даних, сформульовано висновки та пропозиції виробництву. Обсяг матеріалів спільних досліджень, використаних у роботі, погоджено із співавторами публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Основний зміст дисертаційної роботи викладено в доповідях на Міжнародній науковій конференції «Соматический мутагенез сельскохозяйственных животных в разных радиоэкологических условиях содержания. Малые дозы» присвяч. 25-річчю Інституту радіобіології. Гомель, 26-28 вересня 2012 р.; Круглому столі «Клітинні технології у ветеринарній медицині. Сьогодення та перспективи.» НУБіП кафедра фізіології, патфізіології та імунології тварин, травень 2016 р.; виступі на Вченій раді Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН «Наукові засади запровадження генетичного аналізу при вивченні еволюції коника польського та гуцульського коня», вересень 2019 р.; Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні методи селекції у тваринництві» присвяч. 110-річчю з дня народж. М.А. Кравченка. 16-18 жовтня 2019 р., м. Київ: Національний університет біоресурсів і природокористування України; Міжнародній науково-практичній он-лайн конференції «Наука про годівлю в інтелектуальному просторі сучасності», присвячена 90-річчю від дня народження академіка УААН Григорія Олександровича Богданова (1930–2009). Інститут тваринництва НААН, м. Харків. 26 листопада 2020 р.; Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання використання та збереження природних ресурсів прикордонних територій України і Польщі» (50-річчю з часу створення Західного наукового центру присвячується) 11 травня 2021 р. Львів.

**Публікації.** За темою дисертаційної роботи опубліковано 24 наукові праці у наукових журналах, збірниках, матеріалах і тезах конференцій, із них 15–опубліковано у наукових фахових виданнях України, 5–у виданнях іноземних держав, 3 з яких у виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз, 2 методичні рекомендації, 2 – наукові праці апробаційного характеру у збірниках наукових конференцій.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається з анотацій, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаної літератури і додатків. Загальний об'єм дисертаційної роботи – 380 сторінок комп'ютерного тексту, містить 47 таблиць і 59 рисунків. Список використаної літератури включає 450 джерел, з яких 220 іноземних авторів.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження за темою дисертаційної роботи виконано в Інституті розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН. Обсяг проведених досліджень відображений у табл. 1, загальна схема досліджень представлена на рисунку 1.

Таблиця 1

### Перелік господарств і порід тварин, у яких проведено цитогенетичне та молекулярно-генетичне тестування

|           | Вид тварини                                                                               | Досліджено                 |                         |                         |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
|           |                                                                                           | Порода                     | Кількість тварин (гол.) | Метафазних пластинок, п |
| <b>1</b>  | <b>ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова»</b>                                                         |                            |                         |                         |
|           | Велика рогата худоба                                                                      | Сіра українська            | 30                      | 3000                    |
| <b>2</b>  | <b>ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК НААН</b>                                                      |                            |                         |                         |
|           | Велика рогата худоба                                                                      | Сіра українська            | 30                      | 3000                    |
| <b>3</b>  | <b>ПрАТ «Мшанецьке» Тербовлянський район Тернопільської області</b>                       |                            |                         |                         |
|           | Велика рогата худоба                                                                      | Червона польська (помісні) | 30 (30)                 | 6000                    |
|           |                                                                                           | Українська червоно-ряба    | 30                      | 3000                    |
|           |                                                                                           | молочна                    |                         |                         |
| <b>4</b>  | <b>ТОВ «Подільський господар» с.м.т. Антоніні Хмельницької обл.</b>                       |                            |                         |                         |
|           | Велика рогата худоба                                                                      | Білоголова українська      | 40                      | 4000                    |
|           |                                                                                           | Українська чорно-ряба      | 20                      | 2000                    |
|           |                                                                                           | молочна                    |                         |                         |
| <b>5</b>  | <b>Приватний сектор, с. Нижні ворота, Воловецького р-ну Закарпатської області</b>         |                            |                         |                         |
|           | Велика рогата худоба                                                                      | Бура карпатська            | 15                      | 1500                    |
|           |                                                                                           | Помісні тварини            | 15                      | 1500                    |
| <b>6</b>  | <b>ТЗОВ «Край неба» с. Лісна Слобідка Коломийського р-ну Івано-Франківської області</b>   |                            |                         |                         |
|           | Коні                                                                                      | Гуцульська порода          | 20                      | 2000                    |
| <b>7</b>  | <b>Національний природний парк «Гуцульщина»</b>                                           |                            |                         |                         |
|           | Коні                                                                                      | Гуцульська порода          | 20                      | 2000                    |
| <b>8</b>  | <b>Яворівський національний природний парк</b>                                            |                            |                         |                         |
|           | Коні                                                                                      | Коник-польський            | 10                      | 1000                    |
| <b>9</b>  | <b>Ягільницький кінний завод</b>                                                          |                            |                         |                         |
|           | Коні                                                                                      | Арабська                   | 10                      | -                       |
| <b>9</b>  | <b>Київський національний науково-природничий музей НАН України, відділ палеонтології</b> |                            |                         |                         |
|           | Викопна кістка коня                                                                       | Плейстоценовий кінь        | 2 кістки                | -                       |
|           |                                                                                           | Кінь тарпан                | 2 кістки                | -                       |
| <b>10</b> | <b>Львівський історичний музей, відділ палеонтології</b>                                  |                            |                         |                         |
|           | Викопна кістка коня                                                                       | Давній свійський кінь      | 2 кістки                | -                       |
|           | <b>Всього</b>                                                                             |                            | <b>250 гол.</b>         | <b>29000</b>            |

Забір біологічного матеріалу для цитогенетичних досліджень помісних корів породи червона польська проводили у 2012 році. На той час у господарстві проявлялись випадки захворювання на туберкульоз. Із 30 голів тварин, кров яких

було відібрано для цитогенетичного тестування 20% корів (6 гол.) було інфіковано збудником туберкульозу. Упродовж 15 днів ці тварини підлягали обов'язковій утилізації. У 2017 році здійснювався повторний забір крові у помісних корів червоної польської породи та української червоно-рябої молочної породи для цитогенетичних досліджень. На цей час господарство ПрАТ «Мшанецьке» було благополучне стосовно захворювання на туберкульоз.

За даними Теребовлянської державної адміністрації Тернопільської обл. надра району містять значні ресурси мінеральних вод. Найбільш збагачені сірководнем води у с. Мшанець, яку використовують для потреб господарства. Паратиповий чинник (сірководень у воді), може призвести до підвищення рівня двоядерних лімфоцитів. Тому для дослідження впливу води на організм тварин червоної польської та української червоно-рябої молочної порід цього самого господарства було проведено тест «Спосіб визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster*». Мутагенний ефект оцінювали за індукцією домінантних летальних мутацій (ДЛМ) на постембріональній стадії розвитку дрозофіли – на стадії лялечки.

Для проведення цитогенетичного аналізу корів білоголової української породи господарства ТОВ «Подільський господар»–тварин розділили на дві групи: селекційне ядро (СЯ) та виробнича група (ВГ) по 20 голів.

Для цитогенетичного дослідження корів бурої карпатської породи їх розділили на дві групи: чистопородні тварини бурої карпатської породи та помісні тварини. До помісей належали тварини, одержані від схрещування  $\frac{1}{2}$  бура карпатська x  $\frac{1}{2}$  пінцгау ( $\frac{1}{2}$  БК x  $\frac{1}{2}$  ПЦ);  $\frac{1}{2}$  бура карпатська x  $\frac{1}{2}$  голштинська ( $\frac{1}{2}$  БК x  $\frac{1}{2}$  Г);  $\frac{1}{2}$  бура карпатська x  $\frac{1}{2}$  симентальська ( $\frac{1}{2}$  БК x  $\frac{1}{2}$  С);  $\frac{1}{2}$  бура карпатська x  $\frac{1}{2}$  українська чорно-ряба молочна ( $\frac{1}{2}$  БК x  $\frac{1}{2}$  УЧРМ);  $\frac{1}{2}$  бура карпатська x  $\frac{3}{12}$  пінцгау x  $\frac{3}{12}$  українська чорно-ряба молочна ( $\frac{1}{2}$  БК x  $\frac{3}{12}$  ПЦ x  $\frac{3}{12}$  УЧРМ).

Каріотипову мінливість тварин сірої української породи вивчали у двох господарствах: ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» та ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК НААН. Співвідносність віку і хромосомної нестабільності було здійснено під час цитогенетичного тестування корів сірої української породи господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» віком 2–2,5 роки та телиць 9–16 місяців.

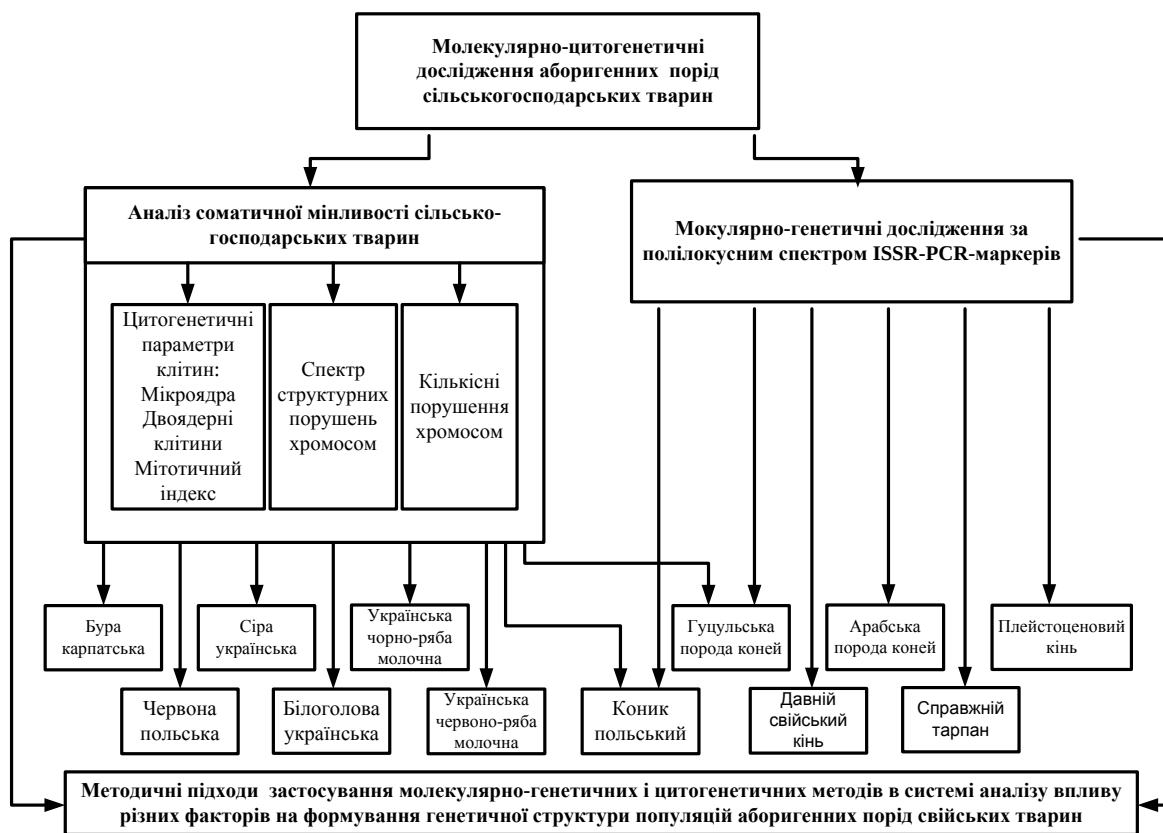
Методика одержання цитогенетичних препаратів із лімфоцитів периферійної крові передбачала наступну послідовність етапів: забір крові, її транспортування, постановка культури, одержання цитогенетичних препаратів, аналіз метафазних пластинок. В усіх дослідженнях, як параметри хромосомної нестабільності, визначали кількісні порушення хромосом (відсоток анеуплоїдних, поліплоїдних, гаплоїдних, клітин із асинхронним розщепленням центромірних районів хромосом (АРЦРХ) від 100 проаналізованих), структурні порушення хромосом (відсоток клітин із парними і поодинокими фрагментами, з розривами хромосом і хроматид від 100 проаналізованих).

Мікроядерне тестування проводили на цих самих препаратах, підраховуючи двоядерні лімфоцити (ДЯ), одноклітинні лімфоцити з мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ). Аналізували 3000 клітин на кожну тварину.



Виділення ДНК із крові проводили із використанням стандартного комерційного набору «ДНК-сорб В» виробництва компанії «АмпліСенс» (РФ) відповідно до модифікованого протоколу.

Для отримання продуктів ампліфікації ДНК, фланкованих інвертованими повторами мікросателітів, використовували праймери (GA)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>8</sub>CA, (AG)<sub>8</sub>CG (GA)<sub>6</sub>CC, (ACC)<sub>6</sub>G, (GAG)<sub>6</sub>C та (CTC)<sub>6</sub>C. Електрофоретичне розділення ампліфікованих ділянок ДНК проводили у 2% агарозному гелі у тріс-боратному буфері, з наступним фарбуванням у бромистому етидії. Розміри отриманих продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркера молекулярних мас [Thermo Scientific™ Gene Ruler 1 kb Plus DNALadder, ready-to-use-75-20000 bp](#). Детекцію результатів проводили фотографуванням гелів цифровою камерою на транслюмінаторі в УФ-світлі.



**Рис.1. Загальна схема досліджень**

Статистичну обробку даних здійснювали за використання стандартних комп'ютерних програм (пакет STATISTICA 7) та за допомогою комп'ютерної програми MicrosoftExcel 2013. Статистичну значущість різниці середніх величин ( $t_d$ ) здійснювали за критеріями Ст'юдента, силу впливу ( $\eta^2$ ) породи, віку, паратипового чинника (збудника туберкульозу) на хромосомну мінливість великої рогатої худоби встановлювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу. Статистичну значущість сили впливу (F) визначали за критеріями Фішера. Розрахунки показників внутрішньопопуляційного різноманіття – середнє число морф/алелей ( $\mu$ ) і частка

рідкісних морф/алелей ( $h_{\mu}$ ) та їх статистичних похибок проводили з використанням пакета програм Microsoft Excel.

Побудова дендрограм генетичних відстаней між кіньми різних видів та порід із використанням методу М. Нея, здійснено з використанням програми TreeView X.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ АБОРИГЕННИХ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

**Каріотипова мінливість корів білоголової української породи.** Дослідження каріотипу корів білоголової української породи показали, що кількісні порушення хромосом, зокрема анеуплоїдія, та структурні порушення хромосом (хромосомні розриви) у тварин двох груп (селекційне ядро та виробнича група) не перевищували спонтанний рівень цієї мінливості, характерний для великої рогатої худоби (табл.2).

Таблиця 2

#### Мінливість каріотипу корів білоголової української породи, %

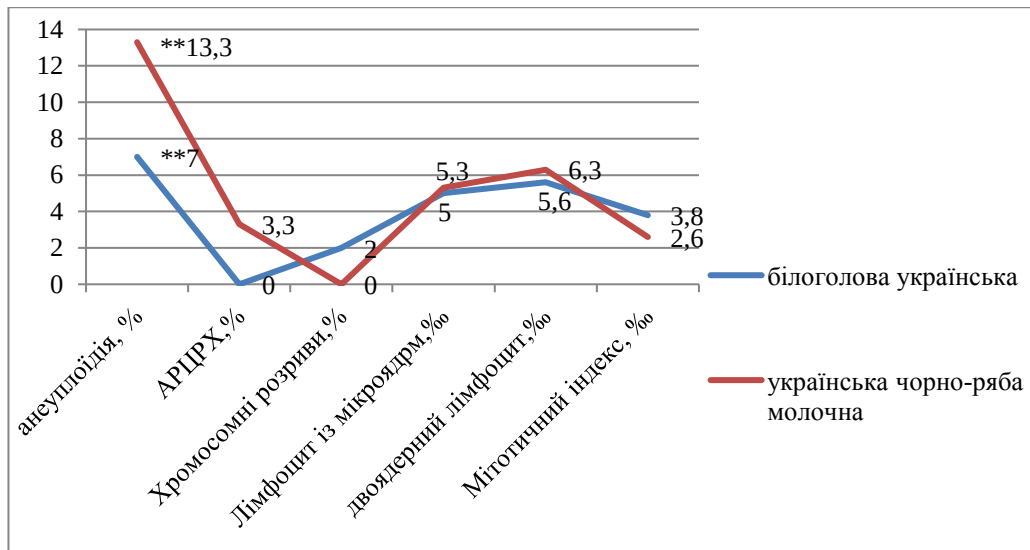
| Група тварин    | Кількість тварин (n), гол. | Анеуплоїдія | АРЦРХ    | Хромосомні розриви |
|-----------------|----------------------------|-------------|----------|--------------------|
| Селекційне ядро | 20                         | 6,0±3,64    | 2,0±1,81 | 2,3±1,95           |
| Виробнича група | 20                         | 7,0±5,77    | —        | 2,0±1,99           |
| M±m             |                            | 6,5±0,49    | 1,0±0,71 | 2,2±0,14           |

Каріотипові порушення у корів двох груп не мали істотних розбіжностей. Це підтверджує, що формування в замкнених популяціях здійснювалося за рандомізованою вибіркою.

Для порівняльного оцінювання проведено аналіз мінливості каріотипу групи корів української чорно-рябої молочної породи цього господарства. Тварини, з яких було сформовано 2 групи, були одного віку (3-ої і вище лактацій), за призначенням знаходились у виробничій групі та перебували в однакових умовах утримання (рис.2).

Частота метафазних пластинок із анеуплоїдією у корів білоголової української породи становила 7,0%, а в української чорно-рябої молочної – 13,3%. Різниця середніх величин за цією ознакою виявилася статистично значущою ( $p < 0,01$ ).

Частота клітин із анеуплоїдією у корів української чорно-рябої молочної породи вища за спонтанний рівень цієї мінливості.



**Рис. 2. Каріотипова мінливість корів білоголової української та української чорно-рябої молочної порід господарства ТОВ «Подільський господар»**

**Каріотипова мінливість корів червоної польської породи.** Дослідження стабільності каріотипу корів червоної польської породи господарства ПрАТ «Мшанецьке», здійснено порівняльним аналізом цитогенетичної мінливості корів української червоно-рябої молочної породи (30 гол.) цього самого господарства (табл.3).

Таблиця 3

**Аналіз каріотипу корів червоної польської та української червоно-рябої молочної порід, %**

| Порода                          | Кількість тварин | Анеуплоїдія   | Хромосомні розриви |
|---------------------------------|------------------|---------------|--------------------|
| Червона польська                | 30               | $8,2 \pm 0,7$ | $5,1 \pm 0,4$      |
| Українська червоно-ряба молочна | 30               | $6,1 \pm 0,3$ | $3,0 \pm 0,1$      |

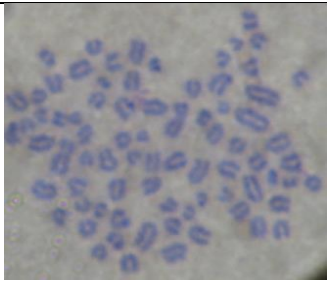
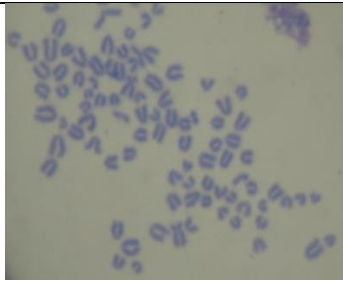
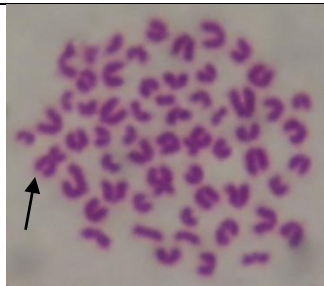
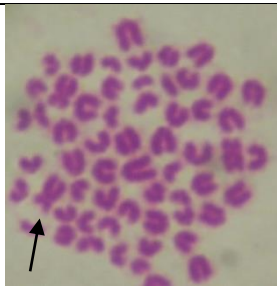
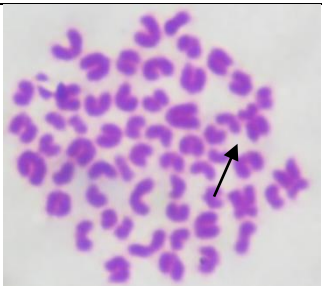
Породної особливості каріотипу корів червоної польської та української червоно-рябої молочної породи за кількісними та структурними порушеннями хромосом виявлено не було.

**Каріотипова мінливість корів бурої карпатської породи.** Порівняльний аналіз каріотипової мінливості корів двох груп показав, що частота анеуплоїдії у помісних тварин була вдвічі вищою порівняно з чистопородними тваринами. Різниця середніх величин за цією ознакою виявилася значущою ( $p < 0,01$ ). Частота структурних порушень хромосом менше одного відсотка або їх відсутність у помісних тварин свідчить про низький ступінь соматичного мутагенезу (табл.4).

**Мінливість каріотипу чистопородних і помісних корів, %, ( $M \pm m$ )**

| Порода          | Кількість тварин (n) | Анеуплоїдія         | Поліплоїдія | Хромосомні розриви |
|-----------------|----------------------|---------------------|-------------|--------------------|
| Бура карпатська | 15                   | $1,6 \pm 1,01^{**}$ | —           | $0,76 \pm 0,37$    |
| Помісні тварини | 15                   | $3,3 \pm 1,88^{**}$ | —           | —                  |

**Каріотипова мінливість тварин сірої української породи (рис. 3).**

|                                                                                     |                                                                                     |                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|   |   |   |
| а) Каріотип в нормі, $2n=60$                                                        | а) Анеуплоїдія, $2n=58$                                                             | а) Хромосомний розрив                                                                 |
|  |  |  |
| б) Каріотип в нормі, $2n=60$                                                        | б) АРЦРХ-Х хромосоми                                                                | б) Поліплоїдія $4n=120$                                                               |
|  |  |  |
| б) Робертсонівська транслокація 1;29                                                |                                                                                     |                                                                                       |

**Рис.3. Каріотипова мінливість корів сірої української породи:**

а) – господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова»; б) – господарства ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК НААН

Статистично значущих відмінностей у спонтанному рівні кількісних (анеуплоїдія 1,2–7,2%), АРЦРХ– 0,6–1,8%, та структурних порушень (хромосомні розриви 1,5-2,6%) хромосом у корів сірої української породи господарств ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» та ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК НААН» виявлено не було. Встановлено концентрацію кратного збільшення числа хромосом (поліплоїдія – 0,9%) та частоту робертсонівської транслокації 1,29 – 3,3% у корів господарства ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК НААН» (табл.5).

Таблиця 5

### Каріотипова мінливість тварин сірої української породи, %

| Господарство                            | Анеуплоїдія | Поліплоїдія | АРЦРХ    | Хромосомні розриви | Робертсонівська транслокація |
|-----------------------------------------|-------------|-------------|----------|--------------------|------------------------------|
| ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК НААН», 30 гол. | 7,2±0,95    | 0,9±0,68    | 1,8±0,67 | 2,6±0,65           | 3,3±1,08                     |
| ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова», 30 гол.     | 1,2±0,27    | —           | 0,6±0,25 | 1,5±0,45           | —                            |

Для визначення впливу окремих генотипових та паратипових чинників на мінливість каріотипу великої рогатої худоби аборигенних, комерційних (української чорно-рябої молочної, української червоно-рябої молочної) порід та помісних тварин: 1/2БК х 1/2ПЦ; 1/2БК х 1/2Г; 1/2БК х 1/2С; 1/2БК х 1/2УЧРМ; 1/2 БК х 3/12 ПЦ х 3/12 УЧРМ було проведено однофакторний дисперсійний аналіз (табл.6).

Таблиця 6

### Сила впливу ( $\eta^2_x$ ) породи на мінливість каріотипу, досліджуваних порід

| Цитогенетичні показники      | Число градацій | Порода     |       |
|------------------------------|----------------|------------|-------|
|                              |                | $\eta^2_x$ | F     |
| Анеуплоїдія                  | 7              | 0,6086***  | 21,7  |
| Поліплоїдія                  | 7              | 0,9219***  | 118,0 |
| АРЦРХ                        | 7              | 0,0663     | 1,7   |
| Хромосомні розриви           | 7              | 0,8886***  | 79,82 |
| Робертсонівська транслокація | 7              | 0,9112***  | 102,6 |

Примітка. \*\*\* $p < 0,001$

Аналіз одержаних коефіцієнтів сили впливу свідчить про високу та достовірну частку впливу породи великої рогатої худоби на прояв таких цитогенетичних показників як анеуплоїдію, поліплоїдію, хромосомні розриви та робертсонівську транслокацію.

**Вплив збудника туберкульозу на стабільність каріотипу корів червоної польської породи.** Результати цитогенетичного аналізу корів червоної польської

породи української селекції господарства ПрАТ «Мшанецьке» показали, що для тварин характерні кількісні порушення каріотипу, зокрема анеуплоїдія, середній показник якої становить 16,25%, що у двічі перевищує рівень спонтанної хромосомної мінливості та структурні порушення (хромосомні розриви), середня величина яких  $\square$  12,3%. Протестованих тварин поділили на дві групи, відповідно до кількісного порушення хромосом (табл.7).

Таблиця 7

**Аналіз каріотипу корів червоної польської породи за інфекційно - індукованого соматичного мутагенезу, %**

| Група тварин | Кількість тварин, гол. | Анеуплоїдія     | Хромосомні розриви |
|--------------|------------------------|-----------------|--------------------|
| I група      | 24                     | 9,9 $\pm$ 0,53  | 2,0 $\pm$ 1,02     |
| II група     | 6                      | 22,6 $\pm$ 2,69 | 18,3 $\pm$ 2,9     |
| M $\pm$ m    |                        | 16,25 $\pm$ 4,9 | 12,3 $\pm$ 2,51    |

Примітка.\*\*\* p<0,001

Серед 20% (6 гол.) досліджених тварин червоної польської породи української селекції встановлено підвищення кількісних порушень хромосом (анеуплоїдії) у 3 рази порівняно з рівнем спонтанної хромосомної мінливості та підвищений рівень структурних порушень (хромосомні розриви) – 2,2 рази, розмах цієї мінливості становив 16,4 – 20,2%. Однією з причин виникнення хромосомної мінливості у тварин червоної польської породи української селекції може бути інфікованість корів збудником туберкульозу.

Для більш повної оцінки соматичного мутагенезу у корів господарства ПрАТ «Мшанецьке» використовували мікроядерний тест (табл.8). Для тварин другої групи частка лімфоцитів із мікроядром та частка двоядерних лімфоцитів, у 2,2 рази і 2,0 рази, відповідно, більше порівняно з тваринами першої групи. Отже, наявність мікроядер у лімфоцитах периферійної крові є показником генотоксичного впливу на організм тварини, а двоядерні клітини можуть виникати як компенсація дії генотоксичних агентів.

Таблиця 8

**Результати мікроядерного тесту у корів червоної польської породи за індукованого соматичного мутагенезу, ‰**

| Група    | Кількість тварин | Лімфоцит із мікроядром | Двоядерний лімфоцит | Мітотичний індекс | Апоптоз |
|----------|------------------|------------------------|---------------------|-------------------|---------|
| I група  | 24               | 2,1±1,22               | 2,6±0,80            | 5,1±0,66          | 4,4±2,6 |
| II група | 6                | 4,8±1,25               | 5,0±1,06            | 6,6±0,75          | 8,8±2,2 |
| M± m     |                  | 3,5±0,61               | 3,0±0,73            | 6,5±0,93          | 8,2±2,5 |

Примітка. I. I група тварин – відсоток анеуплоїдії дорівнював 6,6–14,25%,

II група тварин – відсоток анеуплоїдії дорівнював 15–30%

**Співвідносність віку і хромосомної нестабільності у сірої української породи великої рогатої худоби.** Розрахунок співвідносності віку тварини – хромосомній нестабільності у аборигенних порід було здійснено під час цитогенетичного тестування тварин сірої української породи господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» (табл.9).

Таблиця 9

**Вікова мінливість каріотипу тварин сірої української породи господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова»**

| Кількість гол. | Вік       | Анеуплоїдія %    | Хромосомні розриви,% | АРЦРХ %  | Двоядерний лімфоцит, ‰ | Лімфоцит із мікроядром ‰ |
|----------------|-----------|------------------|----------------------|----------|------------------------|--------------------------|
| 15             | 9-16 міс. | 10,4±1,50<br>*** | 2,6±0,86             | 1,1±0,24 | 2,6±0,32               | 3,4±0,14                 |
| 15             | 2-2,5 р   | 1,3±0,62<br>***  | 1,5±0,36             | –        | 1,8±0,42               | 3,2±0,20                 |

Примітка. \*\*\*p<0,001

Проведені дослідження показали, що вікова каріотипова мінливість тварин сірої української породи проявилася у підвищенні кількісних порушень хромосом (анеуплоїдії) і становила 10,4%, що у 1,5 рази вище за спонтанний рівень (1,5–8,3%) цієї мінливості.

Для виявлення вірогідності впливу віку на частоту хромосомних порушень, був проведений однофакторний дисперсійний аналіз особин маточного поголів'я двох статевих груп: корів (2–2,5 р.) та телиць (9–16 міс.) сірої української породи господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» (табл.10). Одержані результати показали, що частка впливу віку тварин на мінливість їх каріотипу (анеуплоїдію, асинхронне розходження центромірних районів хромосом (АРЦРХ), хромосомні розриви) є статистично значущою. Отже, встановлені особливості вікових змін у дослідженій популяції тварин є загальнофізіологічною закономірністю.

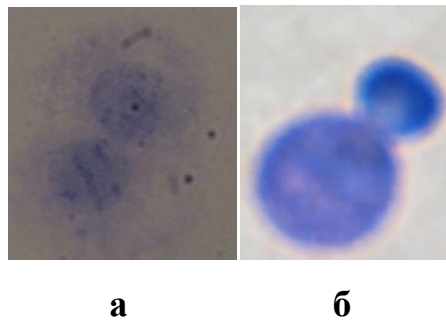
Таблиця 10

**Сила впливу ( $\eta^2_x$ ) віку на прояв мінливості каріотипу тварин сірої української породи**

| Цитогенетичні показники | Число градацій | Вік        |       |
|-------------------------|----------------|------------|-------|
|                         |                | $\eta^2_x$ | F     |
| Анеуплоїдія             | 2              | 0,6690*    | 4,04  |
| АРЦРХ                   | 2              | 0,9971***  | 69,02 |
| Хромосомні розриви      | 2              | 0,9964***  | 55,43 |

Примітка. \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$

**Використання мікроядерного тесту для оцінювання соматичного мутагенезу у тварин великої рогатої худоби аборигенних порід.** Для встановлення дії загального мутагенного навантаження на організм досліджуваних корів аборигенних порід було проведено мікроядерний тест та здійснено порівняльне оцінювання соматичного мутагенезу з комерційними породами (табл.11, рис.4).



**Рис. 4. Цитогенетичні параметри клітин:** а) – двоядерний лімфоцит;  
б) – лімфоцит із мікроядром

Результати тесту показали, що цитогенетичні параметри клітин тварин, досліджуваних порід, не перевищують межу спонтанного рівня цитогенетичних показників великої рогатої худоби за винятком частки двоядерних лімфоцитів у корів української червоно-рябої молочної породи. У тварин української червоно-рябої молочної породи частка двоядерних лімфоцитів становила 7,8%, що більше ніж у 3 рази вище порівняно з тваринами червоної польської породи з статистично значущою різницею ( $p < 0,001$ ). Підвищений рівень двоядерних лімфоцитів свідчить про дію токсичних агентів різної природи.

Таблиця 11

**Результати мікроядерного тесту великої рогатої худоби аборигенних та комерційних порід, %, ( $M \pm m$ )**

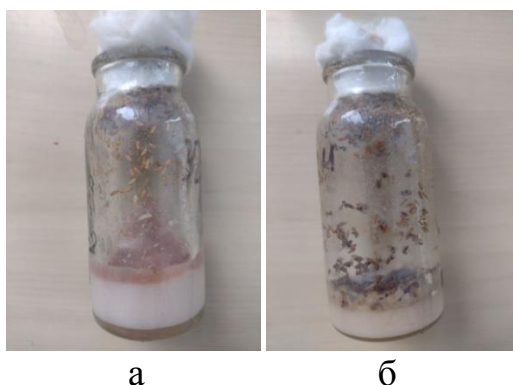
| Порода | n гол. | Лімфоцит із мікроядром | Двоядерний лімфоцит | Мітотичний індекс |
|--------|--------|------------------------|---------------------|-------------------|
|--------|--------|------------------------|---------------------|-------------------|



| ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» ННСТЦВ                                                       |    |            |               |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|------------|---------------|------------|
| Сіра українська                                                                         | 30 | 1,1±0,32   | 2,2±0,34      | 2,8±0,30   |
| ДП «ДГ «Поливанівка» ДУ ІЗК НААН                                                        |    |            |               |            |
| Сіра українська                                                                         | 30 | 1,8±0,22   | 2,6±0,16      | 2,9±0,45   |
| ПрАТ «Мшанецьке» Тербовлянський район Тернопільської області                            |    |            |               |            |
| Червона польська                                                                        | 30 | 4,1 ± 1,00 | 2,4 ± 0,50*** | 2,5 ± 0,60 |
| Українська червоно-ряба молочна                                                         | 30 | 3,2 ± 0,90 | 7,8 ± 1,10*** | 2,8 ± 0,30 |
| ТОВ «Подільський господар» с.м.т. Антоніни Хмельницької обл.                            |    |            |               |            |
| Білоголова українська (СЯ)                                                              | 20 | 4,8±1,19   | 6,4±0,27      | 2,8±0,55   |
| Білоголова українська (ВГ)                                                              | 20 | 5,0±1,17   | 5,6±0,57      | 3,8±1,34   |
| Одноосібні приватні господарства, с. Нижні ворота, Воловецького р-ну Закарпатської обл. |    |            |               |            |
| Бура карпатська                                                                         | 15 | 1,7±0,23   | 1,5±0,24      | 4,8±0,94   |
| Помісні тварини                                                                         | 15 | 2,0±0,48   | 2,7±1,18      | 5,5±0,67   |

Примітка. \*\*\*– $p < 0,001$

**Короткострокове тестування «Спосіб визначення мутагенної активності (сірководневої води) на організм *Drosophila melanogaster*».** Паратиповий чинник (сірководень у воді), може призвести до підвищення рівня двоядерних лімфоцитів. Тому для дослідження впливу води на організм тварин червоної польської та української червоно-рябої молочної порід був проведений тест «Спосіб визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster*». Аналізували самців *Drosophila melanogaster* лінії Canton-S (15 культур), що були вирощені на середовищі, до складу якого входила вода з сірководнем (рис.5). Проведений тест показав, що у культур дрозофіл, вирощених на середовищі, приготовленому на воді з сірководнем, частота постембріональних летальних мутацій (25%) удвічі вища порівняно з контролем (11,3%), що свідчить про наявний мутагенний ефект сірководню ( $\chi^2=10,23$ ;  $P > 0,99$ ), однак слабкої активності (табл.12, рис.5.).



а

б

**Рис. 5. Визначення мутагенної активності сірководневої води на *Drosophila melanogaster*:** а – культура дрозофіли, вирощена на контрольному середовищі; б –

культура дрозоділі, вирощена на поживному середовищі, приготовленому на воді із сірководнем

Отже, підвищення частки двоядерних лімфоцитів у периферійній крові корів української червоно-рябої породи господарства ПрАТ «Мшанецьке» може бути викликане паратиповим чинником (сірководнем у воді).

Таблиця 12

**Рівень постембріональних летальних мутацій у статевих клітинах *Drosophila melanogaster* при впливі води з сірководнем**

| Проаналізовано культур дрозоділі | Частота           | Значення |        |
|----------------------------------|-------------------|----------|--------|
|                                  | ПЕЛМ*%, $M \pm m$ | $\chi^2$ | P      |
| Контроль                         |                   |          |        |
| 15                               | $11,3 \pm 2,64$   | □        | □      |
| Вода з сірководнем               |                   |          |        |
| 15                               | $25,0 \pm 0,71$   | 10,23    | > 0,99 |

Таким чином, аналіз одержаних нами даних показав, що на формування генетичної структури популяцій аборигенних порід великої рогатої худоби впливають генотипові (порода та географічна місцевість її формування, вік тварини) та паратипові фактори (інфікованість збудником туберкульозу та токсичні речовини, сірководень у воді).

**ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ ЛОКАЛЬНИХ ТА ЗНИКАЮЧИХ ПОРІД КОНЕЙ**

**Гуцульська порода коней – аборигенна порода українських Карпат.** Для вивчення історії розведення та збереження гуцульських коней на українських землях, починаючи з XIX століття, було проведено ретроспективний аналіз літературних даних, архівних матеріалів, зустрічей із сім'ями колишніх наїзників та працівників Державної стаднини огирів (станція жеребців) у Судовій Вишні, а також висвітлено систему заходів збереження коней гуцульської породи в теперішній час. Історичним фактом збереження та розведення гуцульського коня на українських землях є побудована державна заводська конюшня в с. Дроговиж на Львівщині у 1822 році, яка згодом була переведена у Судову Вишню (містечко Мостиського району Львівської області). У 1907 році в Судовій Вишні почалося будівництво Державної Стаднини (станції) огирів (табл.13).

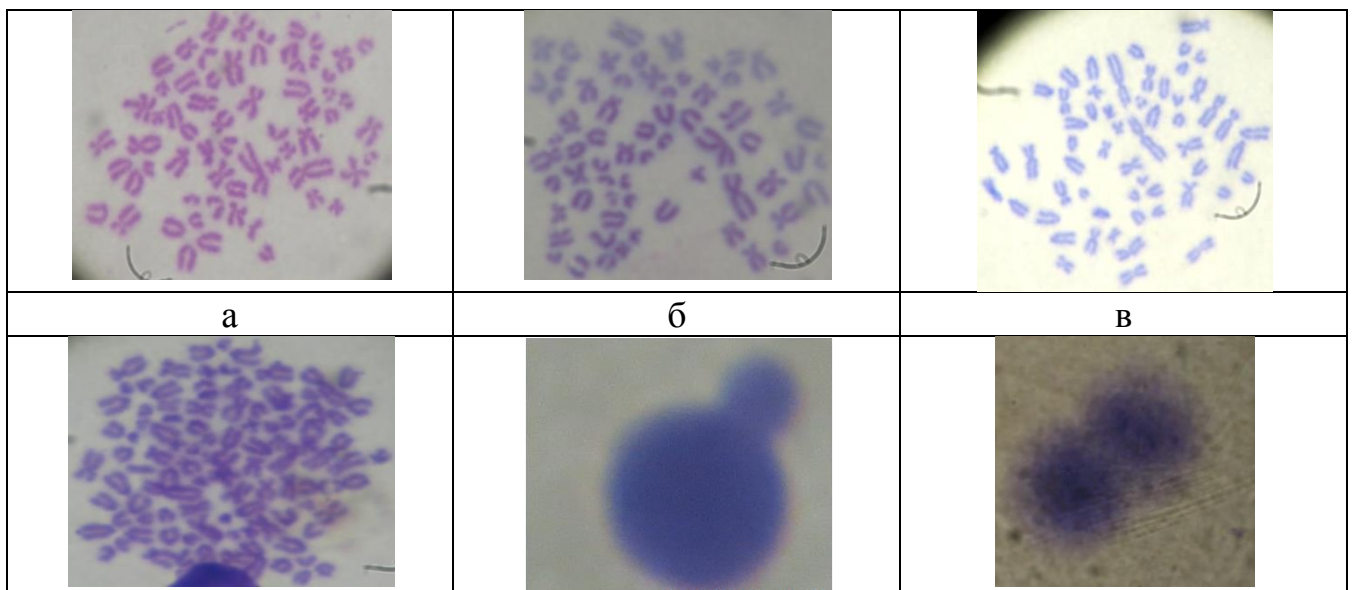
Таблиця 13

**Клички жеребців гуцульської породи та їх помісей, які в 1933 році  
знаходилися в Державній Стаднині огирів**

| Порода                      | Кличка                                                                                              | Кількість голів |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Гуцульська                  | Burek, Dudziarz, Fuks, Góral -9,<br>Góral - 4, Góral -12, Hroby –I,<br>Hroby – 4, Kapitan, Prysliip | 10              |
| Арабо-гуцульські<br>помісні | Capul – 15                                                                                          | 1               |
| Гуцуло-коник помісні        | Halicz, Harbuz                                                                                      | 2               |

На сьогодні в Україні тільки 2 господарства (НВА «Племконецентр» та ФГ «Полонинське господарство») з розведення гуцульської породи коней мають статус племрепродуктора.

**Особливості каріотипу української аборигенної гуцульської породи коней.** За результатами цитогенетичного аналізу встановлено наявність геномних та структурних порушень хромосом у досліджуваних коней гуцульської породи (табл. 14, рис. 6).



**Рис. 6. Особливості каріотипу коней гуцульської породи**

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

Геномні порушення хромосом представлені анеуплоїдією, середня величина якої становила 10,8%, поліплоїдними клітинами з середньою частотою 1,4%.

Таблиця 14

**Результати аналізу каріотипової мінливості гуцульської породи коней, %**

| Господарство                             | Анеуплоїдія | Поліплоїдія | АРЦРХ    | Хромосомні розриви |
|------------------------------------------|-------------|-------------|----------|--------------------|
| Національний природний парк «Гуцульщина» | 11,1±2,63   | 1,1±1,04    | 6,0±2,15 | 1,1±1,04           |
| ТзОВ «Край неба»                         | 8,8±3,50    | 2,0±1,81    | 2,0±1,81 | □                  |
| M±m                                      | 10,82,10    | 1,4±0,93    | 3,9±1,77 | 0,7±0,59           |

Розмах асинхронного розходження центромірних районів хромосом становив (2,0% – 6,0%) при середньому значенні – 3,9%. Кількісна мінливість хромосом відповідає спонтанному рівню для коней в цілому. Виявлено відсутність хромосомних розривів у тварин господарства ТзОВ «Край неба» та 1,1% метафазних пластинок із хромосомними розривами у коней Національного природного парку «Гуцульщина», що свідчить про стабільність каріотипу досліджуваних тварин (табл.13) Визначено частку лімфоцитів із мікроядром для тварин двох господарств – 4,0–4,2%. Встановлено пряму залежність між клітинами з анеуплоїдією та лімфоцитами з мікроядром ( $r=0,9198$ ) із статистичною значущістю  $p<0,05$ .

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

**Історія походження потомків диких коней – тарпанів (коника польського) на території Передкарпаття.** Для встановлення диких предків одомашнених порід коней на території Передкарпаття було проведено ретроспективний аналіз літературних даних філогенетичної систематики сучасних еквід (коника польського) та їх вимерлих предків. Вчені-палеонтологи дійшли висновку, що породи коней (*E. caballus gmelini* var. *Polonika* або ж «коників польських») представляють собою потомків степових тарпанів (*E. caballus gmelini*) з домішками крові коней інших порід. В кінці XVI ст. надходження інформації про існування дикого коня в дикій природі раптово припиняється. Ян Замойський (впливовий польський граф) заснував великий і престижний звіринець і парк дикої природи недалеко від містечка Звезинець (Польща) і утримував відловлених тарпанів. Після припинення існування цього зоопарку у XIX ст. польські фермери відловлювали вимираючих диких тарпанів і схрещували їх зі своїми робочими кіньми. В результаті вільного схрещування з домашніми кобилами було отримано так званого польського коника.

**Особливості каріотипу потомків диких коней –тарпанів, які занесені до Червоної книги.** Аналіз каріотипової мінливості коней породи коник польський показав, що норма каріотипу соматичних клітин становить  $2n=64$  хромосоми. Кількісні порушення хромосом, анеуплоїдія, в основному були гіпоплоїдні, тобто зі зменшеною кількістю хромосом ( $2n=57-60$ ) (табл. 15).

Таблиця 15

**Аналіз каріотипу коней породи коник польський за спонтанного мутагенезу**

| Цитогенетичні показники | Анеуплоїя % | Асинхронне розходження центромірних районів хромосом, % | Лімфоцити із мікроядром, ‰ | Двоядерний лімфоцит, ‰ | Мітотичний індекс, ‰ |
|-------------------------|-------------|---------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|
| M±m                     | 9,3±3,3     | 0,2±0,03                                                | 1,2±0,29                   | 1,3±0,53               | 2,6±0,73             |

Частка клітин із анеуплоїдією у 1,5 рази вище відносно рівня спонтанної цитогенетичної мінливості (1,5–6,8%). Кратне збільшення хромосом (поліплоїдія) у каріотипі цих тварин не спостерігалось. Структурні порушення хромосом (хромосомні та хроматидні розриви) виявлені не були. Відсутність хромосомних аберацій свідчить про стабільність каріотипу досліджуваних тварин. Цитогенетичні параметри соматичних клітин (МЯ, ДЯ, МІ) знаходилися в межах спонтанного мутагенезу і не перевищували видові особливості, характерні для цього виду.

Для встановлення впливу факторів різної природи на формування генетичної структурної стабільності каріотипу популяції аборигенної гуцульської породи коней та малочисельної популяції коней породи коник польський був здійснений ретроспективний аналіз цитогенетичних досліджень комерційних порід коней, які утримувалися на Київському державному іподромі (табл.16).

Таблиця 16

**Порівняльний аналіз мінливості каріотипу популяцій комерційних порід коней та аборигенної гуцульської і коника польського порід**

| Порода                      | A, %     | ПП, %   | АРЦРХ, % | Хм. р., % | Хр. р. % | МЯ ‰     | ДЯ ‰     | МІ ‰     |
|-----------------------------|----------|---------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| Російська рисиста (10 гол.) | 0,6±0,12 | □       | 0,2±0,03 | 0,9±0,20  | 0,3±0,06 | 2,1±0,84 | 4,7±0,45 | 1,7±0,30 |
| Укр.верхова (10 гол.)       | 6,3±2,43 | 1,2±0,3 | 1,8±0,75 | 3,1±1,56  | 3,8±2,00 | 1,3±0,74 | 1,8±0,98 | 1,6±0,23 |
| Гуцульська (10 гол.)        | 10,8±2,1 | 1,4±0,9 | 3,9±1,77 | 0,7±0,59  | □        | 4,1±1,40 | 6,2±0,94 | 4,3±0,72 |
| Коник польський (10 гол.)   | 9,3±3,31 | □       | 0,2±0,03 | □         | □        | 1,2±0,29 | 2,6±0,53 | 1,3±0,73 |

Встановлено, що найвищий відсоток кількісних порушень хромосом, анеуплоїдію, виявлено у гуцульської породи коней та коней породи коник польський (10,8% та 9,3% відповідно). У коней інших досліджених порід ця мінливість становила 0,6–6,3%. Поліплоїдні клітини було знайдено у крові тварин гуцульської та української верхової порід у межах 1,2–1,4%. Самий високий рівень асинхронного розходження центромірних районів хромосом проявився у

протестованих коней гуцульської породи і становив 3,9% та найнижчий–0,2% у коней породи коник польський та російської рисистої.

Найнижчий відсоток структурних порушення хромосом(хромосомні розриви) було виявлено у коней гуцульської породи (0,7%), а у досліджених коней породи коник польський ця мінливість–відсутня. Це свідчить про стабільність каріотипу коней цих порід та здатності швидкої елімінації пошкоджених клітин. Найбільшу частку лімфоцитів із мікроядрами, двоядерними лімфоцитами, клітинами які діляться, було виявлено у коней гуцульської породи. Для встановлення впливу факторів різної природи на формування генетичної структури коней нами було проведено однофакторний дисперсійний аналіз (табл.17).

Таблиця 17

**Сила впливу ( $\eta^2_x$ ) породи на мінливість каріотипу коней, досліджуваних порід**

| Цитогенетичні показники | Число градацій | Порода     |       |
|-------------------------|----------------|------------|-------|
|                         |                | $\eta^2_x$ | F     |
| Анеуплоїдія             | 8              | 0,6740*    | 30,8  |
| Поліплоїдія             | 8              | 0,9903***  | 61,3  |
| АРЦРХ                   | 8              | 0,9396***  | 93,4  |
| Хромосомні розриви      | 8              | 0,9435***  | 100,3 |
| Хроматидні розриви      | 8              | 0,9612***  | 148,9 |
| Лімфоцит із мікроядром  | 8              | 0,9564***  | 131,2 |
| Двоядерний лімфоцит     | 8              | 0,8639***  | 38,1  |
| Мітотичний індекс       | 8              | 0,9540***  | 124,4 |

Примітка. \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$

Одержані результати показали, що частка впливу породи на мінливість їх каріотипу (анеуплоїдію, поліплоїдію, АРЦРХ, хромосомні аберації та показники мікроядерного тесту) є статистично значущою. Отже, каріотипова мінливість коней великою мірою залежить від генотипових та паратипових факторів.

**ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦІЙНА СТРУКТУРА ПРЕДСТАВНИКІВ КЛАСУ  
UNGULATA ЗА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ ДІЛЯНКАМИ ДНК.  
ЕВОЛЮЦІЙНО-ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ**

**Ретроспективний аналіз літературних даних щодо поширення плейстоцен-голоценових коней на території України.** Регіон одомашнення коней за даними дослідників нині залишається точно не встановленим. Палеонтологи вважають, що сучасні аборигенні коні з різних територій можуть походити від різних видів древніх коней. Останнім диким конем, що дожив на Україні до кінця XIX ст. на думку В. І. Громової, і Н.Г. Белан, був тарпан.

Більшість археозоологів вважають тарпана найбільш можливим предком домашнього коня. Однак, це твердження сьогодні ставиться під сумнів. Питання про предка домашнього коня розглядала І.Є. Кузьміна (1977 р.). Вона припускала, що предків домашнього коня потрібно шукати серед плейстоценових коней Поволжжя, тобто серед широкопалих коней. Такої самої думки дотримувався В. І. Цалкін та український палеонтолог О. П. Журавльов. Узагальнений аналіз ретроспективних даних поширення плейстоцен-голоценових коней на території України представлено в таблиці 18 та рис. 8.

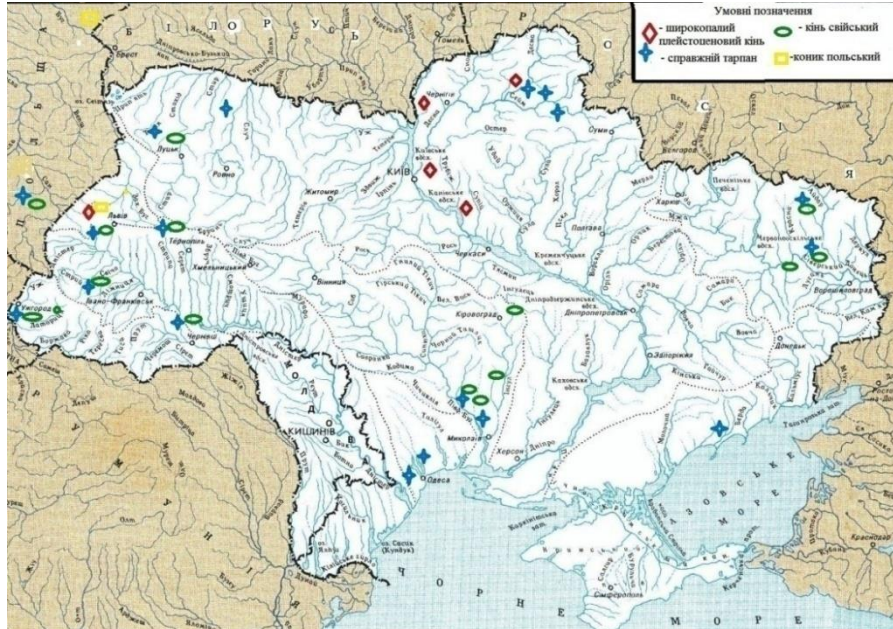
Таблиця 18

**Поширення плейстоцен-голоценових коней на території України та інших західних держав**

| Четвертинний період                                    | Поселення                                                                                                            | Еквідиди                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Пізній плейстоцен                                      | с.Страдч. хутір Винява (близько Львова)                                                                              | Широкопалий кінь (Eguus eguus Pidoplishko, 1938);<br>Справжній тарпан (Eguus gmelini Antonius, 1912) Дригант 2006. |
| Пізній плейстоцен                                      | Подесення, Подніпров'я, Мізин, Рудки. Волохи, Беньова Вишня (Львівська обл.);                                        | Широкопалий кінь ( Eguus cabalus latipes, Громова, 1949); коні близькі до тарпана (Дригант 2006)                   |
| Ранній голоцен, пізній мезоліт<br>10-7 тис. р. до н.е. | Південно-західне Причорномор'є: с.Мирне, с.Гиржево Одеської обл.                                                     | Справжній тарпан Eguus gmelini Antonius (Громова, 1949, Бібікова, 1972. Белан, 1986)                               |
| Ранній неоліт 6-4 тис.р. до н.е.                       | с.Погорілівка (Подесення)                                                                                            | Справжній тарпан Eguus gmelini Antonius (Громова, 1949)                                                            |
| Кінець 5– початок 4 тис. до н.е.                       | Миколина Брояка, Пугач-2, Гард 3 (Миколаївська обл.)                                                                 | Справжній тарпан Eguus gmelini Antonius<br>Кінь свійський Eguus cabalus (Даниленко 1955, Журавльов 1996)           |
| Друга половина 4 тис. до н. е.                         | Деріївка, Кіровоградська обл.                                                                                        | Кінь свійський Eguus cabalus (Телігін. 1960, Бібікова, 1969)                                                       |
| 4200-3800 р. до н.е.                                   | Гірка Полонка, Гнідава Луцький р-н, Волинська обл.                                                                   | Кінь свійський Eguus cabalus (Журавльов 1996)                                                                      |
| Кінець III-II тис. до н.е.                             | Ново-Розанівка 2 р.Інгул, Миколаївська обл.                                                                          | Кінь свійський Eguus cabalus (Шапошникова, Неприна, 1968, Бібікова 1972)                                           |
| Голоцен                                                | Тернопільська, Волинська, Івано-Франківська, Львівська, Чернівецька, Закарпатська, Підкарпатське воєводство (Польща) | Справжній тарпан Eguus gmelini Antonius<br>Кінь свійський Eguus cabalus (Дригант 2016)                             |
| XIII-XVI ст.                                           | Район «Великої пустині» - східна Прусія, частково Польща, Литва                                                      | Справжній тарпан Eguus gmelini Antonius; (Marep 1960)                                                              |
| XVIII ст.-XIX ст.                                      | м.Звежинець (Польща), парк дикої природи, фермери (Польща)                                                           | Справжній тарпан Eguus gmelini Antonius;<br>Коник польський (Граф Ян Замойський)                                   |
| 1925 р.                                                | Резерват у Біловезькій пущі (польська Puszeza Biaowieska)                                                            | Відновлення первісного типу дикого коня<br>Офіційне визнання породи «Коник польський»(професор Тадеуш Ветулані)    |
| 1995 р.-2009 р.                                        | Розточанський парк народовий (Польща) Яворівський національний природний парк (Україна)                              | Резерват коника польського                                                                                         |



Для розв'язання питання систематики видового складу Eguidae, які населяли Україну в минулі геологічні епохи, встановлення філогенетичних зв'язків між ними, необхідне використання молекулярно-генетичного аналізу геному представників роду Eguus.



**Рис. 8. Карта поширення плейстоцен-голоценових коней на території України**

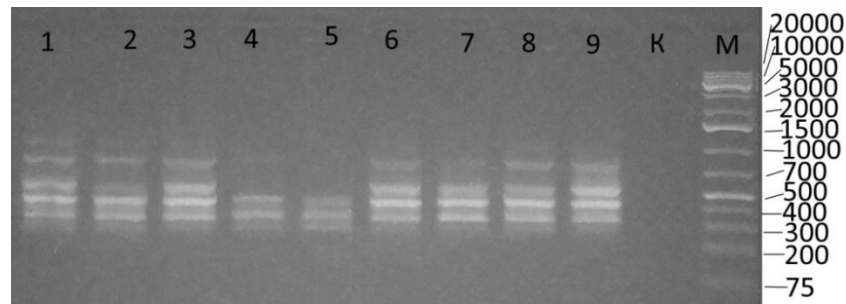
**Генетичний поліморфізм популяцій коней за ISSR-маркерами.** Для дослідження внутрішньовидового генетичного поліморфізму нами були вибрані наступні породи: гуцульська порода коней – аборигенна порода, яка характеризується унікальними адаптивними властивостями; коні породи коник польський – тварини, які занесені до Червоної книги і знаходяться під егідою ЮНЕСКО; арабська порода коней – одна з найдавніших порід; викопні рештки (кістки) давніх коней.

З урахуванням поставленої мети, роботу було поділено на три етапи:

1. відпрацювання нової методики виділення ДНК із викопних решток (кісток) давніх коней;
2. постановка ISSR-PCR з виділених зразків ДНК та оптимізація протоколу проведення ампліфікації дослідних фрагментів геному;
3. визначення найбільш ефективних ISSR-маркерів для оцінки параметрів генетичної мінливості дослідних популяцій.

**Поліморфізм фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими ди- і тринуклеотидними тандемними повторами, в геномі коней гуцульської породи.**





**Рис.9. Спектри фрагментів ампліфікації ДНК гуцульської породи коней за праймером (AG)<sub>9</sub>C . Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-9продукти ампліфікації ДНК коней гуцульської породи.**

На основі генотипування 30-ти коней гуцульської породи знайдено 54 локуси, 33 з яких є поліморфними (табл.19).

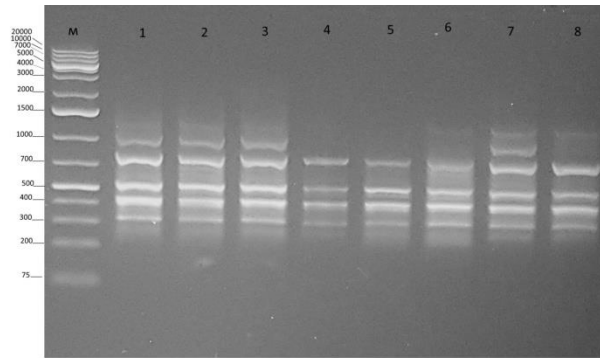
Таблиця 19

**Параметри використаних ISSR-маркерів (коні гуцульської породи, n=30)**

| Праймер             | (GA) <sub>9</sub> | (AG) <sub>9</sub> | (AG) <sub>8</sub> C | (AG) <sub>8</sub> C | (GA) <sub>6</sub> C | (ACC) <sub>6</sub> | (GAG) <sub>6</sub> | (CTC) <sub>6</sub> | Σ        |
|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|
|                     | C                 | C                 | A                   | G                   | C                   | G                  | C                  | C                  |          |
| К-сть локусів       | 8                 | 5                 | 9                   | 6                   | 8                   | 5                  | 9                  | 4                  | 54       |
| Межі довжин         | 280-930           | 320-1050          | 260-1230            | 300-870             | 380-1750            | 380-1050           | 280-870            | 680-1750           | 260-1750 |
| Поліморфних локусів | 6                 | 4                 | 6                   | 0                   | 4                   | 4                  | 6                  | 3                  | 33       |
| РІС                 | 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     |

Аналіз значень індекса РІС, який показує рівень інформативності локуса, виявив, що досліджувані особини гуцульської породи за спектром ампліконів при використанні праймерів (GA)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>9</sub>C, (GA)<sub>6</sub>CC, (ACC)<sub>6</sub>G, (GAG)<sub>6</sub>C та (CTC)<sub>6</sub>C, характеризувалися помірною поліморфністю із значенням РІС в межах 0,29-0,41. У протестованих тварин, спектр ампліконів при використанні праймера (AG)<sub>8</sub>CA характеризувався високим рівнем інформативності із значенням РІС=0,60. Лише при використанні одного праймера (AG)<sub>8</sub>CG спектр одержаних ампліконів був повністю консервативним. Отже, досліджувана популяція коней гуцульської породи характеризується оптимальним рівнем генетичного різноманіття

**Поліморфізм фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими ди- і тринуклеотидними тандемними повторами, в геномі коней породи коник польський.**



**Рис.10. Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней породи коник польський за праймером  $(AG)_9C$ .** Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-8продукти ампліфікації ДНК.

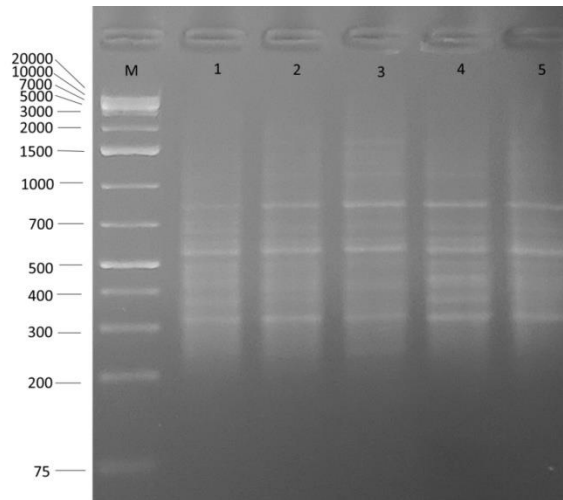
Згідно одержаних даних щодо основних параметрів спектрів продуктів ампліфікації геномної ДНК коней породи коник польський ( $n=10$  гол.) із використанням 8-ми ISSR-маркерів було виявлено 56 локусів, 14 з яких були поліморфними. У разі застосування праймерів  $(AG)_8CG$ ,  $(GAG)_6C$ ,  $(CTC)_6C$  спостерігалася повна відсутність поліморфізму продуктів ампліфікації. Найбільшу кількість поліморфних фрагментів (6 із 7) було знайдено при використанні  $(ACC)_6G$  праймера ( $PIC=0,36$ ,  $P=85,4\%$ ) та 4 поліморфних локуси з 9 за використання  $(AG)_9C$  праймера при  $PIC=0,21$ ,  $P=44,4\%$ . Ці локуси були помірно та низько інформативні (локуси зі значенням  $PIC$  в межах  $0,250-0,500$  – помірно інформативні, при  $PIC<0,25$  – низько інформативні). У спектрах праймерів  $(GA)_9C$ ,  $(AG)_8CA$ ,  $(GA)_6CC$  знайдено лише по одному поліморфному локусу. Межі величин  $PIC=0,04-0,08$  та  $P=16,6\%$  вказують на те, що ці локуси – низько інформативні та характеризуються низьким рівнем поліморфності. Низьке значення частки поліморфних локусів ( $P$ ) і індексу  $PIC$  свідчить про високу ступінь генетичної консолідації коней породи коник польський та можливу репродуктивну ізоляцію популяції (табл.20).

Таблиця 20

**Параметри використаних ISSR-маркерів (коні породи коник польський,  $n=10$ )**

| Праймер             | $(GA)_9C$ | $(AG)_9C$ | $(AG)_8C$<br>A | $(AG)_8CG$ | $(GA)_6CC$ | $(ACC)_6G$ | $(GAG)_6C$ | $(CTC)_6C$ | $\Sigma$ |
|---------------------|-----------|-----------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|
| К-сть локусів       | 6         | 9         | 6              | 7          | 6          | 8          | 9          | 5          | 56       |
| Межі довжин         | 360-870   | 240-1290  | 380-1350       | 300-1290   | 500-1550   | 380-1450   | 240-1050   | 600-1750   | 240-1750 |
| Поліморфних локусів | 1         | 4         | 1              | 0          | 1          | 7          | 0          | 0          | 14       |
| $PIC$               | 0,08      | 0,21      | 0,07           | 0          | 0,04       | 0,36       | 0          | 0          | 0,09     |
| $P, \%$             | 16,6      | 44,4      | 16,6           | 0          | 16,6       | 85,4       | 0          | 0          | 22,4     |

**Поліморфізм фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими ди- і тринуклеотидними тандемними повторами, в геномі коней арабської породи (табл. 21, рис.11.).**



**Рис.11. Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней арабської породи за праймером (AG)<sub>8</sub>CA. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-5 продукти ампліфікації ДНК.**

Таблиця 21

**Параметри використаних ISSR-маркерів (коні арабської породи, n=10)**

| Праймер             | (GA) <sub>9</sub> C | (AG) <sub>9</sub> C | (AG) <sub>8</sub> C<br>A | (AG) <sub>8</sub> CG | (GA) <sub>6</sub> CC | (ACC) <sub>6</sub> G | (GAG) <sub>6</sub> C | (CTC) <sub>6</sub> C | Σ        |
|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------|
| К-сть локусів       | 4                   | 5                   | 6                        | 7                    | 12                   | 5                    | 6                    | 8                    | 53       |
| Межі довжин (п.н.)  | 380-870             | 280-590             | 380-1050                 | 320-870              | 340-1750             | 380-1050             | 340-1050             | 500-1900             | 280-1900 |
| Поліморфних локусів | 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     |
| P, %                | 0                   | 40                  | 17                       | 14,2                 | 8,3                  | 0                    | 33,3                 | 25                   | 17,22    |

За результатами проведеної роботи встановлено, що за спектром продуктів ампліфікації 8 ISSR-маркерів у коней арабської породи виявлено 53 локуси, 9 з яких є поліморфними. Межі довжин всіх знайдених локусів становили 280-1900 пн. При використанні динуклеотидного (GA)<sub>9</sub>C та тринуклеотидного (ACC)<sub>6</sub>G праймерів у ISSR спектрах жодного поліморфного локусу не виявлено. У спектрах інших 6 праймерів, що застосовувалися для оцінювання поліморфізму ділянок геномної ДНК, спостерігалось 1-2 поліморфних локуси. Межі величин РІС при цьому становили 0,03-0,16, та P=8,3-40%. Всі ці локуси є низько інформативними. Одержані дані свідчать про те, що протестовані коні арабської породи є високо

консолідованими, але зберігають певну ступінь генетичного різноманіття, що особливо важливо у контексті завдань збереження генофонду.

**Оцінка стану генофондів коней порід гуцульської, коника польського, арабської за допомогою ISSR – маркерів.** Для виявлення відмінностей у генофондах досліджених коней: гуцульської породи, коника польського та арабської за допомогою ISSR – маркерів вираховували параметри генетичного різноманіття, які включали в себе частку поліморфних локусів –  $P$ , середнє на локус генне різноманіття –  $H_s$ , інформаційний індекс Шеннона –  $H'$ , показник внутрішньопопуляційного різноманіття –  $\mu$  та частку рідкісних локусів –  $h_\mu$

Одержані результати за основними параметрами генетичного різноманіття свідчать про те, що найбільша частка поліморфних локусів була властива для коней гуцульської породи (0,494), тоді як найменшим поліморфізмом локусів характеризувалися коні арабської породи (0,172). Середнє на локус генне різноманіття ( $H_s$ ), для гуцульської породи коней було найвище і складало 0,603, у коней арабської породи дорівнювало 0,546, а коні породи коник польський характеризувалися найнижчою гетерозиготністю (0,387). Найбільші показники алельного різноманіття ( $H'$ ) властиві коням гуцульської породи (0,311) і найменш виражена ця різноманітність (0,116) у коней арабської породи. Аналізуючи параметри генетичного різноманіття за даними ISSR-маркерами досліджених порід коней, можна зробити висновок, що всі протестовані групи тварин відносно благополучні за виявленим внутрішньопопуляційним генетичним різноманіттям за виключенням значення параметрів частки поліморфних локусів у коней арабської породи ( $P=0,172$ ) та коней породи коник польський ( $P=0,224$ ). Найменший показник ступеня різноманітності  $\mu$  (3,99) був характерний для коней арабської породи, а найбільший –  $\mu$  (25,97) для гуцульської породи. Частка рідкісних локусів  $h_\mu$  у коней породи коник польський була відсутня. Найвищий показник цієї ознаки ( $h_\mu = 0,56$ ) був у коней арабської породи, а в коней гуцульської породи він дорівнював –0,20. За результатами оцінювання стану генофондів досліджених коней встановлено, що найвище генетичне різноманіття притаманне коням гуцульської породи (табл.22).

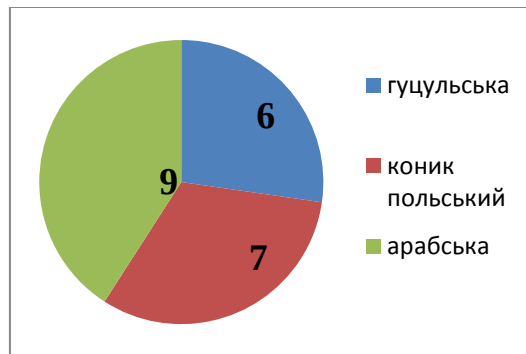
Таблиця 22

**Основні показники генетичного різноманіття коней гуцульської породи, коника польського та арабської породи**

| Порода          | $P$   | $H_s$ | $H'$  | $\mu$        | $h_\mu$   |
|-----------------|-------|-------|-------|--------------|-----------|
| Гуцульська      | 0,498 | 0,603 | 0,311 | 25,9±3,96*** | 0,20±0,12 |
| Коник польський | 0,224 | 0,387 | 0,211 | 13,0±1,19*** | 0         |
| Арабська        | 0,172 | 0,546 | 0,116 | 3,99±1,99*** | 0,56±0,22 |

**Генетичний моніторинг внутрішньопородної і міжпородної мінливості коней за ISSR-PCR маркерами.** Для встановлення внутрішньопородної та міжпородної мінливості у досліджуваних коней знаходили генофондний профіль та породоспецифічний патерн. Для визначення породоспецифічного патерна до уваги приймалися фрагменти ДНК, які зустрічалися з найбільшою частотою (частота

>0,4). Генофондовий профіль і породоспецифічний патерн протестованих тварин дали можливість встановити унікальні поліморфні ДНК – локуси, властиві тільки цим породам (рис. 14, табл. 23).



**Рис. 14. Кількість унікальних поліморфних ДНК-фрагментів, виявлених у коней гуцульської породи, коника польського та арабської породи**

Таблиця 23

**Унікальні поліморфні ДНК – локуси популяцій коней гуцульської, коника польського, арабської порід**

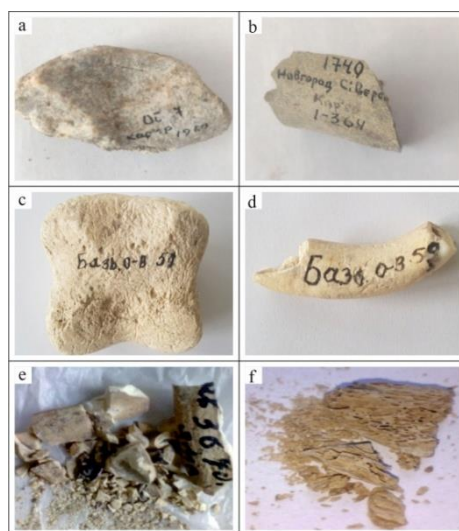
| Порода коней    | Праймер                                                                                                            | Межі довжин (пн)                                                                                                                       |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Гуцульська      | (GA) <sub>9</sub> C<br>(AG) <sub>9</sub> C<br>(AG) <sub>8</sub> CA<br>(CTC) <sub>6</sub> C<br>(GAG) <sub>6</sub> C | A-15880-930<br>A-17760-810<br>A-101180-1230<br>A-7 1400-1450<br>A-25 470-490; A-34260-270                                              |
| Коник польський | (GA) <sub>9</sub> C<br>(AG) <sub>9</sub> C<br>(AG) <sub>8</sub> CG<br>(ACC) <sub>6</sub> G<br>(GAG) <sub>6</sub> C | A-29 360-370<br>A-26 440-460<br>A-35 240-250<br>A-8 1300-1350<br>A-9 1240-1290; A-14 900-940<br>A -35 240-250                          |
| Арабська        | (GA) <sub>6</sub> CC<br>(GAG) <sub>6</sub> C<br>(CTC) <sub>6</sub> C                                               | A-8 1300-1350; A-11 1060-1110; A-22560-590; A-26 440-460;<br>A-30 340-350<br>A-26440-460; A-30 340-350<br>A-3 1800-1900; A-15 880-930) |

**Оптимізація методу виділення ДНК з викопних решток кісток коней.** Метою роботи було відпрацювання нової методики виділення ДНК із викопних решток (кісток) давніх коней та постановки ISSR-ПЛР з виділеними зразками ДНК.

Дослідження проведено на зразках викопних кісток коней плейстоценового періоду (близько 10 тис. р. до нашої ери), кістка п'ястку (os. tarsicentral). На рис. 15 наведено фотографії отриманого палеонтологічного матеріалу.

Виділення ДНК з кісткової тканини включає різні етапи, а саме: підготовку проб, декальцифікацію матеріалу та процедуру очищення ДНК.

При виділенні ДНК з викопних решток наважки подрібнювали у скляному гомогенізаторі за температурою 4°C, поступово додаючи лізуючий буфер (0,32М сахарози, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1% Тритон Х-100, 0.01М тріс-НСl (рН7.6)) і витримували при 4 °С протягом 30 хв. Після центрифугування, осад ресуспендували в 1,5 мл розчину солі ЕДТА (75 мМ NaCl, 25 мМ ЕДТА (рН 8.0)), додавали 10 мкл 10 мг/мл протеїнази К та 20 мкл 1М дітіотрітолу та інкубували при температурі 56°C упродовж 100-120 годин. До одержаного лізату додавали 1 об. (400 мкл) суміші (25 об. фенолу, еквілібрований з буфером TE, рН=7,5-8,0; 24 об. хлороформу; 1 об.ізоамілового спирту) і після інтенсивного струшування (біля 3 хв.) центрифугували при 14 000 об/хв. упродовж 10 хв. фракцію, яка містила залишки ДНК, переносили у чисту центрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл і додавали 1 об. (400 мкл) суміші (24 об. хлороформу; 1 об. ізоамілового спирту). Інтенсивно струшували і центрифугували при 14000 об/хв. упродовж 10 хв. для розділення фаз. Верхню фазу переносили у чисту пробірку. Для осадження ДНК із розчину додавали 1/10 об. 3М розчину ацетату натрію, рН=5,2 (30 мкл) і 2,5 об. 96%-ного етанолу (800 мкл), обережно перемішували. Після видалення рідкої фази осад промивали у 70% спирті, охолоджену до +4°C чи до - 20 °С, висушували при кімнатній температурі і додавали 50-100 мкл дистильованої /деіонізованої води. Після цього у кожену пробірку вносили по 300 мкл лізуючого розчину для відмивки «ДНК-сорб В» (АмпліСенс) прогрітого при 65°C до повного розчинення кристалів і вносили по 100 мкл проб.



**Рис. 15. Палеонтологічні знахідки викопних решток коней:** а—кістка п'ястку (os. Tarsicentral) плейстоценового коня; б—кістка плейстоценового коня, знайдена у Новгород-Сіверському; в—фаланга кінцівки справжнього тарпана; д—зуб дикого коня тарпана; е—зуб давнього свійського коня; ф—фрагмент хребця давнього свійського коня

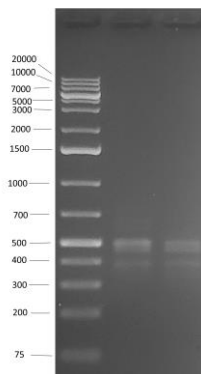
*Оптимізація протоколу проведення ампліфікації дослідних фрагментів геному з виділених зразків ДНК за використання ISSR-PCR.*

Для вивчення поліморфізму ДНК коней за ISSR-маркерами, проводили оптимізацію температурних режимів проведення ПЛР з чотирма праймерами, що, згідно літературних джерел, вважаються найбільш інформативними (табл.24).

Таблиця 24

**Нуклеотидна послідовність праймерів, які використовувалися у дослідженнях**

| Назва маркеру | Нуклеотидна послідовність | Мотив                |
|---------------|---------------------------|----------------------|
| GA-ISSR       | 5`-GAGAGAGAGAGAGAGAGAC-3` | (GA) <sub>9</sub> C  |
| ACC-ISSR      | 5`-ACCACCACCACCACCACCG-3` | (ACC) <sub>6</sub> G |
| GAG-ISSR      | 5`-GAGGAGGAGGAGGAGGAGC-3` | (GAG) <sub>6</sub> C |
| AG-ISSR       | 5`-AGAGAGAGAGAGAGAGAGC-3` | (AG) <sub>9</sub> C  |



**Рис. 16. Електрофореграма за маркером молекулярних мас [Thermo Scientific™ Gene Ruler 1 kb Plus DNALadder, ready-to-use](#)-75-20000 bp. фрагментів ампліфікації ДНК плейстоценового коня за праймером (GA)<sub>9</sub>C.**

Отже, у результаті оптимізованої методики, виділено ДНК із кісток коня плейстоценового періоду (близько 10 тис. р. до нашої ери), зуба дикого коня тарпана (4,5 тис. р. до н. е.) та давнього свійського коня (2-3 тис. р. до н. е.), а також підібрано оптимальні умови проведення ПЛР для роботи з ДНК, що була отримана із викопних решток, для вивчення поліморфізму за ISSR-маркерами та отримано електрофореграми продуктів ампліфікації.

**Генофондний профіль фрагментів ISSR-PCR маркерів, одержаних із викопних кісток плейстоценового коня, тарпана і давнього свійського коня.** Згідно принципу популяційних систем, генетичне різноманіття сучасних популяцій відповідає деякій предковій «прапопуляції», генофонд якої можна умовно назвати «протогенофондом». Спектр продуктів ампліфікації ДНК плейстоценового коня, справжнього тарпана і давнього свійського коня, одержаних за допомогою праймерів (GA)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>8</sub>CA, (AG)<sub>8</sub>CG, (GA)<sub>6</sub>CC, (ACC)<sub>6</sub>G, (GAG)<sub>6</sub>C та (CTC)<sub>6</sub>C, показав такі результати: у плейстоценового коня-8 локусів (300-680 пн), справжнього тарпан-4 локуси (440-1050пн), давній свійський кінь-5локусів (300-1050 пн). Найбільш інформативним праймером виявився праймер(GA)<sub>6</sub>CC. Послідовність праймера (AG)<sub>8</sub>CG виявилася неінформативною для ДНК

плейстоценового коня, а спектру продуктів ампліфікації у випадку з палеонтологічними рештками коней за праймером (GA)<sub>6</sub>CC взагалі не виявлено.

**Диференціація генофондів різних видів коней із використання ISSR-маркерів.** Одержані спектри продуктів ампліфікації ДНК порід коней гуцульської, коника польського, арабської та спектри продуктів ампліфікації ДНК давніх коней: плейстоценового коня, справжнього тарпана і давнього свійського коня на 97% за універсальною шкалою розмірності ISSR –фрагментів в п. н. належали до «легких» (A-25 – A-35) та «середніх» (A-13 – A-25), що можна віднести до специфічної характеристики виду Кінь дикий (*Eferus*). Найменша кількість локусів ДНК (26), одержаних за допомогою 8 праймерів (GA)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>8</sub>CA, (AG)<sub>8</sub>CG, (GA)<sub>6</sub>CC, (ACC)<sub>6</sub>G, (GAG)<sub>6</sub>C та (CTC)<sub>6</sub>C, частота яких у досліджуваних тварин дорівнювала 1,000, була у гуцульських коней. Кількість локусів ДНК, одержаних за цими ж праймерами, у коней порід коник польський та арабська і спектри продуктів ампліфікації справжнього тарпана і давнього свійського дорівнювала 40-47, а в плейстоценового коня – 34 фрагменти. Ці дані підтверджують найвище генетичне різноманіття, притаманне коням гуцульської породи, порівняно з іншими дослідженими кінями.

Фрагменти розміром 380-400 п. н. та 500-520 пн були присутні у спектрах продуктів ампліфікації всіх досліджених представників виду Кінь дикий (*E ferus*), не менше як за 4 праймерами. Отже, ці фрагменти є породоспецифічними спектрами ПЛР-продуктів досліджених порід та давніх коней, одержаних методом ISSR-PCR .

Локуси розміром 600-630 пн проявилися у всіх досліджуваних зразках продуктів ампліфікації (відсутні у коней арабської породи) не менше як за 3 праймерами, що можна вважати видоспецифічними для виду *E. ferus*.

У результаті проведеної роботи встановлено, амплікони молекули ДНК розміром 340-350 п. н. праймера (GA)<sub>9</sub>C та 470-490 п. н. праймерів (GA)<sub>9</sub>C і (GA)<sub>6</sub>CC визначено лише у плейстоценового коня, справжнього тарпана і давнього свійського коня.

Для відображення генетичних зв'язків між дослідженими кінями та древніми еквідами, розраховували попарні генетичні відстані (Nei, 1978), на основі наявності ампліконів ДНК відповідної довжини (пн) за кожним маркером: (GA)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>8</sub>CA, (AG)<sub>8</sub>CG, (GA)<sub>6</sub>CC та (ACC)<sub>6</sub>G, одержаних методом ISSR-PCR. У табл.25 наведений приклад відображення генетичних зв'язків між дослідженими сучасними кінями та древніми еквідами на основі даних за (GA)<sub>9</sub>C-маркером.



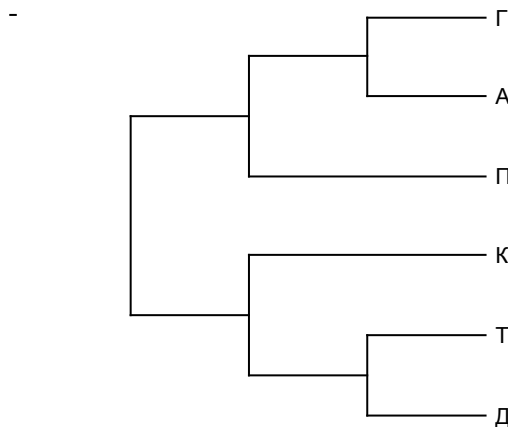
Таблиця 25

**Генетичні відстані (Nei, 1978) між кіньми порід гуцульської, арабської, коника польського та викопними рештками плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня на основі даних за (GA)<sub>9</sub>C-маркером**

| Вид / порода          | Гуцульська | Коник польський | Арабська | Плейстоце новий кінь | Справжній тарпан | Давній св. кінь |
|-----------------------|------------|-----------------|----------|----------------------|------------------|-----------------|
| Гуцульська            | ***        |                 |          |                      |                  |                 |
| Коник польський       | 0,1191     | ***             |          |                      |                  |                 |
| Арабська              | 0,0955     | 0,1765          | ****     |                      |                  |                 |
| Плейстоценовий кінь   | 0,0687     | 0,1591          | 0,1401   | ***                  |                  |                 |
| Справжній тарпан      | 0,3256     | 0,2464          | 0,1591   | 0,2211               | ***              |                 |
| Давній свійський кінь | 0,2730     | 0,1819          | 0,1191   | 0,1077               | 0,0459           | ***             |

У результаті проведених досліджень спостерігали, що найбільш близькі генетичні зв'язки за (GA)<sub>9</sub>C праймером виявлені між викопними кістками древніх коней – справжній тарпан та давній свійський кінь  $D_N=0,0459$ ; кіньми гуцульської породи та викопними рештками плейстоценового коня  $D_N=0,0688$ ; кіньми гуцульської та арабської порід  $D_N=0,0955$ . Найбільшу генетичну відстань за праймера (GA)<sub>9</sub>C встановлено між гуцульськими кіньми та справжнім тарпаном  $D_N=0,3256$ ; кіньми гуцульської породи та давнім свійським конем  $D_N=0,2730$ .

З отриманих даних побудована дендрограма, яка відображає генетичні зв'язки протестованих коней та древніх еквід на основі розподілу довжин фрагментів (пн), фланкованих інвертованими повторами (GA)<sub>9</sub>C (рис. 17).



**Рис. 17. Дендрограма філогенетичних зв'язків, на основі генетичних дистанцій протестованих коней та спектрів молекули ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня за праймером (GA)<sub>9</sub>C. Г- гуцульські коні; П- плейстоценовий кінь; А – коні арабської породи; К– коні породи коник польський; Т – справжній тарпан; Д – давній свійський кінь**

На дендрограмі (Рис.17) виділилися два кластери. Перший кластер складався з двох підкластерів і відображав генетичний зв'язок між кінями гуцульської, арабської порід та плейстоценовим конем. Другий кластер відобразив генетичні дистанції між ампліконами ДНК справжнього тарпана, давнього свійського коня та коней породи коник польський.

За результатами проведених досліджень визначено усереднені відстані даних ISSR-PCR маркерів  $(GA)_9C$ ,  $(AG)_9C$ ,  $(AG)_8CA$ ,  $(AG)_8CG$ ,  $(GA)_6CC$  та  $(ACC)_6G$  для різних дослідних об'єктів (табл. 26).

За результатами розрахунків встановлено, що при попарному порівнянні генетичних відстаней протестованих сучасних коней та древніх еквід найбільш близькими один до одного виявилися справжній тарпан та давній свійський кінь  $D_N = 0,0234$ ; плейстоценовий кінь і давній свійський кінь  $D_N = 0,0385$ . При попарному порівнянні генетичних відстаней, найбільш віддаленими між собою виявилися коні гуцульської та арабської порід  $D_N = 0,5334$ ; гуцульської породи та коник польський  $D_N = 0,4477$ ; кінь гуцульської породи та справжній тарпан  $D_N = 0,5057$ .

Таблиця 26

**Генетичні відстані (Nei, 1978) між кіньми гуцульської, арабської, коника польського порід та давними кіньми: плейстоценовим конем, справжнім тарпаном, давнім свійським конем за використанням методу усереднених відстаней на основі даних ISSR-аналізу**

| Вид / порода          | Гуцульська    | Коник польський | Арабська      | Плейстоце новий кінь | Справжній тарпан | Давній св. кінь |
|-----------------------|---------------|-----------------|---------------|----------------------|------------------|-----------------|
| Гуцульська            | ***           |                 |               |                      |                  |                 |
| Коник польський       | 0,4477±0,2670 | ***             |               |                      |                  |                 |
| Арабська              | 0,5334±0,2580 | 0,2884±0,0460   | ***           |                      |                  |                 |
| Плейстоце новий кінь  | 0,2623±0,2160 | 0,0826±0,0160   | 0,0768±0,0130 | ***                  |                  |                 |
| Справжній тарпан      | 0,5057±0,2180 | 0,0980±0,0540   | 0,0682±0,0190 | 0,0720±0,0350        | ***              |                 |
| Давній свійський кінь | 0,2991±0,2180 | 0,2762±0,0530   | 0,1406±0,0840 | 0,0385±0,0140        | 0,0234±0,0080    | ***             |

## ВИСНОВКИ

1. Науково обґрунтовано концепцію комплексного застосування молекулярно-генетичних і цитогенетичних методів у системі аналізу впливу генотипових та паратипових факторів на формування генетичної структури популяцій аборигенних порід сільськогосподарських тварин, що надає можливість проведення їх популяційно-генетичної оцінки, встановленню філогенетичних зв'язків та різних етапів їх формування у межах програми збереження їх генофондів.

2. Показники соматичного мутагенезу великої рогатої худоби аборигенних порід мають широкі внутривидові межі, що зумовлено адаптогенними властивостями порід. У тварин аборигенних порід відсоток кількісних порушень хромосом знаходився у таких межах: анеуплоїдія 1,2 % (сіра українська) – 8,2 % (червона польська), поліплоїдія – 0,9 % (сіра українська), асинхронне розходження центромірних районів хромосом – 0,6 (сіра українська) – 2,0 % (білоголова українська), структурні порушення хромосом, хромосомні розриви – 0,76 % (бура карпатська) – 5,1 % (червона польська), частота тварин-носіїв робертсонівської транслокації 1;29 – 3,3 % (сіра українська), частка клітин з мікроядрами коливалася в межах 1,1 ‰ (сіра українська) – 5,0 ‰ (білоголова українська), частка двоядерних лімфоцитів 1,5 % (сіра українська) – 6,4 ‰ (білоголова українська) та швидкість поділу клітин становила 2,5 ‰ (червона польська) – 4,8 ‰ (бура карпатська).

3. Встановлено, що інфікованість корів червоної польської породи збудником туберкульозу призводить до збільшення частоти метафаз із анеуплоїдією ( $p < 0,001$ ) у 3 рази; із розривами хромосом ( $p < 0,001$ ) – у 2,2 рази; до підвищення частки апоптозних клітин (8,8‰) – у 4 рази.

4. Доведено, що наявність сірководню у воді призводить до підвищення рівня двоядерних лімфоцитів до 7,8 ‰ ( $p < 0,001$ ) у корів української червоно-рябої молочної породи та до 2,4‰ у корів червоної польської породи. Відмінності у рівні цього показнику свідчать про знижену чутливість корів червоної польської породи до дії мутагенного чинника.

5. Розроблено систему оцінки рівня генетичного поліморфізму популяцій коней гуцульської, арабської породи та коника польського за маркерами  $(GA)_9C$ ,  $(AG)_9C$ ,  $(AG)_8CA$ ,  $(AG)_8CG$ ,  $(GA)_6CC$ ,  $(ACC)_6G$ ,  $(GAG)_6C$  та  $(CTC)_6C$  для підтвердження унікальності і консолідованості популяцій в якості основи для включення їх в національні програми зі збереження біоресурсів.

6. Розроблено систему оцінювання генетичної структури популяцій коней гуцульської породи та коника польського за молекулярно-генетичними та цитогенетичними маркерами, яка передбачає виявлення тварин зі стабільними цитогенетичними показниками соматичного мутагенезу (анеуплоїдія, наявність мікроядер) та встановлення рівня генетичного поліморфізму за використання комплексу маркерів  $(GA)_9C$ ,  $(AG)_9C$ ,  $(AG)_8CA$ ,  $(AG)_8CG$ ,  $(GA)_6CC$ ,  $(ACC)_6G$ ,  $(GAG)_6C$  та  $(CTC)_6C$ , що дає змогу визначити ступінь консолідованості досліджуваних популяцій, ефективність та наслідки селекційних заходів.

7. За результатами оцінки стану генофондів популяцій коней гуцульської, арабської породи та коника польського за використання ISSR-маркерів встановлений найвищий рівень генетичного різноманіття коней гуцульської породи. Найбільшу частку поліморфних локусів (0,494) виявлено у коней гуцульської породи, найменшу (0,1720) – у коней арабської породи; найвище середнє на локус генне різноманіття (0,603) – у коней гуцульської породи, найнижче (0,387) – у коней породи коник польський; найбільші показники алельного різноманіття  $H'$  (0,311) та середнього числа поліморфних локусів  $\mu$  (25,97) – у коней гуцульської породи, найменші  $H'$  (0,116) та  $\mu$  (3,99) – у коней арабської породи.

8. За результатами моніторингу внутрішньопородної та міжпородної мінливості популяцій аборигенних, малочисельних та давніх порід коней за використання ISSR-маркерів встановлено наявність породоспецифічних патернів (фрагменти ДНК, частота яких перевищує 0,4) за маркерами  $(GA)_9C$ ,  $(AG)_9C$ ,  $(AG)_8CA$ ,  $(AG)_8CG$ ,  $(GA)_6CC$ ,  $(ACC)_6G$ ,  $(GAG)_6C$  та  $(CTC)_6C$ . Найбільші міжпородні відмінності спостерігаються за використання праймеру  $(GA)_6CC$  і знаходяться в межах від 1 до 9 локусів. Кількість унікальних ДНК-фрагментів для коней гуцульської породи становить 6, для коней породи коник польський – 7 та для коней арабської породи – 9.

9. За результатами ISSR-аналізу встановлені видоспецифічні спектри продуктів ампліфікації для підроду *Equus* (380–400, 500–520 та 600–630 пн): фрагменти розміром 380–400 та 500–520 пн присутні у спектрах всіх представників виду *E. Ferus* за 4 праймерами, локуси розміром 600–630 пн виявлено за 3 праймерами, що свідчить про консервативність та стабільність каріотипу досліджених порід коней.

10. Оптимізовано методику виділення ДНК та підібрано оптимальні умови проведення ПЛР, отриманих із викопних решток: (коня плейстоценового періоду (близько 10 тис. р. до нашої ери), зуба дикого коня тарпана (4,5 тис. р. до н. е.), давнього свійського коня (2-3 тис. р. до н. е.) за ISSR-маркерами. Виявлено унікальні поліморфні ДНК-локуси древніх еквід. Наявність ампліконів розміром 340-350 пн за праймером  $(GA)_9C$  та 470–490 пн за праймерами  $(GA)_9C$  і  $(GA)_6CC$  визначено лише для давніх коней (плейстоценовий кінь, справжній тарпан та давній свійський кінь).

11. За використання методу усереднених відстаней за результатами ISSR-аналізу визначено генетичні відстані між сучасними кінями та древніми еквідами. Доведено, що найбільш близькими один до одного є коні справжнього тарпана та давнього свійського коня ( $D_N=0,0234$ ), а також плейстоценового і давнього свійського коня ( $D_N=0,0385$ ). Найбільш віддаленими між собою виявилися коні гуцульської та арабської порід ( $D_N=0,5334$ ), гуцульської породи та коника польського ( $D_N=0,4477$ ), коні гуцульської породи та справжнього тарпана ( $D_N=0,5057$ ).

## РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Використовувати комплекс молекулярно-цитогенетичних методів оцінки пластичної здатності генофондів аборигенних порід сільськогосподарських тварин відповідно до практичної реалізації базових засад програм збереження їх біологічної різноманітності.
2. Для організації контролю внутрішньопопуляційних генетичних процесів проводити оцінку консолідації аборигенних порід за поліморфізмом генетичних маркерів.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

#### Публікації у наукових фахових виданнях України

1. Стародуб Л. Ф., Остаповець Л.І. Прояв соматичної хромосомної мінливості у корів порід української чорно-рябої молочної та абердин-ангус. *Біологія тварин*. Львів, 2012. С. 491-497. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).
2. Стародуб Л.Ф. Порівняльна оцінка рівня генетичного вантажу в геномі великої рогатої худоби окремих племгосподарств України. *Таврійський науковий вісник*, випуск 78 ч. 2(1). Херсон, 2012. С. 184-189. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).
3. Стародуб Л. Ф. Цитогенетичні дослідження в скотарстві України: досягнення і перспективи. Розведення і генетика тварин, випуск 46. К.: 2012. С. 257- 260. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).
4. Цитогенетичний контроль великої рогатої худоби червоної польської породи. [електронний ресурс]. / Л.Ф. Стародуб; Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України, 2013. 5 (41).URL: <http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd.2013.5.9.pdf>. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).
5. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Стародуб Л. Ф., Безденежних Н. О. Мезенхімальні стовбурові клітини пупкового канатика лоша на ранніх пасажах культивування in vitro. *Тваринництво України*. 2014. № 12. С. 36 – 40. (Особистий внесок – брала участь в отриманні метафазних пластинок із мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика лоша, аналізувала цитогенетичні препарати, в статті описувала мінливість каріотипу цих клітин).
6. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Стародуб Л. Ф., Безденежних Н. О. Імунофенотипова характеристика та цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика лоша на ранніх пасажах культивування in vitro. *Науковий вісник національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2014. № 179. С. 50-53. (Особистий внесок – брала участь в отриманні метафазних пластинок із мезенхімальних стовбурових клітин)

пупкового канатика лошат, аналізувала цитогенетичні препарати, в статті описувала мінливість каріотипу цих клітин).

7. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Безденежних Н. О., Стародуб Л. Ф., Імунофенотипова характеристика та цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня на ранніх пасажах культивування *invitro*. *Науковий вісник національного університету біоресурсів і природокористування України* 2014. № 201, частина 1. С. 100 – 107. (Особистий внесок – брала участь в отриманні метафазних пластинок із мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня, аналізувала цитогенетичні препарати, в статті описувала мінливість каріотипу цих клітин).

8. Стародуб Л.Ф. Вплив екзогенних факторів на стабільність каріотипу великої рогатої худоби. *Розведення і генетика тварин*. К.: 2015. № 50. С. 167-173

9. Стародуб Л. Ф. Характеристика каріотипу великої рогатої худоби сірої української породи. *Вісник аграрної науки*. К. 2016. № 9. С. 48- 51.

(Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

10. Стародуб Л.Ф. Стабільність каріотипу корів червоної польської породи до дії паратипових чинників. *Розведення і генетика тварин*. К., 2017. № 54. С.140-146. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

11. Стародуб Л., Фурса Н. Вікова мінливість каріотипу корів сірої української породи. *Розведення і генетика тварин*. К., 2018. № 55. С. 243-246. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

12. Стародуб Л.Ф., Каплінський В.В., Біляк М.В. Особливості каріотипу нащадків диких коней –тарпанів Яворівського національного природного парку, складової частини Міжнародного біосферного резервату «Розточчя» під егідою ЮНЕСКО. *Біологія тварин*. 2019. Том №1, С. 65-72. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

13. Стародуб Л., Стефурак Ю., Стефурак І., Зеленчук І., Зеленчук Я., Войціцький Р. Гуцульська порода коней – аборигенна порода українських Карпат *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького*. Серія: Сільськогосподарські науки. 2020. т. 22, № 92. С. 119-124. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

14. Стародуб Л.Ф., Рєзнікова Н. Л., Височанський Й. С. Каріотипова мінливість корів бурої карпатської породи. *Розведення і генетика тварин*. Чубинське: 2021. № 61.С. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

15. Мохначова Н., Стародуб Л., Добрянська М. Оптимізація методу виділення ДНК з викопних решток. *Розведення і генетика тварин*. К., 2020. Випуск 60. С. 110-115. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури,

одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

**Публікації у виданнях іноземних держав або у виданнях України, які включено до міжнародних наукометричних баз**

16. Джус П. П., Стародуб Л. Ф., Куриленко Ю.Ф., Костенко С. А. Изменчивость цитогенетических показателей соматического мутагенеза разных пород лошадей. Аграрни науки. Аграрен университет. Пловдив, 2013. С.31-35.

(Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

17. Mazurkevych A., Malyuk M., Starodub L., Kharkevych Y., Brusko E., Gryzinska M., Jakubczak A. Immunophenotypic characterisation and cytogenetic analysis of mesenchymal stem cells from equine bone marrow and foal umbilical cords during in vitro culture . *Journal of Veterinary Research*. 2016.Vol. 60, № 3. P. 339-347. DOI: 10.1515/jvetres-2016-0051.

(Особистий внесок – брала участь в отриманні метафазних пластинок із мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня, аналізувала цитогенетичні препарати, в статті описувала мінливість каріотипу цих клітин. Відпрацювання методології встановлення мінливості каріотипу коня при дослідження стовбурових клітин та лімфоцитів периферійної крові).

18. Mazurkevych A., Malyuk M., Bezdienieznykh N., Starodub L., Kharkevych Y., Jakubczak, A., Gryzinska, M. Immunophenotypic characteristics and karyotype analysis of bone marrow – derived mesenchymal stem cells of rabbits during in vitro cultivation. *Polish journal of veterinary sciences* . 2017. №4. P. 687 -695. DOI: 10.1515/pjvs – 2017 –0086.

(Особистий внесок – брала участь в отриманні метафазних пластинок із мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня, аналізувала цитогенетичні препарати, в статті описувала мінливість каріотипу цих клітин. Відпрацювання методології встановлення мінливості каріотипу коня при дослідженні стовбурових клітин та лімфоцитів периферійної крові).

19. Копылов К., Стародуб Л., Мохначева Н., Супрович Н. Особенности изменчивости генома крупного рогатого скота серой украинской породы по цити- и ДНК- маркерам. Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. Горки БГСХА. 2019. Сборник научных трудов. Вып. 22 (1). С. 60-69. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

20. Starodub L. Features of the karyotype of the Ukrainian aboriginal Hutsul breed of horses. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук*. 2021. Т. 59. №2. С. 215–219. [doi.org/10.29235/1817-7204-2021-59-2-215-219](https://doi.org/10.29235/1817-7204-2021-59-2-215-219). (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

**Наукові праці апробаційного характеру**

21. Костенко С., Джус П., Стародуб Л., Куриленко Ю., Федорова Е. Соматический мутагенез сельскохозяйственных животных в разных



радиоэкологических условиях содержания. Малые дозы. Материалы международной научной конференции, посвященной 25-летию Института радиобиологии. 26-28 сентября 2012 г. Гомель. С.66-68.

22. Стародуб Л., Біляк М., Любинець І. Генетичні особливості тарпановидних коней породи коник польський у порівнянні з древніми еквідами. *Актуальні питання використання та збереження природних ресурсів прикордонних територій України і Польщі: Міжнародна наук.-практ. конф. (50-річчю з часу створення Західного наукового центру присвячується)* 11 травня 2021 р. Львів. С. 62-64.

#### **Додатково відображають наукові результати дисертації**

23. Копилов К. В., Дзіцюк В. В., Стародуб Л. Ф., Мохначова Н. Б. Методика з проведення молекулярно-генетичних досліджень аборигенних та малочисельних порід сільськогосподарських тварин : методичні рекомендації. Чубинське : ІРГТ ім. М.В.Зубця. 2017. 32 с. (Здобувачем отриманоекспериментальні дані та здійснено їх аналіз).

24. Копилов К. В., Бірюкова О. Д., Шельов А. В., Добрянська М. Л., Мохначова Н. Б., Маковська Н. М., Стародуб Л. Ф. Визначення адаптаційної здатності племінних ресурсів молочної худоби та молекулярно-генетичні методи у системі збереження біологічного різноманіття: методичні рекомендації. Чубинське : ІРГТ ім. М.В.Зубця. 2020. 35 с. (Здобувачем отримано експериментальні дані про мінливість каріотипу досліджуваних тварин та здійснено їх аналіз).

#### **АНОТАЦІЯ**

**Стародуб Л.Ф. Генетична мінливість аборигенних порід великої рогатої худоби та коней за різними типами маркерів. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика. – Інститут розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН, с. Чубинське Київської обл. 2021.

У дисертаційній роботі розкрито мінливість геному аборигенних порід великої рогатої худоби (білоголової української, червоної польської, бурої карпатської, сірої української) та коней (гуцульської породи, породи коник польський) за цитогенетичними та молекулярно-генетичними полілокусними маркерами, здійснено обґрунтування необхідності інтеграції локальних порід у сучасну систему аграрного виробництва відповідно до вимог FAO. Встановлено, що показники соматичного мутагенезу великої рогатої худоби аборигенних порід мають широкі внутривидові межі, що зумовлено їх адаптогенними властивостями.

З'ясовано, що інфікованість корів червоної польської породи збудником туберкульозу викликає збільшення частоти метафаз із анеуплоїдією ( $p < 0,001$ ) у 3 рази, хромосомних розривів ( $p < 0,001$ ) у 2,2 рази, кількість двоядерних лімфоцитів (5,0%) та лімфоцитів із мікроядром у 2 і 2,2 рази, відповідно, та апоптозних клітин (8,8%) у 4 рази.

Визначено, що паратиповий чинник, сірководень у воді, викликає підвищений рівень двоядерних лімфоцитів (7,8 %), ( $p < 0,001$ ) у корів української червоно-рябої молочної породи, тоді як у корів червоної польської породи він становить 2,4%, що

свідчить про знижену чутливість корів червоної польської породи до цього мутагенного чинника.

Розроблено систему оцінювання генетичного поліморфізму популяцій коней порід гуцульської, породи коник польський та арабської за маркерами  $(GA)_9C$ ,  $(AG)_9C$ ,  $(AG)_8CA$ ,  $(AG)_8CG$ ,  $(GA)_6CC$ ,  $(ACC)_6G$ ,  $(GAG)_6C$  та  $(CTC)_6C$  для підтвердження унікальності і консолідованості популяцій тварин цих порід як основу для включення їх в національні програми зі збереження біоресурсів. За результатами оцінки стану генофондів популяцій коней гуцульської, арабської породи та коника польського за використання ISSR-маркерів встановлений найвищий рівень генетичного різноманіття коней гуцульської породи. За результатами ISSR-PCR аналізу знайдено видоспецифічні спектри продуктів ампліфікації, для підроду *Equus* (380–400, 500–520 та 600–630 пн).

Здійснена оптимізація методу виділення ДНК з викопних решток кісток давніх коней та підібрано оптимальні умови проведення ПЛР для роботи з ДНК, що була отримана із викопних решток. Згідно проведеного ISSR-аналізу, знайдено унікальні поліморфні ДНК-локуси древніх еквід. Амплікони молекули ДНК розміром 340–350 пн праймера  $(GA)_9C$  та 470–490 пн праймера  $(GA)_9C$  і  $(GA)_6CC$  визначено лише у давніх коней: плейстоценового коня, справжнього тарпана та давнього свійського коня.

За використанням методу усереднених відстаней за результатами ISSR-аналізу встановлені генетичні відстані між сучасними кіньми та древніми еквідами. Доведено, що найбільш близькими один до одного із досліджених коней, є коні справжнього тарпана та давнього свійського коня ( $D_N=0,0234$ ), а також плейстоценового і давнього свійського коня ( $D_N=0,0385$ ). Найбільш віддаленими між собою виявилися коні гуцульської та арабської порід ( $D_N=0,5334$ ), гуцульської породи та коника польського ( $D_N=0,4477$ ), коні гуцульської породи та справжнього тарпана ( $D_N=0,5057$ ).

**Ключові слова:** цитогенетичний контроль, мінливість каріотипу, ISSR-PCR маркери, ДНК-локуси, генетичні відстані, аборигенні породи сільськогосподарських тварин, древні еквіди.

## АННОТАЦИЯ

**Стародуб Л.Ф. Генетическая изменчивость аборигенных пород крупного рогатого скота и лошадей по разным типам маркеров. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.15–генетика. – Институт разведения и генетики животных имени М.В. Зубца НААН, с. Чубинское Киевской обл. 2021.

У диссертационной работе раскрыто изменчивость генома аборигенных пород крупного рогатого скота (белоголовой украинской, красной польской, бурой карпатской, серой украинской) и лошадей (гуцульской породы, породы коник польский) по цитогенетическими и молекулярно-генетическими полилокусными маркерами, осуществлено обоснование необходимости интеграции локальных пород в современную систему аграрного производства в соответствии с требованиями FAO. Установлено, что показатели соматического

мутагенеза крупного рогатого скота аборигенных пород имеют широкие внутривидовые границы, обусловленные их адаптогенными свойствами.

Установлено, что инфицированность коров красной польской породы возбудителем туберкулеза вызывает увеличение частоты метафаз с анеуплоидией ( $p < 0,001$ ) в 3 раза, хромосомных разрывов ( $p < 0,001$ ) в 2,2 раза, количество двухъядерных лимфоцитов (5,0 %) и лимфоцитов с микроядром в 2 и 2,2 раза, соответственно, и апоптозных клеток (8,8 %) в 4 раза.

Определено, что паратипических фактор, сероводород в воде, вызывает повышенный уровень двухъядерных лимфоцитов (7,8 %), ( $p < 0,001$ ) у коров украинской красно-пестрой молочной породы, тогда как у коров красной польской породы он составляет 2,4 %, что свидетельствует о пониженной чувствительности коров красной польской породы к этому мутагенному фактору.

Разработана система оценки генетического полиморфизма популяций лошадей пород гуцульской, породы коник польский и арабской за маркерами  $(GA)_9C$ ,  $(AG)_9C$ ,  $(AG)_8CA$ ,  $(AG)_8CG$ ,  $(GA)_6CC$ ,  $(ACC)_6G$ ,  $(GAG)_6C$  и  $(CTC)_6C$  для подтверждения уникальности и консолидации популяций животных этих пород как основу для включения их в национальные программы по сохранению биоресурсов. По результатам оценки состояния генофондов популяций лошадей гуцульской, арабской породы и коника польского за использование ISSR-маркеров установлен высокий уровень генетического разнообразия лошадей гуцульской породы. По результатам ISSR-PCR анализа выявлены видоспецифические спектры продуктов амплификации, для подрода *Equus* (380–400, 500–520 и 600–630 пн).

Осуществлена оптимизация метода выделения ДНК из ископаемых остатков костей древних лошадей и подобраны оптимальные условия проведения ПЦР для работы с ДНК, которая полученная из ископаемых останков. Согласно проведенного ISSR-анализа, найдены уникальные полиморфные ДНК-локусы древних эквид. Ампликоны ДНК размером 340–350 пн праймера  $(GA)_9C$  и 470–490 пн праймера  $(GA)_9C$  и  $(GA)_6CC$  определено только в древних лошадей: плейстоценовой лошади, настоящего тарпана и давней домашней лошади.

За использованием метода усредненных расстояний по результатам ISSR-анализа установлены генетические расстояния между современными лошадьми и древними эквидами. Доказано, что наиболее близкими друг к другу из исследованных лошадей есть лошади настоящего тарпана и древней домашней лошади ( $DN=0,0234$ ), а также плейстоценовой и древней домашней лошади ( $DN=0,0385$ ). Наиболее удаленными между собой оказались лошади гуцульской и арабской пород ( $DN=0,5334$ ), гуцульской породы и коника польского ( $DN=0,4477$ ), лошади гуцульской породы и настоящего тарпана ( $DN=0,5057$ ).

**Ключевые слова:** цитогенетический контроль, изменчивость кариотипа, ISSR-PCR маркеры, ДНК-локусы, генетические расстояния, аборигенные породы сельскохозяйственных животных, древние эквиды.

## ABSTRACT

**Starodub L.F. Genetic variability of aboriginal breeds of cattle and horses by different types of markers. On the rights of the manuscript.**

The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of agricultural sciences on a specialty 03.00.15 - genetics. – Institute of Animal Breeding and Genetics. M.V. Zubtsya NAAS, v. Chubynske, Kyiv region 2021.

The dissertation reveals the variability of the genome of aboriginal breeds of cattle (white-headed Ukrainian, red Polish, brown Carpathian, gray Ukrainian) and horses (Hutsul breed, Polish konik breed) by cytogenetic and molecular-genetic polylocus markers, the need for integration modern system of agricultural production in accordance with FAO requirements. It is established that the indicators of somatic mutagenesis of aboriginal cattle have wide intraspecific limits due to their adaptation to genetic properties.

It was found that in infection of red Polish cows with the causative agent of tuberculosis causes an increase in the frequency of metaphases with aneuploidy ( $p < 0.001$ ) in 3 times, chromosomal breaks ( $p < 0.001$ ) in 2.2 times, the number of dinuclear lymphocytes (5.0 %) and lymphocytes with micronucleus 2 and 2.2 times, respectively, and apoptotic cells (8.8 %) 4 times.

It was determined that the paratyphic factor, hydrogen sulfide in water, causes an increased level of dinuclear lymphocytes (7.8 %), ( $p < 0.001$ ) in cows of Ukrainian red-spotted dairy breed, while in cows of red Polish breed it is 2.4 %, indicating a reduced sensitivity of red Polish cows to this mutagenic factor.

A system for estimating the genetic polymorphism of Hutsul, Polish konik and Arabian horses populations using markers (GA)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>8</sub>CA, (AG)<sub>8</sub>CG, (GA)<sub>6</sub>CC, (ACC)<sub>6</sub>G, (GAG)<sub>6</sub>C and (GA)<sub>6</sub>CC has been developed to confirm the uniqueness and consolidation of animal populations of the subbreeds as a basis for their inclusion in national bioresource conservation programs. According to the results of the assessment of the gene pool of the populations of Hutsul, Arabian horses and Polish konik breed using ISSR-markers, the highest level of genetic diversity of Hutsul horses. According to the results of ISSR-PCR analysis, species-specific spectra of amplification products were found for the subgenus *Equus* (380-400, 500-520 and 600-630 bp).

The method of DNA isolation from fossil remains of ancient horse bones was optimized and the optimal conditions for PCR to work with DNA obtained from fossil remains were selected. According to the ISSR analysis, unique polymorphic DNA loci of ancient equids were found. Amplicons of the DNA molecule with a size of 340-350 bp of primer (GA)<sub>9</sub>C and 470-490 bp of primer (GA)<sub>9</sub>C and (GA)<sub>6</sub>CC were identified on ancient horses: Pleistocene horse, real tarpan and ancient domestic horse.

Using the method of averaged distances, the results of ISSR-analyses established the genetic distances between modern horses and ancient equids. It is proved that the closest to the root the studied horses are the horses of the real tarpan and the ancient

domestic horse (DN=0.0234), as well as the Pleistocene and ancient domestic horse (DN=0.0385). The most distant horses were Hutsul and Arabian breeds (DN=0.5334), Hutsul breed and Polish konik (DN=0.4477), Hutsul horses and real tarpan (DN =0.5057).

Keywords: cytogenetic control, karyotype variability, ISSR-PCR markers, DNA loci, genetic distances, aboriginal breeds of farm animals, ancient equids.