

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

СТАРОДУБ ЛЮБОВ ФЕОФІЛІВНА

УДК 636.2.033 /.034:575

ДИСЕРТАЦІЯ

**Генетична мінливість аборигенних порід великої рогатої худоби та
коней за різними типами маркерів**

03.00.15 – генетика

Подається на здобуття наукового ступеня доктора
сільськогосподарських наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Л.Ф. Стародуб

Науковий консультант: Копилов Кирило Вячеславович, доктор
сільськогосподарських наук, професор

с. Чубинське – 2021

АНОТАЦІЯ

Стародуб Л.Ф. Генетична мінливість аборигенних порід великої рогатої худоби та коней за різними типами маркерів

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 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.

Мета роботи – теоретично обґрунтувати та розробити методичні підходи комплексного застосування молекулярно-генетичного і цитогенетичного методів в системі аналізу впливу різних факторів на формування генофондів аборигенних порід свійських тварин.

Загальні показники соматичного мутагенезу великої рогатої худоби аборигенних порід мають широкі внутрішньовидові межі, що викликано їх адаптогенними властивостями. Дослідження мінливості каріотипу білоголової української породи молочного напрямку продуктивності, яка відноситься до малочисельної зникаючої породи, що перебуває в стані ризику, виявило кількісні та структурні порушення хромосом. Кількісні порушення хромосом, анеуплоїдія, у корів двох груп згідно призначення корови (селекційне ядро та виробнича група) становили 6,0% та 7,0% відповідно. Середня величина метафазних пластинок із асинхронним розходженням центромірних районів хромосом становила 1,0%. Частота структурних порушень хромосом (хромосомні розриви) у тварин двох груп

дорівнювала 2,3% та 2,0% відповідно, що відповідає нормі. Це підтверджує, що формування в замкнених популяціях здійснювалося за рандомізованою вибіркою. Порівняльний аналіз каріотипової мінливості корів білоголової української та української чорно-рябої молочної порід господарства ТОВ «Подільський господар» показав різницю величини метафазних пластинок із анеуплоїдією. У корів білоголової української породи величина цієї мінливості становила 7,0%, а в української чорно-рябої молочної – 13,3% при $P > 0,99$. Статистично вірогідної різниці за іншими показниками хромосомної мінливості у досліджуваних тварин двох порід господарства ТОВ «Подільський господар» виявлено не було.

З метою дослідження стабільності каріотипу корів червоної польської породи господарства ПрАТ «Мшанецьке», здійснено порівняльний аналіз цитогенетичної мінливості корів української червоно-рябої молочної породи цього ж господарства. Анеуплоїдія, у корів червоної польської породи становила 8,2 %, а у тварин української червоно-рябої молочної породи – 6,1 % за невірогідної різниці середніх величин. Межа структурних порушень (хромосомні розриви) становила 3,0 – 5,1 % і відповідала видовим особливостям, характерним для великої рогатої худоби за спонтанного мутагенезу.

Дослідження популяції тварин локальної малочисельної вітчизняної бурої карпатської породи, яка перебуває в стані значного ризику і знаходиться лише у господарствах населення, встановили відсоток структурних порушень (хромосомних розривів) – 0,76 % та відсутність їх у помісних тварин. Кількісні порушення, анеуплоїдія, у корів бурої карпатської породи дорівнювали 1,6 % і були виражені, в основному, гіпоплоїдними клітинами $2n=56-58$. Кратне збільшення хромосом, поліплоїдія, виявлена не була. У помісних тварин анеуплоїдія становила 3,3 %, що вдвічі вище порівняно з чистопородними тваринами ($p < 0,01$).

Аналіз каріотипу сірої української породи проводили у двох господарствах ДПДГ ІТСР «Асканія-Нова» і ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК

НААН. Результати показали, що кількісні порушення хромосом, анеуплоїдія, становила 1,2 - 7,2 %. Кратне збільшення хромосом у тварин господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» було відсутнє, а у тварин господарства ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК НААН становило 0,9 %. Відсоток метафазних пластинок із асинхронним розходження центромірних районів хромосом для корів двох господарств становив 0,6 - 1,8 %, хромосомні розриви 1,5 - 2,6 %. У тварин господарства ДП «ДГ» «Поливанівка» ІЗК НААН Робертсонівська транслокація 1;29 становила 3,3%, від усіх протестованих 30 голів тварин цього господарства.

Проведений однофакторний дисперсійний аналіз встановив високу та достовірну силу впливу (η^2_x) породи великої рогатої худоби на прояв таких цитогенетичних показників як анеуплоїдію, поліплоїдію, хромосомні розриви та робертсонівську транслокацію.

Результати тестування тварин сірої української породи господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» двох вікових груп показали, що у телиць 9 - 16 місяців частка клітин із анеуплоїдією дорівнювала 10,4 %, що 1,5 рази вище за спонтанний рівень (1,5-8,3 %) цієї мінливості. Різниця середніх величин за цією ознакою у телиць віком 9 - 16 місяців та корів віком 2 - 2,5 роки виявилася статистично достовірною ($p < 0,001$). Частка впливу віку (η^2_x) тварин на мінливість їх каріотипу (анеуплоїдію, АРЦРХ, хромосомні розриви) є достовірно значущою ($p < 0,001$).

Вплив паратипового чинника (збудника туберкульозу) на мінливість каріотипу, досліджено на популяції корів червоної польської породи. Встановлено середню величину клітин із анеуплоїдією - 16,3 %, що у 2 рази вище рівня спонтанної хромосомної мінливості за цією ознакою. Середній рівень хромосомних аберацій становив 12,5 %. Проте, у 20 % тварин розмах цієї мінливості становив 16,4-20,2 %. Частка впливу паратипового чинника (збудника туберкульозу) на кількісні порушення хромосом виявилася достовірною і становила 62%. 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, що служить показником генотоксичного впливу на організм тварин.

За впливу паратипового чинника (сірководню у воді) у тварин української червоно-рябої молочної породи встановлено частку двоядерних лімфоцитів (7,8%) у 3 рази вищу порівняно з тваринами червоної польської породи.

У роботі висвітлено і генетичні особливості аборигенних та малочисельних порід коней гуцульської породи та коника польського. Дані ретроспективного аналізу архівних та літературних матеріалів свідчать про те, що розведення та збереження породи гуцульських коней відбувалося на українських землях.

За результатами цитогенетичного аналізу досліджених коней гуцульської породи встановлено, що геномні порушення хромосом представлені анеуплоїдією, середня величина яких становила 10,8%, та поліплоїдними клітинами з середньою частотою 1,4 %. Розмах асинхронного розходження центромірних районів хромосом (2,0 – 6,0 %) при середньому значенні – 3,9 % відповідав спонтанному рівню для коней в цілому.

Відсутність хромосомних розривів у тварин господарства ТзОВ «Край неба» та наявність 1,1% метафазних пластинок із хромосомними розривами у коней Національного природного парку «Гуцульщина», свідчить про стабільність каріотипу цих тварин. Частка лімфоцитів із мікроядром для тварин двох господарств становила 4,0 – 4,2 ‰, кількість двоядерних лімфоцитів – 6,2‰, показник мітотичного індексу – 4,3‰.

Аналіз каріотипу коней породи коник польський виявив підвищення рівня кількісних порушень хромосом (анеуплоїдії – 9,3%), порівняно з рівнем спонтанної хромосомної мінливості. Проведений однофакторний дисперсійний аналіз встановив високу та достовірну силу впливу (η^2_x) породи коней на прояв кількісних порушень хромосом.

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 показниками алельного різноманіття H' (0,311) та середнього числа поліморфних локусів μ (25,97); найменше H' (0,116) і μ (3,99) – у коней арабської породи. Встановлено, що частка рідкісних локусів (h_μ) у коней породи коник польський була відсутня, найвищий показник ($h_\mu = 0,56$) проявився у коней арабської породи та у коней гуцульської породи дорівнював – 0,20. Дослідження спектру фрагментів молекули ДНК за ISSR-PCR маркерами встановило найвище генетичне різноманіття у 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 генетичних відстаней за результатами ISSR-аналізу (Nei, 1978), із протестованих коней найбільш близькими один до одного були коні справжнього тарпана та давнього свійського коня ($D_N = 0,0234$); плейстоценового коня і давнього свійського коня ($D_N = 0,0385$). Найбільш віддаленими між собою виявилися коні гуцульської та арабської порід ($D_N = 0,53340$); 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.

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 require ments.

The purpose of the work is to theoretically substantiate and develop methodological approaches to the integrated application of molecular genetic and cytogenetic methods in the system of analysis of the influence of various factors on the formation of gene pools of aboriginal breeds of domestic animals.

It is established that the indicators of somatic mutagenesis of aboriginal cattl ehav wide intraspecific limits du et othe iradap to genic properties. A study of the variability of the karyotype of the white-headed Ukrainian breed in the dairy direction of productivity, which belongs to the small endangered breed that is at risk, revealed quantitative and structural chromosome abnormalities. Quantitative chromosome abnormalities, aneuploidy, in cows of two groups according to the purpose of the cow (selection nucleus and production group) were 6.0% and 7.0%, respectively. The average value of metaphase plates with asynchronous divergence

of centromeric regions of chromosomes was 1,0%. The frequency of structural chromosome abnormalities (chromosomal breaks) in animals of the two groups was 2.3% and 2.0%, respectively, which is normal. This confirms that the formation in closed populations was carried out by random sampling. A comparative analysis of the karyotype variability of white-headed Ukrainian and Ukrainian black-and-white dairy cows of Podilsky Gospodar LLC showed the difference in the size of metaphase plates with aneuploidy. In white-headed Ukrainian cows, the magnitude of this variability was 7.0%, and in Ukrainian black-spotted dairy – 13.3% ($p < 0,001$). There was no statistically significant difference in other indicators of chromosomal variability in the studied animals of the two breeds of the farm "Podilsky Gospodar".

In order to study the stability of the karyotype of cows of the red Polish breed on the farm of PJSC Mshanetske, a comparative analysis of the cytogenetic variability of cows of the Ukrainian red-spotted dairy breed of the same farm was performed. Aneuploidy, in cows of the red Polish breed was 8.2%, and in animals of the Ukrainian red-spotted dairy breed – 6.1% with an incredible difference in average values. The limit of structural disorders (chromosomal breaks) was 3.0 - 5.1% and corresponded to the species characteristics characteristic of cattle with spontaneous mutagenesis.

Studies of the population of animals of the local small domestic brown Carpathian breed, which is in a state of significant risk and is only in households, found the percentage of structural disorders (chromosomal breaks) - 0.76% and their absence in domestic animals. Quantitative disorders, aneuploidy, in cows of brown Carpathian breed were equal to 1.6% and were expressed mainly by hypoploid cells $2n = 56-58$. Multiple chromosome enlargement, polyploidy, was not detected. In domestic animals, aneuploidy was 3.3%, which is twice as high as in purebred animals ($p < 0,01$).

Analysis of the karyotype of the gray Ukrainian breed was performed in two farms DPDG ITSR "Askania-Nova" and SE "DG" Polyvanivka "IZK NAAS. The results showed that the quantitative chromosome abnormalities, aneuploidy, were

1.2 – 7.2%. The multiple increase of chromosomes in the animals of the farm of the State Enterprise “Askania–Nova” was absent, and in the animals of the farm of the State Enterprise “Polyvanivka” IZK NAAS was 0.9%. The percentage of metaphase plates with asynchronous divergence of the centromeric regions of chromosomes for cows of two farms was 0.6-1.8%, chromosomal breaks 1.5 – 2.6%. In animals of the farm SE "Polyvanivka" IZK NAAS Robertson translocation 1; 29 was 3.3% of all tested 30 heads of animals of this farm.

The performed one-factor analysis of variance established a high and reliable strength of influence (η^2x) of cattle breed on the manifestation of such cytogenetic parameters as aneuploidy, polyploidy, chromosomal breaks and Robertson translocation.

.The results of testing of animals of the gray Ukrainian breed of the farm of the State Enterprise ITG "Askania-Nova" of two age groups showed that in heifers 9-16 months the proportion of cells with aneuploidy was 10.4%, which is 1.5 times higher than the spontaneous level (1 ,5–8.3%) of this variability. The difference between the mean values for this trait in heifers aged 9–16 months and cows aged 2-2.5 years was statistically significant at ($p<0,001$).. The share of the influence of age (η^2x) of animals on the variability of their karyotype (aneuploidy, ARCR, chromosomal breaks) is significant ($p<0,001$).

The influence of paratypic factor (tuberculosis pathogen) on karyotype variability was studied in the population of red Polish cows. The average size of cells with aneuploidy – 16.3%, which is 2 times higher than the level of spontaneous chromosomal variability on this basis. The average level of chromosomal aberrations was 12.5%. However, in 20% of animals the magnitude of this variability was 16.4-20.2%. The share of the influence of the paratypic factor (the causative agent of tuberculosis) on the quantitative chromosome abnormalities was significant and amounted to 62%. For animals of the second group the share of lymphocytes with a micronucleus and the share of dinuclear lymphocytes in 2,2 times and 2,0 times, accordingly, more in comparison with

animals of the first group that serves as an indicator of genotoxic influence on an organism of animals.

Under the influence of the paratypic factor (hydrogen sulfide in water), the proportion of dinuclear lymphocytes (7,8 ‰) in the animals of the Ukrainian red-spotted dairy breed was 3 times higher in comparison with the animals of the red Polish breed.

The paper also highlights the genetic features of aboriginal and small breeds of Hutsul horses and Polish horses. The data of the retrospective analysis of archival and literary materials testify that the breeding and preservation of the Hutsul horse breed took place on Ukrainian lands.

According to the results of cytogenetic analysis of the studied horses of Hutsul breed, it was found that genomic chromosome disorders are represented by aneuploidy, the average value of which was 10,8%, and polyploid cells with an average frequency of 1,4%. The magnitude of the asynchronous divergence of the centromeric regions of the chromosomes (2.0 – 6.0%) with an average value of 3.9% corresponded to the spontaneous level for horses as a whole.

The absence of chromosomal breaks in the animals of Krai Neba LLC and the presence of 1.1% of metaphase plates with chromosomal breaks in horses of the Hutsulshchyna National Nature Park testify to the stability of the karyotype of these animals. The proportion of micronucleus lymphocytes for animals of two farms was 4.0 – 4.2 ‰, the number of dinuclear lymphocytes was 6.2 ‰, the mitotic index was 4.3 ‰.

Analysis of the karyotype of horses of the Polish grasshopper revealed an increase in the level of quantitative chromosome abnormalities (aneuploidy - 9.3%), compared with the level of spontaneous chromosomal variability. The performed one-factor analysis of variance established a high and reliable strength of the influence (η^2x) of the horse breed on the manifestation of quantitative chromosome disorders.

A system for estimating the genetic polymorphism of Hutsul, Polish konik and Arabian horses populations using markers (GA)₉C, (AG)₉C, (AG)₈CA,

(AG)₈CG, (GA)₆CC, (ACC)₆G, (GAG)₆C and (GA)₆CC 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 by indicators of allelic diversity H' (0.311) and the average number of polymorphic loci μ (25.97); the least H' (0.116) and μ (3.99) are in Arabian horses. It was found that the share of rare loci ($h\mu$) in horses of the Polish grasshopper was absent, the highest rate ($h\mu = 0.56$) was observed in horses of Arabian breed and in horses of Hutsul breed was equal to - 0.20. The study of the spectrum of fragments of the DNA molecule by ISSR-PCR markers established the highest genetic diversity in 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)₉C and 470-490 bp of primer (GA)₉C and (GA)₆CC were identified on lyin 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 echo the roof 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.

Список публікацій здобувача

1. Стародуб Л. Ф., Остаповець Л.І. Міжпородна диференція корів порід абердин-ангус і українська-чорно-ряба молочна за рівнем соматичного мутагенезу. *Біологія тварин*. Львів, 2012. Т.14. № 1-2 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*. Херсон, 2012. випуск 78 ч. 2(1). 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*. Київ 2012. Вип. 46. С. 257- 260. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).
4. 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. № 14 С. 31-35. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).
5. Стародуб Л.Ф. Цитогенетичний контроль великої рогатої худоби червоної польської породи. 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).

6. Мазуркевич А. Й. , Малюк М. О., Стародуб Л. Ф., Безденежних Н. О Мезенхімальні стовбурові клітини пупкового канатика лошат 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 лошат, аналізувала цитогенетичні препарати, в статті описувала мінливість каріотипу цих клітин).

7. Мазуркевич А. Й. , Малюк М. О., Стародуб Л. Ф., Безденежних Н. О Імунофенотипова характеристика та цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика лошат 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).

8. Мазуркевич А. Й. , Малюк М. О., Безденежних Н. О, Стародуб Л. Імунофенотипова характеристика та цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня на ранніх пасажах культивування *in vitro*. *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).

9. Mazurkevych A., Malyuk M., Starodub L., Kharkevych Y., Brusko E., Gryzinska M., Jakubezak 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).

10. Mazurkevych, A., Malyuk M., Bezdieniezhnykh 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 дослідження стовбурових клітин та лімфоцитів периферійної крові).

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

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

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

13. 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).

14. 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).

15. Копылов К., Стародуб Л., Мохначева Н., Супрович Н. Особенности изменчивости генома крупного рогатого скота серой украинской породы по цито- 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).

16. 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 зборі архівних матеріалів та вивченні питань із збереження гуцульських коней , написанні статті).

17. Стародуб Л.Ф. Особливості каріотипу корів білоголової української породи. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2020. №134. С.177-185. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

18. Стародуб Л.Ф., Рєзнікова Н. Л., Височанський Й. С. Каріотипова мінливість корів бурої карпатської породи. *Розведення і генетика тварин*. Чубинське: 2021. № 61. С. 226-231. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

19. Starodub L. Features of the karyotype of the Ukrainian aboriginal Hutsul breed of horses. *Весці 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. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

20. Мохначова Н., Стародуб Л., Добрянська М. Оптимізація методу виділення ДНК з викопних решток. *Розведення і генетика тварин*. Київ. 2020. Випуск 60. С. 110-115. (Особистий внесок – брала участь в аналізі одержаних результатів та написанні статті).

Тези доповідей.

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. 2021. С. 62-64.

Методичні рекомендації.

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 отримано експериментальні 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).

	ЗМІСТ	стр.
АНОТАЦІЯ		2
ABSTRACT		7
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ		23
ВСТУП		25
РОЗДІЛ 1	ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ГЕНЕТИЧНИЙ МОНІТОРИНГ АБОРИГЕННИХ ПОРІД СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН	32
	1.1 Характеристика сірої української породи великої рогатої худоби та оцінка мінливості її каріотипу	33
	1.1.1 Характеристика червоної польської породи великої рогатої худоби та оцінка мінливості її каріотипу	36
	1.1.2 Характеристика бурої карпатської породи великої рогатої худоби та оцінка мінливості каріотипу тварин бурих порід	38
	1.1.3 Характеристика білоголової української породи великої рогатої худоби та оцінка мінливості каріотипу тварин фризької породи	40
	1.2 Роль і місце коня в історичному розвитку людини	41
	1.2.1 Особливості коней гуцульської породи та мінливість їх каріотипу	42
	2.2 Історія виникнення коней породи коник польський	45
	1.3 Четвертинний період – останній період геологічної історії Землі та формування тваринного світу	49
	1.3.1 Огляд сучасних уявлень про систематику коневих.	51
	1.3.2 Аналіз хронологічної послідовності еволюції коней на території Євразії, на основі остеологічних знахідок	54

	1.3.3 Походження та domestикація коня у дослідженнях з молекулярної біології	60
	1.3.4 Молекулярно-генетичні методи аналізу ДНК коней	66
	1.3.5 Генетичний поліморфізм порід домашнього коня за ISSR-PCR маркерами	70
	1.4 Дослідження мутагенної і токсичної активності ксенобіотиків різної природи при допомозі DROSOPHILA MELANOGASTER	74
	1.4.1 Використання DROSOPHILA MELANOGASTER як модельного об'єкту в області генетики	76
РОЗДІЛ 2	МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	82
	2.1. Матеріал досліджень	82
	2.2. Умови проведення цитогенетичних досліджень	89
	2.2.1 Приготування цитогенетичних препаратів	90
	2.2.2 Аналіз цитогенетичних препаратів	91
	2.2.3 Визначення частоти мікроядер та двоядерних лімфоцитів периферійної крові ВРХ, мітотичний індекс	92
	2.3 Відбір зразків біологічного матеріалу для проведення молекулярно-генетичних досліджень	93
	2.3.1 Загальні методи та обладнання, що використовували в роботі при виділенні ДНК з біологічного матеріалу	93
	2.3.2 Виділення ДНК з біологічного матеріалу	94
	2.3.3 Техніка проведення електрофорезу	96
	2.3.4 Проведення ПЛР в техніці міжмікросателітного аналізу	96
	2.3.5 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації	98

	2.3.6 Приготування агарозних гелів	99
	2.4 Короткостроковий тест: визначення мутагенної активності (сірководневої води) на організм <i>Drosophila melanogaster</i>	100
	2.5 Статистична обробка результатів	103
РОЗДІЛ 3	ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ АБОРИГЕННИХ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ	106
	3.1 Каріотипова мінливість корів білоголової української породи	106
	3.1.1 Каріотипова мінливість корів червоної польської породи	110
	3.1.2 Каріотипова мінливість корів бурої карпатської породи	114
	3.1.3 Каріотипова мінливість тварин сірої української породи	118
	3.2. Вплив збудника туберкульозу на стабільність каріотипу корів червоної польської породи	123
	3.2.1 Співвідносність віку і хромосомної нестабільності у сірої української породи великої рогатої худоби	127
	3.2.2 Використання мікроядерного тесту для оцінювання соматичного мутагенезу у тварин великої рогатої худоби аборигенних порід	130
	3.3 Короткострокове тестування «Спосіб визначення мутагенної активності (сірководневої води) на організм <i>Drosophila melanogaster</i> »	135
	Висновки до розділу 3	139
РОЗДІЛ 4.	ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ ЛОКАЛЬНИХ ТА ЗНИКАЮЧИХ ПОРІД КОНЕЙ	143
	4.1 Гуцульська порода коней – аборигенна порода українських Карпат	143

4.2	Особливості каріотипу української аборигенної гуцульської породи коней	153
4.3	Історія походження потомків диких коней – тарпанів (коника польського) на території Передкарпаття	159
4.4	Особливості каріотипу потомків диких коней – тарпанів, які занесені до Червоної книги	165
	Висновки до розділу 4	170
РОЗДІЛ 5.	ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦІЙНА СТРУКТУРА ПРЕДСТАВНИКІВ КЛАСУ UNGULATA ЗА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ ДІЛЯНКАМИ ДНК. ЕВОЛЮЦІЙНО-ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ	173
5.1	Ретроспективний аналіз літературних даних щодо поширення плейстоцен-голоценових коней на території України	173
5.2	Генетичний поліморфізм популяцій коней за ISSR-маркерами	180
5.2.1.	Поліморфізм фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими ди- і тринуклеотидними тандемними повторами, в геномі коней гуцульської породи	182
5.2.2.	Поліморфізм фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими ди- і тринуклеотидними тандемними повторами, в геномі коней породи коник польський	191
5.2.3	Поліморфізм фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами ди- і тринуклеотидними тандемними повторами, в геномі коней арабської породи	199
5.2.4	Оцінка стану генофондів коней порід гуцульської, коника польського, арабської за допомогою ISSR – маркерів	205
5.2.5	Генетичний моніторинг внутрішньопородної і міжпородної мінливості коней за ISSR-PCR маркерами	208

5.3 Оптимізація методу виділення ДНК з викопних решток кісток коней	215
5.4 Генофондний профіль фрагментів ISSR-PCR маркерів, одержаних із викопних кісток плейстоценового коня, тарпана і давнього свійського коня	220
5.5 Диференціація генофондів різних видів коней із використання ISSR-маркерів	225
Висновки до розділу 5	247
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	250
ВИСНОВКИ	273
РЕКОМЕНДАЦІЇ	277
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	278
ДОДАТКИ	329

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

А	анеуплоїдія
АРЦРХ	асинхронне розщеплення центромірних районів хромосом
АП	апоптична клітина
ВРХ	велика рогата худоба
ДЯ	двоядерний лімфоцит
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ДПДГ ІТСР	державне підприємство дослідне господарство Інституту тваринництва степових районів імені М.Ф. Іванова Асканія-Нова
ДП «ДГ» «Поливанівка» ІЗК НААН	державне підприємство «дослідне господарство «Поливанівка» Інституту зернових культур Національної академії аграрних наук
ДЛМ	домінантні летальні мутації
К	консервативні локуси
М	маркер молекулярних мас
МІ	мітотичний індекс
МЯ	одноядерний лімфоцит із мікроядром
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
Пн	пар нуклеотидів
ПП	поліплоїдія
ПрАТ	приватне акціонерне товариство
П	поліморфні локуси
ТОВ	товариство з обмеженою відповідальністю
ТР	транскордонна регіональна
Хр	хромосомні розриви
ХА	Хромосомна аберація

D_N	генетичні відстані
ISSR-PCR	„inter simple sequence repeats” – міжмікросателітний поліморфізм
FAO	(Food and Agriculture Organization) Міжнародна продовольча та сільськогосподарська організація під патронатом Організації Об’єднаних Націй
f	частота одного з двох алелів
P_{IC}	індекс поліморфного інформаційного змісту
P	частка поліморфних локусів
R	частка гомозигот за рецесивним алелем

ВСТУП

Збереження породного різноманіття одомашнених видів є важливим для забезпечення стійкого 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 продукцій тваринництва велика увага приділяється породам сільськогосподарських тварин, які найбільш відповідають їх вимогам. Таким чином, існує небезпека втрати генетичного різноманіття, притаманного тваринам локальних 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 [14]. 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 [1]. На жаль нині поза увагою науковців та практиків-селекціонерів залишається генетичний потенціал тварин локальних 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).

Зараз 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, недорогі та ефективні методи оцінки генетичного різноманіття і диференціації. Найбільш ефективними для виконання цих завдань, є методи, засновані на аналізі поліморфізму ДНК. Застосування

мультилокусного міжмікросателітного аналізу ДНК є інформаційним для проведення популяційно-генетичних досліджень, встановлення філогенетичних зв'язків сучасних порід з їх давніми предками. Використання показників цитогенетичної мінливості дає можливість з'ясувати наявність факторів мутагенного впливу на організм та адаптацію організму до певних умов середовища [34]. Такі дослідження мають теоритичне та практичне значення для збереження аборигенних порід сільськогосподарських тварин.

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 кіньми 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 радиозокологических 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

ГЕНЕТИЧНИЙ МОНІТОРИНГ АБОРИГЕННИХ ПОРІД СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

Підтримання біорізноманіття видів і порід тварин потребує системного підходу дослідження генетичних процесів і розв'язання питань збереження генетичних ресурсів. Генетичним тестуванням передбачається здійснення контролю походження за генетичними маркерами; аналіз генетичної структури генофондових стад за ДНК маркерами; каріотипування і цитогенетичний контроль плідників. При аналізі генофонду локальних та аборигенних порід особливу увагу приділяють не лише продуктивним якостям тварин, а й виявленню механізмів адаптації, які може забезпечувати рекомбінаційна та мутаційна мінливість. Сукупність генотипів створює блок інформації про адаптацію до різноманіття середовищних чинників у межах певного ареалу та за весь період історичного розвитку виду.

Центральним завданням у системі збереження генофонду тварин є вибір генофондових об'єктів, встановлення їхньої генетичної специфіки, вивчення селекційного призначення. У Європі робоча група з генетичних ресурсів тварин, починаючи з 1980 року виконує міжнародну програму щодо створення Всесвітнього банку даних з генетичних ресурсів тварин, шляхом збору інформації щодо їхньої генетичної мінливості [9].

За Глобальним планом дій, [6,10] прийнятим під егідою FAO, першим стратегічним пріоритетом по збереженню генетичних ресурсів був всебічний опис і каталогізація генетичних ресурсів тварин. Із усіх генетичних ресурсів тварин в Україні в цілому, за міжнародною класифікацією FAO, виявлено, що близько чверті відносяться до місцевих і $\frac{3}{4}$ - до транскордонних. Третя частина транскордонних генетичних ресурсів є регіональними, а 67% – міжнародними [11].

1.1 Характеристика сірої української породи великої рогатої худоби та оцінка мінливості її каріотипу

Єдиної точки зору щодо походження сірої української породи не має. Відомо, що тварини цієї породи є відріддям прадавньої подільської великої рогатої худоби, яка розселилася по світу і збереглася на сьогодні в незначній кількості в країнах південної і східної Європи. Професор О.О. Браунер (1922), провівши аналіз промірів кісток скелету сірої української худоби і кісток дикого тура, прийшов до висновку, що сіра українська худоба є нащадком європейського тура [12]. Багато авторів (Скворцов, 1870; Пахомов, 1909; Зорін, 1950; Іванов, 1954) описують ареал поширення сірої степової породи у досить широких географічних межах – від Карпатських до Уральських гір, захоплюючи Австрію, Польщу, Болгарію, придунайські країни, Італію, Грецію, Турцію, Чорноморське узбережжя Кавказу, Іспанію, Португалію, а також Україну в сучасних кордонах [13, 14, 15].

Дослідження А.В. Леопольдова (1924) [16] свідчать про те, що в колишньому СРСР ареал сірої української породи виходив за межі України. Поголів'я породи було розповсюджене у районах Ростовської області, Північного Кавказу, частково у Закавказзі та південних районах Білорусії.

Вчені А. А. Скальковський (1853), В. А. Шадрін (1917), І. Г. Зорін (1950), М.Ф. Іванов (1964) вважають, що формування породи проходило без прилиття крові інших порід під впливом природно-історичних та господарських умов на великій території південних степів України. Вдосконалення цієї породи велося методом народної селекції, переважно у робочому напрямку для використання у хліборобстві і в якості гужового транспорту. Формувалися тварини із великою живою масою, міцною тілобудовою та добрим здоров'ям. Кастрований до піврічного віку бугай сірої української породи, віл, вважався ідеальною робочою худобою [15, 17, 18, 19]. .

Для оцінки генетичного статусу аборигенної сірої української худоби традиційного аналізу родоводу із визначенням ступеня спорідненості, гомочи гетерозиготності стада зовсім недостатньо. Для контролю мікроеволюційних процесів, які відбуваються у стаді, стає необхідними застосовувати сучасні методи дослідження генофонду тварин. Одним із таких методів є оцінка стабільності каріотипу тварин, яких вивчають.

Дослідження каріотипу сірої української худоби неодноразово проводилося науковцями. У 80-х роках минулого століття увага вчених була звернена на центромірне злиття 1;29 пари хромосом. Робертсонівська транслокація описана майже у 40 порід великої рогатої худоби. Проте, найбільш високої концентрації вона досягає у малочисельних порід, внаслідок обмеженості в популяції інтенсивного використання незначної кількості плідників. З високою частотою робертсонівська транслокація зустрічається у сірих порід – кіанської, сірої австрійської і особливо у сірої угорської.

Цитогенетичне обстеження тварин сірої української породи (Качура В.С., Мелешко О.А., 1983) [20] показало, що для всіх протестованих тварини (74 гол.) каріотип знаходився в нормі: корови 60 XX і бугаї 60 XY. Кількість поліплоїдних клітин коливалася в межах 0,75– 5,65%, що не перевищує рівня поліплоїдії у тварин інших порід. Враховуючи невелику чисельність тварин цієї породи, автори вважають, що серед них відсутні носії робертсонівських транслокацій. Це свідчить про певні відмінності сірої української худоби [20].

Цитогенетичний моніторинг стад сірої української породи дослідного господарства «Поливанівка» Дніпропетровської області, проведений Дзіцюк В. В. показав, що всі обстежені тварини сірої української породи мали нормальний каріотип: 60 XX і 60 XY. Середній вміст аберантних клітин був значно вищим, ніж у інших тварин порід великої рогатої худоби. При цьому спостерігався значний індивідуальний поліморфізм (від 16,6 до 77%). Рівень анеуплоїдії становив 22,7–27,3%, поліплоїдії – 5,1–8,3 %. На думку авторів

[21], підвищені показники геномних аберацій, підкреслюють генетичну мінливість сірої породи, що є її специфічною особливістю.

Аналіз структурних порушень хромосом виявив широкий спектр їх видів. Серед аберацій зустрічалися порушення як хромосомного, так і хроматидного типів. Хромосомні порушення були виражені розривами хромосом (3,1–4,5%) та парними фрагментами (5,0–9,9%). Хроматидні розриви, поодинокі фрагменти, кільця становили до 3,9%. При дослідженні каріотипу, особлива увага зверталася на наявність робертсонівських транслокацій (TR 1;29). Наявність цієї мінливості у стадах сірої худоби є виявом накопичення хромосомного поліморфізму. Із 40 досліджених тварин, лише у двох корів ця мінливість не проявилася. У всіх інших цей показник коливався від 1 до 77%. За даними літератури, аутосомні транслокації також зустрічаються і в інших відріддях сірої худоби.

При цитогенетичному обстеженні тварин племінного репродуктора

« Свято-Успенська Києво–Печерської Лаври» Бориспільського району Київської області (2004 р.) була виявлена хромосомна аберація, що проявилася в нехарактерному розміщенні ядерцеутворюючих організаторів. Причиною цієї мінливості може бути реципрокна дицентрична транслокація [21].

При дослідженні каріотипу цієї породи в господарстві КСП «Вороньків» Бориспільського району Київської області іншими науковцями [22] було встановлено, що рівень клітин із асинхронним розходженням центромірних районів хромосом становив 5,49% , розмах мінливості при цьому дорівнював 0-17%. Кількісні порушення хромосом, анеуплоїдія, у тварин сірої української породи проявилися з частотою 4,68%, поліплоїдія – 0,84%. Середній відсоток клітин із міжхромосомними асоціаціями за типом робертсонівських транслокацій 1;29 у досліджуваних тварин становив 24,12. Ця мінливість була виявлена у девяти з одинадцяти досліджених тварин сірої української породи. Спектр прояву цієї мінливості становив від 1 до 77%.

Аналіз каріотипової мінливості тварин сірої української породи показав, що каріотипова нестабільність характеризує процеси, які відбуваються в породі, і спрямовані на збереження генетичної мінливості. Цитогенетична породна особливість сірої худоби, пов'язана із специфікою розведення в стаді з невеликою чисельністю і є відповіддю популяції на систему розведення, що склалася. Генетичні процеси, стимульовані спорідненим паруванням, переводять популяцію в стан, коли працюють на збереження генетичної мінливості і запобігають генетичній депресії [21].

Вчені і фахівці цінують сіру українську худобу за високу здатність стійко передавати нащадкам господарськи-корисні ознаки: по-перше як м'ясна порода. Сіру породу, як м'ясну, розводять у Франції, Італії, Угорщині, Сербії. По-друге: сіра українська худоба це прекрасна материнська основа для різних міжпородних схрещувань. По-третє: ця порода представляє цінність для вивчення філогенезу великої рогатої худоби. Сіра українська худоба це наша історія, продукт народної селекції. Вона має національну, культурну цінність, таку саму як архітектурні і природні пам'ятники нашої держави [23].

1.1.1 Характеристика червоної польської породи великої рогатої худоби та оцінка мінливості її каріотипу

Польська червона худоба – одна з небагатьох корінних європейських порід червоної худоби. Вона характеризується властивостями, характерними для аборигенних порід, такими як: високий імунітет та здоров'я, довголіття, дуже хороша плодючість, легкі пологи, висока життєздатність телят і легкість вирощування, а також висока біологічна цінність молока. Тварини цієї породи ідеально пристосовані до умов навколишнього середовища, що дозволяє вижити в сезонному дефіциті кормів, а також досить швидко відновити втрачений стан. Серед особливостей конструкції слід виділити міцні ніжки і тверді, міцні копита. Ці особливості означають, що велика

рогата худоба цієї породи добре пристосована до рівнинних та гірських умов життя. Крім того, вона відрізняється якісно важливими характеристиками молока: високий вміст білка, жиру та сухої речовини, висока біологічна цінність та висока придатність для виготовлення сиру. З 1980-х років худоба червоної польської породи була поширена головним чином у Польщі та деяких областях України: Волинській, Тернопільській, Рівненській. Для вдосконалення цієї породи в Польщі нині використовуються бугаї-плідники англєрської породи, в Україні – англєрська, червона датська і частково червоно-рябі голштини, а раніше використовувались плідники бурої латвійської та червоної естонської порід. [24].

Від Червоної польської худоби походять такі сучасні породи, як англєрська, червона датська, бура латвійська, червона естонська та ін [25].

На цей час тварини червоної польської породи належать до 1 категорії вітчизняної класифікації та ТР (транскордонної регіональної) – класифікація FAO [4].

Популяція цієї породи зменшується з кожним роком не тільки в Україні, але і в Польщі. Завдяки високій плідності породи та чудовому складу молока з високим вмістом твердих речовин, жиру та білка (Czaja et al., 1996), консервативні стада були створені як генетичний резерв для розведення польської червоної худоби. Генетичний резерв у Польщі наразі становить близько 500 корів. В цей час на польську червону худобу припадає близько 0,8% польської худоби. Ця автохтонна порода мало змінилася селекцією і дуже добре пристосована до умов навколишнього середовища.

З 1989 року у Польщі діє система цитогенетичного контролю бугаїв, які знаходяться на станціях штучного осіменіння, з метою недопущення використання сперми від тварин з порушеннями каріотипу. Самки ж контролюються лише епізодично.

У 1989 – 2002 роках здійснене цитогенетичне дослідження 451 тварини польської червоної худоби. В цій популяції було виявлено чотири випадки химеризму лейкоцитів 60, XX / 60, XY та три випадки 1;29 транслокації

Робертсона. Нові випадки Робертсонівської транслокації 1;29 були зафіксовані з індивідуального господарства в Сазарах (Підгалецький регіон) і пов'язані з польським червоним бугаєм (реєстр. № 70100-3-8), носієм Робертсонівської транслокації 1;29 [26].

Для точної ідентифікації хромосом, що беруть участь у транслокації, використовувались технології діапазону GTG (Wang і Fedoroff, 1972) та RBA (Dutrillaux et al., 1973), а отриману структуру смуг порівнювали з міжнародним стандартом ISCND (Di Berardino et al., 1990). У чотирьох споріднених польських червоних тварин діагностовано 1;29 центричне злиття в гетерозиготній формі. Методи GTG і RBA підтвердили, що в транслокації брали участь хромосомні пари 1 і 29 [27, 28].

Робертсонівська транслокація 1/ 29 в гетерозиготній формі у носіїв найчастіше пов'язана зі зниженням показників народжуваності. Зниження народжуваності зумовлене ненормальним процесом гаметогенезу, що, в свою чергу, призводить до загибелі анеуплоїдних ембріонів (Gustavsson, 1969; Popescu, 1990). Центричні злиття передаються нащадкам згідно з менделівською сегрегацією (Gustavsson, 1969; Weber et al., 1989). Якщо сегрегація хромосом приймає нормальний перебіг, це призводить до гамет із збалансованим каріотипом. Народжені потомки мають або нормальний каріотип або є носіями транслокації. Якщо сегрегація хромосом ненормальна, що призводить до дефектних гамет із незначним або надмірним генетичним матеріалом (анеуплоїдні гамети), це утворює зиготу з незбалансованим каріотипом. Ембріон, що розвивається, гине під час внутрішньоутробного росту [29, 30].

1.1.2 Характеристика бурої карпатської породи великої рогатої худоби та оцінка мінливості каріотипу бурих порід

Бура карпатська порода великої рогатої худоби сформувалася на Закарпатті наприкінці XIX ст. й належить до порід молочно-м'ясного

напрямую продуктивності. Тварини сучасної породи є прямими нащадками стародавньої бурої карпатської худоби, поширеної свого часу в усій Середній Європі. В районі Альп її називали бурою альпійською, в Швейцарії - швіцькою, в Австрії –горноінською і монтафонською, а в Німеччині - альгауською. Це були дрібні коротконогі тварини з густою довгою бурою й темно-бурою шерстю. В районі Карпат місцева порода бурої масті залишалася незайманою до кінця XIX сторіччя. Місцеве населення називало цю худобу «рижкою». Тварини цілу зиму знаходилися на випасах, взимку їх годували сіном, а коли його не вистачало – соломомою та гіллям чагарників [31].

У результаті тривалого міжпородного схрещування місцевої худоби з заводськими породами альпійського походження при спрямованому доборі щодо молочно-м'ясної продуктивності утворилася бура карпатська порода. У 1972 році її було визнано породою. Розводять буру карпатську породу у Закарпатській області та окремих гірських районах Івано-Франківської області. Масть бура, від світлого до темного відтінків. У дорослих тварин по спині тягнеться світло-сірий пояс. Носове дзеркало темне. Худоба має пропорційну будову тіла та міцну конституцію. Щодо розмірів, то їх можна віднести до порід середньої величини. Основні проміри повновікових корів (см): висота – 128–130; глибина грудей – 67,2; коса довжина тулуба – 155,3; обхват грудей за лопатками – 181–189; обхват п'ястка – 19,4–20,0. Індекс рівномірності розвитку вимені достатньо високий – 45,7%. Жива маса бугаїв становить 700-1000 кг, корів – 400–500 кг. Головна перевага бурої карпатської породи полягає в тому, що її можна ефективно вирощувати на природних пасовищах - і в низинах, і в горах. Генетика цих тварин стійка до гострих інфекційних хвороб, вони добре пристосовані до місцевих умов, чутливі до поліпшення умов утримання та годівлі, а корови дають особливе молоко, яке використовується у виготовленні високоякісних твердих сирів та дитячого харчування. При цьому молочна продуктивність у бурої карпатської відносно невелика - 3000-4000 кг молока жирністю 3,6–3,7%.

У корів високі материнські якості, добре виражені ознаки молочності. Вони мають високий потенціал плодючості, що становить 85–95%, рівень виходу телят – 90–93%. М'ясна продуктивність бичків бурої карпатської породи доволі висока. Забійний вихід становить 55–58% [32].

Фахівці закарпатської Асоціації бурої карпатської породи, яка входить до складу Федерації бурих порід Європи, розробили концепцію її збереження, сформували банк генофонду і почали її генетичне дослідження. Цю роботу аграрії та науковці проводять за фінансової підтримки Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН, FAO. Місцева бура карпатська порода домінує в Закарпатті [33].

Контроль каріотипу швіцької породи великої рогатої худоби був здійснений у Швейцарії у 80-х роках минулого століття. Тестування проводили на 224 головах великої рогатої худоби і одержали такі результати: 3 корови із протестованих, були гомозиготні за Робертсонівською транслокацією 1;29, що становила 1,34% та 31 протестована тварина була гетерозиготною за цією транслокацією і становила 10,4%. Всі вони успадкували аномалію від одного бугая (підсумок банку USDA-DHIA). Результати цитогенетичного контролю великої рогатої худоби румунської бурої породи (Румунія) за останні 20 років показали, що частота тварин-носіїв робертсонівської транслокації 1;29 (Rb 1;29) становила 0,7% [34, 35]. Одержані дані свідчать про можливість появи у бурих порід Робертсонівської транслокації.

1.1.3 Характеристика білоголової української породи великої рогатої худоби та оцінка мінливості каріотипу тварин фризької породи

Білоголова українська аборигенна порода України створена в кінці XVIII ст. у результаті відтворювального схрещування місцевої худоби з гронінгенським відріддям голландської худоби. Голландська порода – одна з давніх порід великої рогатої худоби молочного напрямку. Виведена в Голландії. Розрізняють три відріддя голландської породи: власне голландське, або фризьке, чорно-рябої масті; гронінгенське, чорної й

червоної мастей, білоголове; маас–рейн–ізельське, червоно–рябої масті [36].

Краща частина гронінгського відріддя цієї худоби була зосереджена в німецьких та чеських колоніях південної частини Полісся й частково переходила в селянські господарства на заміну поліській худобі [37]. Ареал її поширення - господарства Полісся України. Ця порода є складовою селекційного процесу галузі молочного скотарства в Україні, зосереджена в племінних стадах [38]. Породні особливості: ніжна міцна конституція, виняткова пристосованість до кормових та кліматичних умов зони. Молочна продуктивність племінних корів становить в середньому 4–5 тис. кг. Продуктивність рекордисток у межах 7,8–9,6 тис. кг молока. Структура породи представлена десятима генеалогічними лініями і більш ніж 30-ма сімействами.). У 80–ті роки минулого століття корови цієї породи були залучені в породотворчий процес при створенні масиву чорно–рябої породи на Україні [2]. Племінне стадо з поголів'ям 350 корів створено в племзаводі «Антоніни» Хмельницької області, в теперішній час назва ТОВ «Подільський господар». Частка корів білоголової української молочної породи серед усіх наявних порід молочного напрямку продуктивності в Україні зараз становить 0,2%. Моніторинг білоголової української породи молочного напрямку продуктивності в процесі її історичного розвитку підтверджує можливість значного підвищення надою корів методами внутрішньопородної селекції, а отже її інтенсивного використання при виробництві продукції, що вважається основним чинником функціонування породи в сучасних ринкових умовах.

У літературних джерелах відображений аналіз каріотипової мінливості племінних тварин великої рогатої худоби остфриської породи. Так, у 80-х роках минулого століття цитогенетичний контроль тварин фризької породи (Англія) виявив синдром хромосом XXУ, який в чистому вигляді зустрічається дуже рідко та транслокацію 2;24 (Англія) і транслокацію 3;27 (Румунія) [39]. Цитогенетичний моніторинг, який тривав 15 років в Італії виявив тварин носіїв (Rb 1;29) фризької породи з частотою 0,7% [34].

1.2 Роль і місце коня в історичному розвитку людини

Конярство, як галузь тваринництва, існує ще з четвертого тисячоліття до нашої ери. Після приручення і одомашнення кінь став постійним помічником людини, використовувався в різних якостях. Суттєва особливість коня на терені інших сільськогосподарських тварин—значна мінливість та різновидність щодо призначення в різні історичні епохи. На сучасному етапі розвитку суспільства народногосподарське значення коня набуло комплексного характеру і нині коней використовують на сільськогосподарських і транспортних роботах. Певною мірою коні забезпечують людей важливими продуктами харчування: м'ясом і молоком [40].

1.2.1 Особливості коней гуцульської породи та мінливість їх каріотипу

Гуцульський кінь, іноді Гуцулик або Гуцул – аборигенна гірська порода свійських коней, яка розповсюджена в Карпатах та у багатьох країнах Східної Європи, належить до світового генофонду. Свою назву ця порода коней отримала від назви «гуцулів» – субетносу українців, що живуть у гірських районах Івано-Франківської і Чернівецької областей та в Рахівському районі Закарпатської області.

Гуцульська порода – місцева гірська порода верхово-в'ючних коней. Предками породи вважаються дикі тарпани карпатського типу. Вплив на формування гуцульської породи зробили коні Пржевальського, місцеві робочі коні, а пізніше коні арабської породи. Гуцульська порода коней, сформована понад 400 років тому на просторах гірської частини Українських Карпат – Гуцульщині, від чого і походить назва породи. Гуцульські коні – незалежна та унікальна порода. Починаючи з 1979, вона входить до фонду захисту генотипів аборигенних та примітивних порід тварин FAO, одержали статус реліктової породи і були взяті під охорону. Для

цих цілей в 1994 р. була створена Міжнародна Федерація Гуцульських коней (Н.І.Ф.) . Мета цієї організації – забезпечувати єдину методику і мету розведення на території, де поширена ця унікальна порода [41].

Перше згадування про гуцульських коней відноситься до 1603 року. Спочатку гуцульські коні в суворих умовах Буковинських Карпат мали всі ознаки диких коней. В 1856 році недалеко від Радовецького кінного заводу був побудований кінний завод Луцина (Luczina) по розведенню гуцульських коней. За часів Австро-угорської монархії, влада якої поширювалася й на споконвічну область перебування гуцульських коней, гуцульська порода коней підлягла систематичної та цілеспрямованої селекції для використання в кавалерії. Відтоді стали вестися племінні книги. До того ж періоду сходять і найстарші лінії гуцульських коней [42]. Після першої світової війни і розпаду Австро–Угорської Монархії, центр розведення гуцульських коней перемістився в Румунію, Чехословаччину і Польщу.

Сотні років гуцульських коней розводили в горах у дуже суворих природних умовах. Ізольована від інших порід, гуцульська порода розвилася в стійких і сильних коней. Цей маленький кінь дуже міцний, стійкий до захворювань і здатний жити під відкритим небом на паші цілий рік.

Гуцульські коні невисокі, середня висота в холці в жеребців - 139 - 145 см , у кобил - 137 - 142 см. Круп у коней добре розвинений, груди глибокі і широкі, голова виразна з більшими очима й маленькими рухливими вухами. У них дуже сильна спина, шия мускулиста. Копита маленькі й дуже тверді - звичайно гуцульські коні не вимагають кування. Окрас у більшості гніда з темним ремнем по спині, також може бути булана, ворона, руда, сіра, мишаста. Характерною рисою породи є смуга по хребті й смужки на ногах.

У гуцульських коней дуже спокійний і врівноважений характер. Вони універсальні, і підходять як для верхової їзди, так і для упряжі. Вони дуже надійні незворушні, навіть коли зіштовхуються з недосвідченим вершником. Гуцульських коней часто використовують як в'ючних тварин, і як робочих коней у лісах. Коні дуже стійкі й мають унікальні здатності підніматися по

гірських стежках, дуже обережно, високо піднімаючи передні ноги, переступаючи через різні перешкоди. Коні сильні та витривалі, до того ж здатні підтримувати гарну швидкість на рисі. По всій території Карпатських гір виводилися різні внутріпородні типи - починаючи від легкого коня під сідло й під व्यюк і закінчуючи масивними кінями важкого типу.

Походження коней, яких розводили на Гуцульщині, не було однозначно з'ясоване до сьогоднішнього дня. Розбіжності стосуються також типів, розмірів, масті та інших ознак. Все ж, більшість фахівців погоджуються з тим, що гуцульські коні, в основній мірі були сформувані впливом природних умов, а також способом користування і харчування їх предків в гірських умовах Східних Карпат.

Переваги коней з Гуцульщини оцінила австрійська армія вже у 50-тих роках XIX ст. Гнідих і світло-сірих коней, закуплених армією, перенесено до кінного заводу в Лючині в Румунії, близько до кордонів Гуцульщини. Цей кінний завод існує до сьогоднішнього дня і продовжує розводити гуцульських коней. Під час I світової війни гуцульські коні розшукувалися усіма воюючими арміями, як найбільш витривалі щодо труднощів служби на фронті. Після війни їх використовували в господарствах не лише на території Карпат, а також на території Поділля та Малопольщі. Переваги коней оцінили в тому числі й будівельники канатної дороги на Каспровий Верх у Татрах і астрономічної обсерваторії на горі Піп Іван у Чорногорі.

Коні на Гуцульщині первинно використовувалися як верхові і в'ючні. Після побудови доріг їх почали використовувати як упряжних коней [43]. Дослідження мінливості каріотипу коней гуцульської породи було описане на племінній фермі господарства «Шипіт» Міжгірського району (24 голів) Закарпатської області Попадюк С.С. у 2002 році. Цитогенетичним аналізом 24 коней гуцульської породи господарства «Шипіт» не виявлено грубих структурних порушень їх хромосом, в тому числі і робертсонівських транслокацій. Спектр хромосомних порушень не відрізнявся від спонтанно утворених і їх частота варіювала в межах 4,2–4,7%. На препаратах

мітотичних хромосом коней виявлено аберації як хромосомного, так і хроматидного типів. Серед аберацій хромосомного типу найчастіше зустрічались парні фрагменти та кільцеві хромосоми. Загальна кількість хромосомних порушень становила 8,9%, частка поліплоїдних клітин – 3,9%, що відповідає нормі [44].

1.2.2 Історія виникнення коней породи коник польський

Польський коник – маловідома порода коней, що відноситься до групи так званих місцевих порід. Приналежність до даної групи пояснюється тим, що виведена вона в межах однієї країни і за її кордонами, майже невідома.

Кінь був одомашнений в 3–4 тисячолітті до нашої ери. Вважають, що одним із предків свійського коня був дикий кінь тарпан, що жив у степах і лісостепах Євразії. Примітно, що давши початок домашнім коням, тарпан згодом з ними не схрещувався. Пояснюється це просто – дикі коні були харчовими конкурентами домашніх, тому там, де їхні шляхи перетиналися, люди безжально знищували тарпанів. Століття за століттям ареал диких коней скорочувався, а їх кормові угіддя діставалися худобі. У результаті такого витіснення дикий кінь вже до XVIII сторіччя майже зник з лиця Землі: нечисленні лісові тарпани бігали по узліссях Польщі, Пруссії, Литви, а поріділі табуни степових тарпанів доживали свій вік у степах України. У XIX столітті вид вимер у природі і сучасні люди навіть не уявляють, як виглядав предок домашніх коней.

Утім, у XVIII–XIX століттях окремі тарпани періодично відловлювалися людьми, робилися спроби приручити диких коней як з господарською метою, так і з метою врятування виду. На жаль, всі вони були безуспішними. Народжені вільними, тарпани відрізнялися на рідкість буйною вдачею і не тільки не піддавалися об'їзді, але і взагалі не переносили неволі. При утримання в конюшнях, дикі коні могли протягнути кілька років, після чого гинули, незважаючи на хороший догляд. І все ж, саме в ці століття згасання, від тарпанів вдавалося отримати потомство. Воно було не чистокровним:

нащадки тарпанів, як правило, були помісями від диких жеребців і домашніх кобил, переважно безпородних, так як багаті коневласники вважали нижче своєї гідності злучати кобил з безрідними дикунами. Так, до кінця ХІХ століття на сході Польщі сформувалася порода селянських коней, в жилах яких був чималий відсоток крові тарпанів. Як і всі робочі породи народної селекції, польські коники коренасті, звідси і їх назва (у перекладі з польської коник — «маленька конячка»). Їх висота в холці не перевищує 130-140 см. Але кров тарпанів дає про себе знати. Тому в зовнішності цих тварин крім низькорослості є чимало інших рис дикого коня. Польські коники при малій висоті – костисті, мають широкі і глибокі груди, округлі боки з опуклими ребрами; їх маса в середньому становить 300–400 кг. Череп їх помітно крупніший, ніж у інших домашніх коней. Важка голова має прямий або трохи горбоносий профіль. Очі опуклі і виразні, ніздрі здатні сильно розширюватися, вуха маленькі, загострені і рухливі. Шия з низьким виходом, мускулиста, недовга, холка низька. Оброслість ніг незначна, але нерідко піднімається високо (до зап'ясть і скакальних суглобів). Копита маленькі, але міцні. Хвіст посаджений низько.

Як і у тарпанів, у польських коників від гриви до основи хвоста по спині проходить чорний ремінь. Всі представники породи мають одну і ту ж масть – мишасту. Подібна однаковість рідко зустрічається в конярстві. У мишастих коней корпус рівномірно забарвлений в сірий колір з незначними варіаціями відтінків (від зольного до коричневого), при цьому нижня частина ніг і кінець морди чорні. Грива і хвіст чорні, з рідкісними вкрапленнями білих пасм. У окремих особин на ногах помітні невиразні смуги – так звана зеброїдність, що також вказує на примітивність породи. Примітно і те, що польські коники можуть змінювати відтінок масті в залежності від сезону: влітку воно темніше і коричневіше, а до зими світлішають.

Така мінливість не характерна для домашніх коней, зате часто зустрічається в диких тварин, яким сезонний диморфізм допомагає залишатися непомітними на будь-якому тлі.

Всіх перерахованих вище рис достатньо, щоб сказати, що польські коники неймовірно схожі з дикими кіньми. Але невже вони зовсім нічим не відрізняються від тарпанів? Справедливості заради варто відзначити, що такі відмінності є. По–перше, у польських коників грива не стояча, в той час як очевидці описували тарпанів, як коней зі стоячою, жорсткою і трохи кучерявою гривою. По–друге, характер польських коників дуже врівноважений, чого не скажеш про їх неприборканих диких предків. Нарешті, в окремих коней на ногах можуть бути білі відмітини, що також розглядається як незаперечна ознака прирученості. Незважаючи на ці недоліки, зовнішня схожість польських коників з тарпанами дала поштовх польським дослідникам 1930-х років дослідити їх. Одному з них, зоотехніку і біологу Тадеушу Ветулані, прийшла в голову геніальна думка: якщо люди впродовж усієї історії виводили породи свійської худоби, відсіваючи «непотрібні» дикі гени і культивуючи господарськи-корисні якості, то чому б не спробувати навпаки? Так, теорія еволюції стверджує, що її хід незворотний, і в природних умовах від випущених на волю домашніх коней вже ніколи не народяться по-справжньому дикі. Але якщо закони природи перебороти людською працею! Якщо спробувати вести селекційний відбір не в напрямку більшої прирученості, а в напрямку очищення крові від генів домашніх коней, чи не вдасться таким способом воскресити вже вимерлий вид.

Зібравши в Біловезькій Пущі стадо з 35 голів, Тадеуш Ветулані почав відбирати серед них лошат, схожих на тарпанів. Завершити роботу йому завадила окупація Польщі гітлерівськими військами — всіх експериментальних коней вивезли в Німеччину. На щастя, там вони потрапили в руки до талановитих німецьких натуралістів — братів Лутцу і Гейнцу Хек. Вони, так само як і польські вчені, цікавилися можливістю відновлення тарпана як виду. З польським поголів'ям братам вдалося досягти феноменальних успіхів: серед їхніх підопічних стали народжуватися лоша́та зі стоячою гривою — абсолютною ознакою диких коней. Це дало право

братам іменувати піддослідне поголів'я тарпаноїдами, тобто напівтарпанами. Здавалося, до повного відновлення зниклого виду залишилося зовсім небагато. Після закінчення війни Німеччина зобов'язана була повернути награбовані багатства, тому експериментальні коні поїхали на свою батьківщину. На жаль, у 1952 році Тадеуш Ветулані раптово помер, а його послідовникам не вдалося повторити успіх первісної селекції. Сучасні польські коники як і раніше ходять зисячою гривною і все ж, незважаючи на цю «прогалину», можна сміливо заявити: на даний момент це єдина порода в світі, чий фенотип максимально наближений до зовнішності диного коня. І нехай генетики заявляють, що польські коники все ж домашні коні, але побачити тарпана можна лише в них. Де ж познайомитися з цією цікавою породою?

Статистика показує, що основна частина поголів'я цієї породи, як і раніше, зосереджена в Польщі. Селянське походження цих конячок обумовлює їх універсальність. У польських селах коників зазвичай використовують як упряжних коней, але вони також придатні для туризму і непрофесійного кінного спорту. Врівноважені, невибагливі, з міцним копитним рогом (а значить, стійкі до травм), ці конячки ідеально підходять для тривалих прогулянок, особливо зі стоянками в полі, а натреновані, можуть брати і не занадто високі перешкоди. Низький зріст наближає цю породу до високих поні, тому коники гарні для навчання верховій їзді дітей і підлітків. У країнах з м'якою зимою польських коників можна утримувати цілий рік на леваді: вони не тільки не застуджуються, але на вільному випасі навіть міцнішають. До того ж польські коники відрізняються завидним довголіттям, стійкістю до паразитів і високою плодючістю.

Останнім часом ця порода потроху виходить на міжнародний ринок. Дослідження в багатьох заповідниках показали, що степи, позбавлені копитних, деградує, навіть незважаючи на найсуворішу охорону. На абсолютно заповідних ділянках біорізноманіття, висота і продуктивність трав'яного покриву нижче, ніж на ділянках з помірним випасом. Заради

порятунку природних ландшафтів польських коників завозять на території, що охороняються. Дикі стада цих коней існують у Польщі, Латвії, Великобританії, Голландії, Франції, Німеччині, Литві. Хто знає, чим завершиться цей процес, можливо, вже на нашому віку на лугах та степах будуть проноситися стада справжніх європейських мустангів.[45]

1.3 Четвертинний період – останній період геологічної історії Землі та формування тваринного світу

Еволюційні етапи формування коней, на думку багатьох вчених, (Атлас) пов'язані з геологічною історією Землі. Четвертинний період – останній період геологічної історії Землі та формування тваринного світу. Умовно Землю ділять на первинний період (утворення Землі), вторинний (поява перших організмів), третинний (час існування ссавців) і четвертинний (час існування людини). Цей період характеризується незначною тривалістю, значною тектонічною активністю (геократичністю), появою людини. Найхарактернішою ознакою четвертинного періоду є досить різкі зміни клімату, пов'язані з похолоданнями та періодичним розвитком материкових та гірських зледенінь. На континентах під час покривного зледеніння виникали перигляційні зони, в яких формувалися леси та лесоподібні відклади. За часів міжльодовиків'я відновлювалася близька до сучасної ландшафтно-кліматична зональність; водночас підвищувався рівень океану.

Четвертинний період розділяється на *плейстоцен* і *голоцен* табл.1.1

Підрозділи четвертинного періоду, згідно ICS (Міжнародної стратиграфічної комісії)

Період	Епоха	Вік	Час,млн р.р. тому
Четвертинний	Голоценова	Мегхалейський	0,0042 – 0,0000
		Нортгріппський	0,0082-0,0042
		Гренландський	0,0117-0 ,0082
	Плейстоценова	Верхній	0,129-0,0117
		Чибанський	0,774-0,129
		Калабрійський	1,80-0,781
		Гелазький	2,58-1,80

На рубежі плейстоцену і голоцену (близько 11,7 тис. рр. тому) відбулась глобальна зміна клімату в бік потепління. Кліматичні зміни впродовж четвертинного періоду впливали на видовий склад тваринного та рослинного світу, котрий спочатку мало відрізнявся від пліоценового. Найбільші зміни відбулись у

складі фауни ссавців під час середньочетвертинного зледеніння, коли з'явився мамонт, шерстистий носоріг та інші представники полярних тварин. Склад морської фауни та флори змінювався мало і був обумовлений періодичними міграціями у зв'язку з екологічними умовами існування.

На території України впродовж четвертинного періоду відбувалися тектонічні рухи різної інтенсивності. Майже вся територія, за винятком берегової смуги в Причорномор'ї, зазнала підняття. У результаті швидкого піднімання окремих ділянок земної кори (Придніпров'я, Донецька височина, Кримські гори й Карпати) виник дуже розчленований рельєф із численними річковими терасами. Під час максимального дніпровського зледеніння

льодовик просунувся по долині Дніпра до широти сучасного м. Кам'янське (колишній Дніпродзержинськ). Перигляційна зона досягала підніжжя Кримських гір. Максимальне зниження рівня океану (–120 м) припадає на останнє валдайське зледеніння. В цей час шельф Чорного моря являв собою прибережну низовинну рівнину. Однією з найважливіших подій четвертинного періоду була поява людини. Саме тому за пропозицією видатного рос. геолога О.П. Павлова (1922) четвертинний період часто називають «антропогеновим періодом»[46].

Протягом плейстоцену території Євразії та Північної Америки чотири рази піддавалися гігантським заледенінням. Льодовики, що сповзали зі Скандинавії, доходили до Києва, Харкова і Воронежа. Льодовики Антарктиди, Гренландії, Ісландії, Північної Землі, Землі Франца-Йосипа, Паміру й Тянь-Шаню – залишки четвертинних зледенінь.

Негативний баланс тепла в зоні зледеніння привів до того, що пари води конденсувались у вигляді снігу, а танення льодів і снігів щорічно давало менше води, ніж випадало снігу. Накопичення гігантських запасів льоду на суші призвело до істотного зниження рівня Світового океану (на 60-90 м). В результаті виникли сухопутні мости між континентальною Європою і Британськими островами, Азією та Північною Америкою, Приамур'ям і Сахаліном, між півостровом Індокитай і островами Зондського архіпелагу. За цим ділянкам суші відбувався обмін тваринами і рослинами.

1.3.1 Огляд сучасних уявлень про систематику коневих

Предки непарнокопитних тварин вперше з'явилися в ранньому еоцені (близько 50 млн. років тому) на Північноамериканському континенті. Північна Америка є центром еволюції цього ряду тварин, проте, непарнокопитні тут з часом поступово зникли. Зараз в ряді непарнокопитних *Perissodactyla* налічується три родини: Тапірові, Носорогові, Коневі. Єдиної класифікації родини Коневі (*Equus* Gray) на сьогодні немає. На думку одних науковців [47]

Тип: Хордові (*Chordata*)

Клас: Ссавці (*Mammalia*)

Надряд – копитні (*Ungulata*)

Ряд – непарнокопитні (*Perissodactyla*)

Родина Коневі (*Equus Gray*) представлена 1 родом

Рід Коні (*Equus Linnaeus*) поділяють на чотири підроди: осли, напівосли, зебри, коні

Підрід Власне коні (*Equus caballus*) – включає 2 види

1. **Вид** дикий кінь (*Equus ferus*) – включає 3 підвиди

1.1 *E.f. przewalski* – кінь Пржевальського

1.2 *E.f. gmelini* – степовий тарпан (вимерлий)

1.3 *E.f. silvaticus* - лісовий тарпан (вимерлий)

2. **Вид** свійський кінь (*Equus caballus*)

Група інших науковців [48] класифікацію родини Коневих подала у такому вигляді:

Родина Коневі (*Equus Gray*)

Рід Коні (*Equus Linnaeus*) - виділяють 3-4 підроди або групи видів

Вид давній свійський кінь (*Equus caballus Linnaeus*) - вимер в історичний час, одомашнений - розповсюджений повсюди.

Вид Тарпан (*E. Gmelini*) часто рахують окремим видом. Деколи його зближають з конем Пржевальського з відокремленням у **3 підвиди**:

2. *E. przewalski gmelini* –південний степовий тарпан

3. *E. p. silvaticus* - лісовий тарпан

4. *E. p. przewalski* – кінь Пржевальського

Питання про конспецифічність тарпана залишаються дискусійними. В найбільш об'єднаній концепції всіх плейстоцен та голоценових коней об'єднують у єдиний вид **свійський кінь (*Equus caballus Linnaeus*)**, дикий тарпан одержує статус підвиду (*Equus caballus ferus*) або (*Equus caballus*

Gmelini). Коня Пржевальського останнім часом відносять до підвиду домашнього коня *E. c. przewalski*

Зразок ще однієї класифікації [49] родини Коневі :

Ряд: Конеподібних (*Equiformes*) або непарнопалих (*Perissodactyla*)

Родина: Коневі (*Equidae*)

Рід: Кінь (*Equus*)

Вид: Кінь дикий (*E. ferus*)

Підвид: Кінь свійський (*E. f. caballus*)

Нині досить тяжко визначити , коли в степах Євразії вперше відбувся процес domestикації коней. Ця трудність пояснюється тим, що кістки диких і одомашнених коней практично однакові. Вчені Євразійського національного університету ім. Л.Н. Гумільова, (Астана, Казахстан) розглянули питання domestикації дикого коня в період енеоліта на території поселень Ботай, Червоний Яр і інших. Теоретичні докази одомашнення коней походять з трьох джерел: зміни в скелетах і зубах давніх коней; зміни в географічному розподіленні давніх коней; археологічні об'єкти, які містять артефакти, зображення змін в поведінці людини, пов'язаної з кіньми. А.В. Арциховський [50] відмітив три найбільш суттєві особливості визначення domestикації коней: хребці і грудні кістки диких тварин на стоянках людей зустрічаються мало, для домашніх тварин характерні всі частини скелету. Серед диких тварин є дуже старі індивідууми, а серед домашніх їх немає. Диких самців і самок – порівно, а серед домашніх тварин переважають самки. Угорський вчений вважає [51] , що в початковий період domestикації, навпаки, могли вбивати дорослих самців, залишаючи молодняк для одомашнення.

Групою американських вчених запропонований зовсім інший метод визначення ознак domestикації коня. Він заснований на тому, що мікроскопічна структура кісткової тканини на розпилі змінюється протягом domestикації значно раніше, ніж з'являються нові морфологічні ознаки. Цей

метод є перспективний, проте недостатня його апробація викликала ряд незадовольств із сторони спеціалістів [52] .

Археологічними доказами доместикації є і залишки коней, захоронені в могилах людей, обладнання для верхової їзди, колсниці. Отже, методика вивчення давніх місць доместикації повинна бути комплексна. Про передумови доместикації можна говорити лише тоді, якщо наявність диких предків домашніх тварин надійно зафіксоване для попереджувального доместикації періоду і якщо вони в один і той самий час були основним джерелом їжі для місцевого населення. Саме ці і інші фактори були найбільш притаманні жителям ботайської культури. Відомі в цей час факти, асоційовані з поселеннями Червоний Яр, Васильківка, які відносяться до періоду доместикації тварин на Ботаї, дозволили побудувати систему гіпотетичних моделей.

1.3.2 Аналіз хронологічної послідовності еволюції коней на території Євразії, на основі остеологічних знахідок

В еволюції домашнього коня до цього часу залишається невизначене питання про безпосереднього дикого предка. Сучасна проблема походження коня зводиться до альтернативи , що таким предком є чи тарпан, який зник більше 100 років назад чи кінь Пржевальського. Наперекір існуючому твердженню про ідентичність коня Пржевальського і тарпана, В.І. Громова рахує ці форми зовсім різними [53]. Кінь Пржевальського – форма більш архаїчна, ніби затримуюча в своїй еволюції, яка, вочевидь, бере початок від азіатських форм верхнього пліоцену. По відношенню до тарпана автор допускає два твердження: перше – його автохтонне виникнення шляхом перетворення місцевих пізньоплейстоценових коней під впливом середовища, що змінювалося. Друга версія – іміграція на територію східно-європейської рівнини більш пристосованого типу коней, можливо, з південно-західної Азії. Ймовірно те, що в філогенезі тарпан і кінь Пржевальського диференціювалися на самостійні гілки, відносно генетично

близькі. Однією з причин зникнення тарпана було, мабуть, швидке «обживання» його ареалу людьми.

На думку П.А. Косинцева дикий кінь безперервно знаходився на території Західного Сибіру протягом всього голоцену. Скорочення їхнього ареалу відбулося в ранньому голоцені внаслідок зміни клімату і ландшафтів. В середньому голоцені північна межа ареалу стабілізувалася і, мабуть, не змінювалася до історичного часу, коли дикі коні були знищені. Для визначення видової належності голоценового дикого коня на території Західного Сибіру був проведений аналіз морфометричних ознак кістокрізними методами статистики. Результати аналізу свідчать, що субфосильні залишки кісток з археологічних пам'яток Західного Сибіру періоду енеоліту (5000 – 4000 років назад) належать тарпану (*Eguus ferus*). За основними розмірними ознаками коні з різних місць Західного Сибіру виявились досить однорідними. Кінь Пржевальського від остальных коней суттєво відрізнявся індексами промірів кісток. На думку палеонтологів із Західного Сибіру в голоцені міг перебувати тільки тарпан, а кінь Пржевальського на цю територію міг проникати тільки епізодично. Ще одним доказом слугує той факт, що поряд із тарпаном не міг бути кінь Пржевальського, оскільки це не узгоджується з даними по екологічній структурі фаун копитних різних регіонів Північної Євразії протягом голоцену [54].

Однією з вагомих ознак приручення коня є здатність їх до одомашнення. У коней Пржевальського ці якості виражені дуже слабо. Досвід з одомашнення коня Пржевальського в Асканії – Новій показав часткову втрату відтворних властивостей. Всі ці факти спростовують гіпотезу походження домашнього коня від коня Пржевальського [55].

Зміна екологічних умов поступово змінювала тип коней. Формування аборигенних популяцій коней Сибіру відбувалося незадовго до появи тут монгольського коня. Версія про походження власне монгольського коня від коня Пржевальського переконливо була відкинута В.Ф. Румянцевим і Б.П.

Войтятським [56]. За припущенням П.А. Лазарева [57], сучасний Якутський кінь є безпосереднім нащадком дикого пізньоплейстоценового коня. Це підтверджується схожістю ряду краниологічних показників і кісток кінцівок. Автохтонне походження якутського коня підтверджується також тим, що в XIV-XV століттях на північ по річці Лепе біля берегів Льодовитого океану вже були аборигенні коні. За повідомленням М.Ф. Габишева [58], сучасний Якутський кінь по екстер'єру і морфологічних особливостях скелету відрізняється від монгольського, алтайського, забайкальського і приобського коней. На підставі проведених досліджень П.А. Лазарев [57], прийшов до висновку про самостійну видову приналежність коней Якутії.

П.А. Лазарев відзначив, що подальше перетворення середньоплейстоценових коней в пізньоплейстоценові було пов'язане з тенденцією до її здрібнення. Порівняльний типологічний аналіз сучасних популяцій аборигенних коней Сибіру з використанням графічного методу векторів (по Серебровському) дозволяє виділити деякі особливості. З моменту просування з північного сходу на південний захід підвищується ріст тварин, проявляється мінливість індексів статури. Встановлено закономірність поступового переходу від екоморфного типу статури (схильний до схуднення), до мезоморфного (м'язистий) і ендоморфному (розташований до повноти і набору зайвої ваги). Відносно перспектив роботи з аборигенними популяціями коней Сибіру – необхідно збереження їх генофонду.

Казахстанські археологи спільно з іноземними колегами знайшли сліди domestикації, яким 5,5 тис. років, тобто на тисячу років раніше, ніж вважалося раніше. Відкриття було зроблено поблизу селища Ботай в північному Казахстані, де степи Середньої Азії починають поступатися дорогою сибірським лісам. Це свідчить про більш ранню дату одомашнення коней, описаних в журналі Science міжнародною командою археологів [59]. Провідним автором доповіді був А.К. Outram з Університету Ексетера (Великобританія). Трохи пізніше, 5 березня 2009 р. американський журналіст

Джон Нобл Уїлфорд опублікував статтю в «Нью-Йорк Таймс», про те, що в 2009 р. вчені оголосили, що ботайці в казахських степах, напевне, першими одомашнили коней, і, можливо, після приручення, їздили на них вже близько 3500 років до нашої ери.

Дата і точні цифри domestикації коня встановлено на підставі датування кісток коней, елементів упряжі та молочних ліпідів. Так, в лабораторії Брістольського університету (Велика Британія) в 2008 р за допомогою біохімічного аналізу були виявлені сліди жирних кислот від кобилячого молока (кумису) на стінках керамічного і глиняного посуду ботайської культури, яким понад 5 тис. років. Залишки на стінках посуду були слідами кобилячого молока, що свідчить про те, що жителі Ботая знали рецепт приготування кумису [59]. Таким чином, завдяки археологічним дослідженням останніх років в Казахстані встановлено, що історія domestикації коня на євразійському континенті йде далеко в старовину - в епоху міднокам'яного століття (IV тис. років до нашої ери). Наукові дослідження Північно-Казахстанської і Кокшетауської археологічних експедицій, а також вчених з ряду зарубіжних країн на унікальному енеолітичному поселенні Ботай і інших об'єктів ботайської культури протягом 37 років (1980–2017 рр.) дозволили зробити ряд наукових відкриттів у давній історії Казахстану [60, 61, 62] і всього Євразійського континенту [63,64]. Суть наукових відкриттів полягає в наступному: 1. У степах Північного та Центрального Казахстану вперше на планеті в IV тис. до н. е. був одомашнений кінь. 2. Людство ще в IV тис. до н. е., тобто приблизно 5600 років тому, перейшло від пішої комунікації до кінної. Цей момент і був початком степової цивілізації, динамічним прискорювачем світового історичного процесу. Починаючи з IV тис. до н. е. – часу існування ботайської культури ранніх конярів Євразії – аж до індустріальної епохи XVII–XVIII ст. кінь відіграв основну роль в еволюції цивілізаційних процесів не тільки великого степу, а й на решті території Євразії. Зарубіжні вчені ґрунтознавці, геологи [65] із Сандра Олсен [66] з Карнегі Музею природної

історії енеоліту, вивчивши околиці Ботая, невеликі селища Червоний Яр та Васильківка (розташовані по сусідству, в межах однієї сотні кілометрів), встановили, що ці місця були заселені близько 5300 років тому, тобто після перших етапів приручення коня.

Хімічний аналіз ґрунтів показав набагато більш високі концентрації фосфатів в складі ґрунту всередині існуючих огорож, ніж за її межами, що вказує на щільність гною. Ґрунти всередині огорожі мали в 10 разів більше фосфору, ніж ґрунт вулиць міста. Фосфор міг знаходитися в залишках гною в обох населених пунктах, де коні перебували в загонах або стайнях. Наявність загонів та конюшень датовано 3500-3000 рр. до н.е. Оскільки, у ботайців не було великої рогатої худоби або овець, очевидно, що це був загін коней. Загони тварин, використання кінського гною в будівельних матеріалах, а також широке поширення спорядження на кшталт ласо, все це свідчило про експлуатацію диких коней. Зазначені та інші нові аргументи дозволяють стверджувати, що в Ботаї люди не тільки приручили коня, а й вся напівкочова економіка була пов'язана з цією твариною. Ці поселення розташовані в самому центрі природного ареалу степового тарпана (*Equus ferus*), дикого коня, який був наймовірнішим предком домашнього коня.

Стадо ботайської коней, на думку Н.М. Єрмолової, виглядало відносно однаково. Це були середнього розміру коні з відносно масивними кінцівками. Малюнки жувальної поверхні корінних зубів ботайської коней однотипні, зі слабо розвиненою складчастістю, що свідчить про харчування твердою злаковою рослинністю. Різноманітність в будові кісток кінцівок і висоті в холці ботайських коней також свідчить про одомашнених особин. На велику індивідуальну мінливість в розмірах посткраниального скелета, висоті в холці, властивих домашнім формам, вказує і Н.М. Єрмолова [67]. Це ж зазначено і професором В.О. Віттом у древніх коней Алтаю з курганів Пазирик [68]. Відомі дикі види, за екстер'єром і конституцією більш одноманітні в будові кісток кінцівок. Автори стверджують, що ботайські коні були «помітно більш стрункими» в порівнянні зі здоровими дикими кінями і

більш близькі до домашніх коней. Дослідження не дозволяють однозначно стверджувати, що розведення приручених в Ботай коней на той час привело до виникнення генетично відмінного нового виду. Але їх фізичні ознаки мають вражаючі відмінності, які дозволяють робити тварин більш корисними для людей як джерело м'яса і молока, а також тяглової сили і засобів пересування. За вимірами, отриманими на досить великій кількості кісток, видно, що проміри ботайського коня лежать в межах параметрів домашніх коней епохи бронзи Казахстану і Східної Європи. Спостерігається схожість з параметрами окремих кісток коня з неолітичного поселення Дерев'янка, про що свідчать факти наведені В.І. Бібіковою [69]. Тому, незважаючи на недостатню вивченість доместикаційних ознак у домашніх коней раннього часу, науковці вважають, що за отриманими промірами і з урахуванням даних археології про господарський уклад поселенців, ботайського коня можна віднести до одомашненої форми.

В.І. Бібікова вважає, що на території Південно-Східної Європи помічається два ареали археологічних пам'яток: Західний і Східний, що добре різняться кількістю в них залишків коня. Для неолітичних та енеолітичних пам'яток поселень на заході характерно мала кількість залишків коня (менше 10%), на сході ж характерна численність кісткових залишків коней. Як вважає В.І. Бібікова, зі східного ареалу, де кінь як домашня тварина була освоєна рано, вона могла епізодично проникати на суміжні території, зайняті племенами з іншим господарським укладом. Всі ці приклади по Південно-Східній Європі і Заволжжі показують, що Ботай по кількості кісток коня є вдалим прикладом поселення конярства, факт існування якого ще більш трансформує наші уявлення про розширення меж східного ареалу доместикації коней, зміщуючи їх у Казахстан.

Отже, опис матеріалів палеонтологів остаточно спростовує гіпотезу походження домашніх коней від коня Пржевальського. Навпаки, поселення ботайської культури розташовані в самому центрі природного ареалу степового тарпана (*Equus ferus*), дикого коня, який був найімовірнішим

предком домашнього коня. Саме на конях була зосереджена доісторична культура ботайців, так як більше 90% кісток тварин походять від коня. Це підтверджено аналізом остеологічних матеріалів і служить аргументом на користь степового тарпана як істинного предка домашнього коня. Аналіз отриманих матеріалів ботайської культури дозволяє зробити висновок, що найбільш імовірним періодом початку одомашнення (доместикації) дикого коня слід вважати - початок IV тисячоліття до н.е.

Проте, повністю питання про ступінь доместикації та походження домашнього коня фахівцями не вирішене.

1.3.3 Походження та доместикація коня у дослідженнях з молекулярної біології

Як уже зазначалося походження свійського коня та історія сучасних порід залишаються нез'ясованими у більшості аспектів. Пов'язано це з незначною відмінністю кісток свійського та дикого коня. На відміну від собак і свиней, пластичність скелета роду *Equus* дуже слабка. Такі різні види, як зебра та віслик, майже не відрізняються при дослідженнях, що засновані на їхніх кісткових рештках [70]. При вивченні такого складного явища, як доместикація коня, досить доцільним є використання досліджень із популяційної генетики. Аналіз та головні здобутки популяційної генетики з питання доместикації коня останніх десятиріч висвітлені в наукових доробках генетиків та молекулярних біологів Європи, Америки та Азії [72–76].

Перша лабораторія, яка спрямувала свої дослідження на розв'язання питань, пов'язаних з доместикацією коня, була шведська група вчених під керівництвом К. Віла [6]. Серед археологів і палеонтологів у кінці XX ст. були розроблені дві альтернативні гіпотези походження свійського коня (*Equus ferus caballus*) від диких популяцій (*Equus ferus*). Гіпотеза обмеженого походження передбачає, що доместикація коня відбувалася на основі відбору обмеженої кількості диких коней із небагатьох осередків

доместикації. Після чого вже свійський кінь потрапляє до інших регіонів. Інша альтернатива припускає, що у процесі доместикації брала участь більша кількість засновників, набраних протягом тривалого часу з широкого кола євразійських коней. Відповідно цій думці кілька коней з різних диких популяцій були доместиковані незалежно один від одного. К. Віла та ін. звернули увагу, що ці дві гіпотези виникнення свійського коня дають різні прогнози стосовно генної мінливості мтДНК, яка повинна була віддзеркалювати спадковість на материнських лініях. Гіпотеза обмеженого походження передбачає, що мітохондріальне розмаїття коня мало бути обмеженим кількома засновницькими родоводами та тими, що у подальшому розвивалися з них завдяки мутаціям [75]. Гіпотеза багаторазового одомашнення, на противагу цьому, прогнозує більшу різноманітність, нехарактерну для однієї популяції диких особин і розгалуження родоводів, які б передували першим свідченням доместикації [75].

Враховуючи 4000 р. до н. е., який дослідники обрали в якості дати можливої доместикації коня, багато материнських ліній повинні бути включені до генофонду свійського коня [75]. На думку К. Віла та ін., висока різноманітність материнських ліній, що спостерігаються у сучасних коней, передбачає використання диких коней з великої кількості популяцій у якості засновників свійського коня [75].

Інша група вчених у 2002 р. на чолі з Т. Янсенем для визначення походження свійського коня від однієї чи кількох диких популяцій розшифрувала гіперваріабільну частину мітохондріальної D-петлі для 318 коней із 25 східних та європейських порід, зокрема й американських мустангів. Загальна база дослідження склала 652 послідовності. Була уточнена середня швидкість розгалуження послідовності мтДНК родини equidae з урахуванням об'єднання палеонтологічних інтерпретацій (3,5 млн р.) [87; 74; 75; 76; 77;] з опублікованими у 2000 р. послідовностями мтДНК equid (1 млн р.) [78]; як результат було вираховано максимальну частоту мутацій на рівні 1 мутації на 100 тис. років і мінімальну швидкість – 1

мутація на 350 тис. р. [79]. Генетики поставили собі за мету вирахувати найменш можливу кількість кобил, колись одомашнених з дикої природи, приймаючи кількість типів мтДНК вибірки та усуваючи частки типів мтДНК, які виникли між найбільш раннім можливим часом доместикації коня та сучасністю. Виходячи з поставлених завдань, найбільш раннім імовірним часом доместикації дослідниками була обрана дата закінчення льодовикового періоду 9400 р. до н. е. [79]. За основу дослідження було взято найбільшу ймовірну швидкість мутації – 1 мутація на 100 тис. років. Дослідження частоти мутацій кінської мтДНК показало, що щонайменше 77 вдало доместикованих диких кобил брали участь у формуванні сучасного *Equus ferus caballus* [80;79]. Ці 77 типів кобил майже настільки ж різноманітні, як і весь спектр мтДНК сучасних коней.

Т. Янсон та інші дослідники виокремлюють мтДНК кластера Е, котрий цілком складається з ісландських, шотландських та фьордських поні [79]. Це наводить на розуміння спільного пізньольодовикового або післяльодовикового походження цих порід поні. Т. Янсон та інші дослідники звернули увагу на можливість збереження у кінських гаплотипів географічної структури. Ще один мтДНК кластер D1 демонструє зв'язок із певними породами коней. Він широко представлений у дослідженні, проте з максимальною частотою зустрічається у піренейських (андалузька порода та порода Лузітано) та північноафриканських коней (берберська порода). Цілком очікувано, що досить високий процент американських мустангів (31 %) також належать до цієї групи [79].

На думку багатьох вчених, коні піренейського півострова, найімовірніше, довгий час перебували в ізоляції від інших популяцій, тому процеси їхньої доместикації можуть відрізнятися від загальносвітових [83]. Через це багато дослідників розглядають піренейські породи окремо від інших порід Європи.

Так, португальські та іспанські генетики під керівництвом М. С. Лопеса [81] та Дж. Руйо [82] філогенетичні дослідження спрямували на вивчення

походження, притаманне європейським популяціям, кластера D1, до якого, за Т. Янсоном, у першу чергу, належать піренейські, північноафриканські породи та мустанги американського контенту. В цілому обидва дослідження підтверджують та певною мірою засновані на висновках, зроблених групами К. Віла [75] та Т. Янсона [79] про включення кількох материнських ліній з різних географічних районів протягом тривалого процесу одомашнення [83]. Секвенування ДНК – визначення їхньої амінокислотної або нуклеотидної послідовності, зв'язок між піренейськими та північноафриканськими породами, багато особин яких мають спільний гаплотип D1, передбачає два ймовірних пояснення. По–перше, це можливий результат відносно нещодавньої інтрогресії (гібридизації) північноафриканських коней берберської породи на Піренейському півострові під час мусульманського завоювання у середні віки. По-друге, можна розглядати цей кластер як родову популяцію Піренейського півострова з пізнішим розповсюдженням на північноафриканські породи. Слід наголосити, що майже немає порід коней, що були б наділені єдиним гаплотипом, не виняток і породи з Піренеїв. Так, андалузські коні згруповані щонайменше ще у чотири інші кластери [88], а коні породи лузітано ще у три [81].

За даними М. Сізлака, велика кількість генетичної різноманітності присутня у диких коней до моменту domestикації, за який, посилаючись на статтю А. Оутрама [35], у цьому дослідженні прийнятий 3500 р. до н. е. Нешироке місце, що мала б викликати domestикація, повинно було значно скоротити генетичні варіації. Проте результати більшості досліджень [70, 75] демонструють, що це правило лише частково має відношення для коней. У загальній кількості 87 гаплотипів було знайдено в археологічних рештках (від плейстоцену до середньовіччя). У цілому, 32 % (тобто 9 з 28 гаплотипів) диких ліній (від плейстоцену до неоліту) збереглися у генофонді свійських коней до нашого часу. Сім з цих диких ліній були також виявлені у домашніх коней доби бронзи та раннього залізного віку, решта зразків, що збереглися, походить із середньовіччя. Якщо ми беремо до уваги усі 87 давніх гаплотипів

то 29 з них були виявлені у пробах доби бронзи, 47 гаплотипів у ранній залізний вік та 21 гаплотип знайдено у добу середньовіччя [70]. 274 заархівованих гаплотипів сучасних коней (19 червня 2010 р.). Лише 45 % варіацій мтДНК, виявлених групою М. Сізлака, збереглися у сучасних коней (тобто 39 з 87 гаплотипів), якщо рахувати від зразків свійських коней доби бронзи до сьогодення то втрачено 30 % (17 з 56) материнських ліній протягом 5500 років конярства [70, 75].

Навіть враховуючи цей факт, кількість генетичних варіацій сучасних коней однак залишається дуже великою як для свійської тварини. Наявність такої кількості генетичних ліній дослідниками пояснюється такими причинами: 1) кілька областей domestикації; 2) дуже велика кількість кобил-засновників; 3) значні інтрогресії місцевих ліній у свійські популяції. Дослідники не виключають, що всі три причини сприяли сучасному стану [7, 8]. У цілому одним з головних результатів дослідження М. Сізлака та ін. є доказ гіпотези, що велика кількість різноманітності кінської мтДНК притаманна не тільки свійським, а і диким популяціям до н. е. [70, 76]. До того ж, дані про коней доби бронзи та заліза вказують на місцеве одомашнення та / або інтрогресії гаплотипів Східної Азії. Розвиток цих окремих східноазійських гаплотипів було розширено за рахунок географічної ізоляції монгольських і китайських диких коней [70, 76]. За даними групи генетиків, у пізньому плейстоцені існувала панміктична популяція 20 коней у межах сибірської низовини до Піренейів. Широке розповсюдження гаплогруп В1 (Європа, Північно-Східний Сибір та Аляска), Х8 (Північно-Східний Сибір та Аляска), Х3 (Північно-Східний Сибір та Ірландія), а також гаплотип А (Німеччина, Україна та Північно-Східний Сибір) надає підтримку гіпотезі значного поширення генного потоку по всій Євразії. Пізніше, у ранньому голоцені та протягом енеоліту, відбувалося генетичне розгалуження піренейських та євразійських коней степу [70, 76]. Як і попередні дослідники [88; 89; 90], Сізлак та ін. свідчать про відсутність переконливих доказів для незалежного процесу domestикації коней на Піренейському півострові.

З появою нових технологій секвенування ДНК, (ДНК-мікрочип 21 та ін.) з'явилася можливість збільшити швидкість розшифрування повних зразків мтДНК коня та їхнє використання у дослідженнях, що вигідно відрізняло ці дослідження від попередніх, де була розшифрована лише так звана гіперваріабельна частка D-петлі мтДНК. Себастьян Ліпольд та ін. за допомогою методу ДНК-мікрочипу повністю розшифрували мтДНК 59 коней з 44 порід та одного коня Пржевальського з метою побудови філогенетичного дерева та визначення часу доместикації коня [84]; разом з даними, отриманими у GenBank, кількість повністю розшифрованих мтДНК коней збільшилася до 63. Для того, щоб визначити час доместикації коня, авторам був потрібен критерій, який би відповідав поставленому завданню і його можна було б дослідити за допомогою генетичних методів. Таким критерієм, на думку дослідників, виступає ефективний розмір популяції та його зміна у часі. Дослідження показало чітке та постійне збільшення коней, яке почалося приблизно 7 тис. років тому [84, 73]. Археологічні рештки викопних коней, що датуються раннім голоценом, зустрічаються в Європі у незначній кількості, лише починаючи з кінця атлантичного періоду (7500–5750 років тому), їхня кількість починає зростати, що, на думку С. Ліпольда та ін., може також свідчити про збільшення популяції коней, принаймні в Європі [24, 4]. Ця гіпотеза також знаходить підтвердження тим фактом, що підвищення чисельності популяції коня (6–8 тис. років тому) впритул наближається до дати одомашнення коня від 5 до 5,5 тис. років. [85; 86]

Дослідження мтДНК, пов'язані з доместикацією коня дають такі узагальнюючі результати:

1. Свійські коні, принаймні кобили, не можуть виходити з одного ареалу доместикації. У генофонді сучасних свійських коней є наявність великої кількості материнських ліній. За даними Т. Янсона їх щонайменше 77 [15, 10909], за результатами С. Ліпольда – 33 [84, 74].

2. Група К. Віла вважає, що висока різноманітність материнських ліній, яка спостерігається у сучасних коней, передбачає багато осередків

доместикації, де були задіяні коні з великої кількості різних популяцій [6, 476]. Група Т. Янсона пов'язує отримані результати з просування знань про одомашнення разом з самими тваринами та змішування свійських коней зі своїми дикими родичами вже після доместикації [79]. М. Сізлак та ін. вважають, що таку кількість генетичних ліній можна пояснити існуванням кількох областей доместикації, дуже великої кількості кобил-засновників та значними інтрогресіями місцевих диких ліній у свійські популяції [84, 70].

3. Філогеографічна структури мтДНК свійських коней вирішується генетиками неоднозначно. Ціла група вчених взагалі не визнає можливості простежити цю структуру. Окремі вчені виділяють певні гаплогрупи. На підставі філогеографічних та ін. досліджень мтДНК основним ареалом доместикації, буде Західний, Західно-Європейський та Східно-Азійський степи.

4. Генетична мітохондріальна різноманітність характерна не тільки для свійських коней, а й для всього виду *Equus Cabulus*. Тобто, популяції диких коней вільно розмножувалися на величезній території.

1.3.4 Молекулярно-генетичні методи аналізу ДНК коней

Вивчення геному різних порід коней і генів, що контролюють властивості, які цікавлять людину, сприяють збільшенню ефективності селекції і підтримку оптимального рівня генетичної різноманітності. Розміри популяцій багатьох порід коней значно знизилися в XIX і на початку XX століть. Подібно до інших видів домашніх тварин, деякі породи коней виявилися на межі вимирання через невідповідність сучасним вимогам сільського господарства та іншим потребам людини. Характеристика генетичної структури популяцій може стати першим кроком до збереження та відновлення породи і внести внесок в її подальшу селекцію [91].

Для вивчення мінливості геному коней Поряд з білковими маркерами [39, 41] в молекулярно–генетичному моніторинзі кролів все більш стають поширеними ДНК-маркери [40]. ДНК – маркери, створені на основі полімеразно – ланцюгової реакції (ПЛР), об'єднують в два основні класи: маркери, створені на основі невеликих змін до нуклеотидної послідовності ДНК унікальних локусів і маркери на основі зміни числа повторів тандемної послідовностей ДНК [34]. RAPD–маркери засновані на ПЛР із застосуванням праймерів з довільною, випадковою послідовністю. Для синтезу таких праймерів немає необхідності в знанні конкретних нуклеотидних послідовностей геному досліджуваного організму [94 - 100]. Праймери з довільною послідовністю повинні лише відповідати певним вимогам по співвідношенню GC-пар (близько 60%) і довжині.

Суть методу полягає в ампліфікації фрагментів ДНК з використанням одиничного короткого праймера з низькою температурою відпалу у реакції ПЛР. Праймер зв'язується з геномною ДНК у двох різних ділянках інвертованих повторів.

При електрофоретичному розподілі ампліфікованих продуктів утворюються дискретні продукти, розмір яких варіюється від 100 до 5000 п.н. (ДНК – патерни). Ці фрагменти мають анонімну, як правило, унікальну послідовність ДНК, укладену між двома інвертованими повторами. Відмінності в ДНК – патернах визначаються відмінностями в одному або обох праймер - зв'язуючих сайтах (наявність або відсутність смуги ПЛР - продукту в спектрі) або присутністю інсерцій / делеції в ампліфікованому фрагменті (відмінності ПЛР – продуктів за розміром). Більшість RAPD-маркерів є домінантними (наявність / відсутність смуги в ДНК – патерні) [101].

Пізніше були запропоновані інші подібні технології: DAF (DNA Amplified Fingerprinting) [101] і ЗП ПЛР (ПЛР з універсальними праймерами) [102,103]. Всі описані методики різняться розмірами праймерів (10–12 нуклеотидів у разі RAPD, близько 20 нуклеотидів у разі AP–PCR, 7–8

нуклеотидів у разі DAF і 25–27 нуклеотидів у разі ЗП–ПЛР), їх складом (від 50 до 80 % ГЦ–пар), температурою відпалювання і методами виявлення продуктів реакції (фарбування бромистим етидієм, радіоавтографія, сріблення). RAPD – аналіз може служити своєрідним експрес-методом виявлення генетичного поліморфізму, що особливо актуально для маловивчених таксономічних груп тварин.

RAPD застосовується також для геномного маркування в популяційних і еволюційних дослідженнях. [104].

Для дослідження варіабельності геному в цілому може бути також використаний метод аналізу AFLP. Цей метод також не вимагає ні попереднього клонування, ні секвенування ДНК. Особливості цього підходу полягають у використанні в якості матриці рестрикційних фрагментів ДНК зі специфічними олігонуклеотидними адаптерами і проведення виборчої ампліфікації із спеціально сконструйованими праймерами. З кожною парою праймерів ампліфікують 75-100 фрагментів (AFLP - фінгерпрінтинг), які розділяють в агарозному або поліакриламідному гелі. Оскільки кожен фрагмент є унікальним сайтом, кількість локусів, аналізованих одночасно з кожною комбінацією праймерів, набагато більша, ніж за будь – якої іншої техніки аналізу поліморфізму ДНК. З одного гелю, зазвичай, вдається отримати до 40 поліморфних локусів. Цей тип поліморфізму ДНК також має домінантний тип успадкування. AFLP–маркери часто успадковуються як тісно зчеплені кластери в районі центромери або теломери хромосом, але спостерігається і випадковий розподіл маркерів поза цими кластерами, що дозволяє, використовуючи цей підхід, швидко генерувати сотні маркерів [110]. AFLP-маркери були успішно використані для геномного картування [111], в популяційних і філогенетичних дослідженнях [112].

Генотипування за мікросателітними локусами отримало широке поширення у популяційній генетиці, а саме при розв’язанні таких актуальних питань, як контроль генетичної структури сільськогосподарських видів, вияв породоспецифічних особливостей їх генофондів [91]. Міжнародною

асоціацією з генетики тварин (ISAG) розроблені тест системи для різних сільськогосподарських видів, рекомендовані при генетичній паспортизації тварин, оцінці міжпородних взаємозв'язків і консолідованості порід. Проте, закономірності і причини відмінності в поліморфізмі окремих мікросателітів, видоспецифічність такої мінливості до цього часу залишаються недостатньо вивченими. Для встановлення рівня поліморфізму геному в цілому і для диференціації порід сільськогосподарських тварин найкраще підходять мультилокусні ДНК–маркери. Для тварин сільськогосподарських видів більш простим і ефективним методом полілокусного генотипування призначається використання фрагментів мікросателітних локусів в якості ПЛР- праймерів, за допомогою яких можна оцінити поліморфізм десятків фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами [93].

Із використанням ISSR–PCR маркерів можна отримати полілокусні спектри фрагментів ДНК, поліморфізм яких досить надійно відрізняє одну породу коней від іншої [94]. Маркери ISSR-PCR нині отримали широке застосування для таксономічного і філогенетичного порівняння і як засіб картування широкого спектру організмів. Порівняно з іншими методами мультилокусного профілювання він характеризується кращою відтворюваністю. При допомозі ISSR–PCR маркерів отримані геномні фінгерпринтери ряду ссавців, птахів, риб, рептилій і рослин [96, 99]. Для обліку генетичної різноманітності порід сільськогосподарських тварин проводять підготовчий підбір найбільш інформативних ISSR-PCR маркерів. (Глазко і ін., 2013; Glazko et. al, 2016 року; Erkenov et al, 2017) [92. 97, 101].

З метою виявлення інформативності ISSR–PCR маркерів (найбільший поліморфізм спетрів) дослідники [102] протестували 14 ISSR-праймерів ((AC)₈CG, (AC)₈CC, (AC)₈T, (TG)₈AA, (TG)₈GC, (AG)₈CA, (AG)₈CG, (CTC)₆C, (GAG)₆C, (ACG)₇G, (ACG)₇G, (CA)₆GT, (GA)₆GG, (GA)₆CC) на тракененській, орловській рисистій та ваговозних породах коней, які містили послідовності ди–і тринуклеотидних мікросателітних мотивів з додаванням одного або двох якірних нуклеотидів на 3'-кінці.

Було встановлено, що для *E. caballus* найбільш інформативними (найбільший поліморфізм спетрів ділянок геномної ДНК) є в залежності від числа нуклеотидів в коровому повторі: три динуклеотидних праймера: (GA)₆CC; (AG)₈CA; (AG)₈CG та два тринуклеотидних: (CTC)₆C; (GAG)₆C.

1.3.5 Генетичний поліморфізм порід домашнього коня за ISSR-PCR маркерами

За даними FAO, в теперішній час особливої актуальності набувають питання, пов'язані зі збереженням генетичних ресурсів місцевих порід тварин сільськогосподарських видів, їх генетичного і фенотипового різноманіття [105, 106]. Це пов'язано з тим, що місцеві (аборигенні) породи, зокрема, коні мають унікальний адаптивний потенціал. Вони можуть проживати в районах неблагополучних за кліматичними та географічними умовами, з мінімальним використанням харчових ресурсів і людської праці [103]. Особливий інтерес в цей час набувають породи коней, адаптовані до високогірної гіпоксії, оскільки виявлено, що деякі механізми такої адаптації є загальними для домашніх коней і людини [287]. Генетична основа такої адаптації тварин до навколишнього середовища (зокрема до високогірної гіпоксії) все ще вивчається (Simonson et al., 2010).

Генетичний поліморфізм порід домашнього коня за ISSR-PCR маркерами було розглянуто групою вчених [107, 108] на прикладі карачаєвської аборигенної породи коней. Для з'ясування популяційно-генетичних характеристик груп карачаєвських коней було виконано полілокусне генотипування (геномне сканування) із використанням оцінок поліморфізму ділянок геномної ДНК, фланкованих інвертованими повторами фрагментів мікросателітів (AG)₉C, (GA)₉C, (GAG)₉C із чотирьох господарств. Одержані результати показали, що найбільш консервативними фрагментами праймера (GA)₉C у коней 4 господарств були амплікони розміром 550–580, 590–640, 720–760 пн. За праймером (AG)₉C найбільш

поліморфними були локуси 910-940, 900-870, 720-670, 470-440 пн і тринуклеотидний праймер (GAG)⁹C виявив самі поліморфні ділянки в 950-980 та 1060-1110 пн. На підставі генотипування був проведений аналіз генотипів коней різних мастей. Отримані результати показують, що тварини з караковою мастю мають більш унікальну генетичну структуру в порівнянні з кіньми гнідої і вороної мастей і мають свої особливості за походженням, що відрізняють їх від інших коней карачаєвської породи. Отримано дані, що свідчать про досить високий ступінь консолідованості дослідженої групи тварин. Виявлено, що в середньому індекс генетичної ідентичності між тваринами дорівнює 0,8105.

Генотипування за мікросателітними локусами отримало досить широке поширення в популяційній генетиці, особливо при вирішенні таких актуальних завдань, як контроль генетичної структури популяцій с.-г. видів і виявлення породоспецифічних особливостей їх генофондів. Виконане дослідження дозволило оцінити консолідованість та внутрішньопородні взаємозв'язки карачаєвської породи коней. Такі дослідження можуть дозволити надалі виявляти особливості генетичної структури популяцій різних породи і підійти до опису «генофондного стандарту» породи, що сприятиме збереженню та вдосконаленню карачаєвської породи коней [109].

Оцінку міжпородної диференціації коней арабської, орловської рисистої, новоолександрівської ваговозної, чистокровної верхової та коней Пржевальського за двома праймерами (AGC)⁶G та (ACC)⁶G здійснили науковці Національного університету біоресурсів і природокористування України [110]. Використання двох праймерів дало можливість визначити консервативні зони ампліфікації, наявні у всіх дослідних коней, незалежно від породи. Такими локусами є локуси розмірами: 1270, 970, 920, 670 і 420 пн, частота яких склала 1,00. Поряд із спільними ампліконами, характерними для всіх протестованих коней, виявлені і породоспецифічні. Так, фрагменти розміром 1070, 820, 760, 650 і 530 пн були характерні лише для коней новоолександрівської ваговозної породи і зустрічалися із частотами 0,375,

0,500, 0,625, 0,750 і 1.00. Найдовший приватний алель розміром 1400 пн виявлений лише у орловських рисаків. Для коня Пржевальського були характерні два приватних алелі розміром 1360 і 850 пн. Амплікон розміром 380 пн був відмічений у верхових порід коней і коней Пржевальського.

Отримані результати свідчать, що полілокусні спектри ISSR-PCR маркерів мають виражену породну специфічність, їх поліморфізм залежить від фрагмента мікросателітного локусу, що використовується в якості праймера і дозволяє виявити як специфічні особливості поліморфізму різних геномних ділянок, так і консервативні за довжиною фрагменти ДНК. Найбільш поліморфною за обома маркерними системами виявилася новоолександрівська ваговозна порода. Виявлено приватні алелі для коней чистокровної верхової, орловської рисистої, новоолександрівської ваговозної порід та коней Пржевальського, які можна вважати абсолютними маркерами при їх ідентифікації. [110].

Ряд вчених [111] займалися вивченням алтайської породи. Алтайська порода характеризується низкою унікальних якостей □ пристосованістю до різко континентального клімату, міцним здоров'ям і невибагливістю, високою працездатністю. Завдяки пристосованості алтайських коней до цілорічного утримання на пасовищі (в зимовий період здатні добувати корм з-під снігу) порода цікава для м'ясного табунного конярства. У зв'язку з відсутністю витрат на придбання та зберігання кормів табунне м'ясне конярство високо рентабельне. Для збільшення м'ясної продуктивності і робочих характеристик, включаючи витривалість, коні місцевої алтайської породи поліпшувалися важковозними породами. Науковці здійснили порівняльний аналіз генофондів популяцій порід коней, що істотно різняться між собою за походженням та напрямом використання – локальної робочої і м'ясної алтайської породи та групи спортивних рисистих порід – орловських, американських, російських рисаків і їх помісей за допомогою – ISSR-PCR маркерів [112, 113].

За результатами досліджень встановлено, що для коней алтайської породи частка поліморфних локусів перевищувала 75%. Межі довжин продуктів ампліфікації ДНК були приблизно однакові в спектрах різних праймерів, за винятком спектрів праймера (СТС)6С, в яких довжини фрагментів ДНК дещо зміщено в більшу сторону. В спектрі праймера (GAG)6С тільки один фрагмент ДНК із 13 був консервативним і був присутній у всіх досліджених коней алтайської породи.

В спектрах праймера (AG)9С були присутні з високою частотою фрагменти довжиною 800, 650 і 580 пар нуклеотидів (пн), а три фрагменти, 1100, 680 і 400 пн, зустрічалися майже у всіх особин. Значно менше зустрічався фрагмент довжиною близько 320 пн. Найбільші відмінності серед ампліконів у двох груп коней алтайської породи спостерігалися за фрагментами ДНК довжиною 320 і 370 пн.

В спектрах праймера (GA)9С виявлено два консервативних фрагменти ДНК, що зустрічалися у всіх досліджених коней алтайської породи, довжиною 390 і 600 пн. У більшості тварин були присутні фрагменти ДНК із довжинами 510 і 900, 780 і 370 пн. Найменша частота була у фрагмента ДНК довжиною 1000 п.н. За спектрами праймера (GA)9С не виявлено суттєвих відмінностей між двома групами коней алтайської породи з різних господарств.

В спектрах ампліконів праймера (GAG)6С виявлений тільки один консервативний фрагмент ДНК, що зустрічався у всіх алтайських коней, довжиною в 400 пн. У більшості особин в спектрах присутні три фрагменти ДНК завдовжки 590, 650 і 700 пн. Рідше зустрічалися фрагменти довжиною 1280, 1180 и 920 пн.

Нарешті, в спектрах праймера (СТС)6С у обох досліджених груп алтайських коней завжди присутні фрагменти ДНК завдовжки 510 і 790 пн. З великою частотою зустрічалися фрагменти довжиною близько 900 і 1100 пн. Найбільш важкі фрагменти (1500 і 1430 пн) були самими рідкісними.

Порівняльний аналіз генофондів алтайської породи і рисистих порід за ISSR-PCR маркерами, виявив відмінності спектрів продуктів ампліфікації фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами чотирьох мікросателітів у досліджених груп коней різного походження. Діапазон поєднань фрагментів ДНК чітко відрізняє геноми коней алтайської породи від рисистих порід.

Отже, відносно підвищений рівень поліморфізму фрагментів геномної ДНК, фланкованих інвертованими повторами мікросателітів, дозволяє отримати уяву про генетичну структуру групи тварин з високою роздільною здатністю. Саме для оцінки популяційно-генетичної та ступеня внутрішньопородної диференціації порід коней і застосовують метод ISSR-PCR маркування [114].

1.4 Дослідження мутагенної і токсичної активності паратипових чинників різної природи при допомозі *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Основні генетичні процеси в більшості живих організмів перебігають за універсальними механізмами. Це дає можливість вивчаючи генетичні закономірності модельного виду, дійти розуміння загальних принципів спадковості й мінливостів усіх організмів. (Козерецька). Плодова мушка *Drosophila melanogaster* вже більше ста років успішно служить універсальною моделлю в різних генетичних дослідженнях. За цей час на дрозофілі був зроблений цілий ряд знаменних відкриттів, що стосуються структури гена, генетичного зчеплення, механізмів мутагенезу і рекомбінації, генетичної нестабільності і мікроеволюційних процесів у популяціях. Дрозофіла як модель допомогла зробити найважливіші фундаментальні відкриття і в області біології розвитку: з її допомогою були розшифровані базові консервативні генетичні механізми, що регулюють окремі етапи індивідуального розвитку [115]. Дрозофіла є зручним об'єктом для дослідження генетичних механізмів метаболізму старіння та тривалості життя, а також використовується як модельний організм для з'ясування біологічної активності та скринінгу на

мутагенність та токсичність різних ксенобіотиків та хіміопрепаратів біологічного походження. Важливість цього об'єкту для з'ясування проблем медицини була відзначена Нобелівською премією, врученою медикам-фізіологам Ed Lewis, Christiane Nusslein-Volhard and Eric Wieschaus у 1995 р [116]. Мутантні особини дрозофіли з дефектами в будь-яких з декількох тисяч генів доступні для експериментів, і весь геном мухи в цілому вже відомий [117; 118]. Із розшифрованих на молекулярному рівні 289 генів людини, пов'язаних з його хворобами, 177 генів мають ортологів у *D. melanogaster* і 150 – у *C. elegans* [119]. Це означає, що багато питань молекулярної біології цих генів, їх фенотипові прояви і взаємодії з іншими генами можуть вирішуватися на такому дешевому і доступному матеріалі, яким є дрозофіла [120].

Томас Хант Морган, працюючи у Колумбійському університеті, почав використовувати плодових мушок у 1910 році з метою експериментів із дослідження спадковості. Лабораторія Моргана називалась “Кімната мух” (англ. “Fly room” – авт.), в якій науковці разом зі студентами вивчали закони спадковості. Дрозофіла меланогастер була одним з перших організмів, яку використовували для генетичних досліджень. І на сьогодні вона залишається такою ж. Це найбільш детально вивчений вид із усіх еукаріотичних організмів. У Дрозофіли меланогастер детально маповані усі хромосоми і досліджені усі мутації... Цю маленьку мушку використовують, як модель, адже усі живі організми на Землі побудовані за однією і тією ж загальною генетичною схемою. Тому, розуміння генетичних процесів, наприклад, транскрипції чи реплікації у плодових мушок, можна перенести, екстраполювати на інших еукаріот, включаючи людину.

Дрозофіла має тільки чотири пари хромосом: три аутосоми і одну статеву хромосому. Повний геном дрозофіли був послідовно розшифрований і вперше опублікований в 2000 році [121].

Близько 75% генів, що пов'язані з хворобами людини, наявні й у *геномі DROSOPHILA MELANOGASTER*, а понад 50% білків цієї мухи гомологічні

білкам ссавців, куди належимо і ми. Дрозофілу успішно використовують для моделювання тяжких нервових захворювань людини, наприклад, хвороби Паркінсона, Альцгеймера, Гантінгтона, спиноцеребральної атаксії та інших. Окрім того плодова мушка стала об'єктом для досліджень оксидативного стресу, імунологічних тестів, діабету, раку, передозування наркотиками та багато іншого [122].

Отож, незважаючи на те, що плодова мушка має доволі просту будову організму, однак, вона має такі ж молекулярні механізми як і всі інші тварини. Саме тому вона є вигідною для досліджень з генетики, фізіології, патогенезу та інших біологічних наук.

1.4.1. Використання DROSOPHILA MELANOGASTER як модельного об'єкту в області генетики

Drosophila melanogaster (в перекладі з латинської означає “та, що любить росу, вологу, прохолоду”; меланогастер – “з чорним черевцем”) – важливий об'єкт генетичних досліджень, якому належить видатна роль в розробці широкого кола проблем сучасної генетики [123]. Вона є популярним модельним об'єктом, не тільки в області генетики, але і імунології та фізіології, завдяки таким особливостям, як [122]: короткий життєвий цикл, в порівнянні з щурами і мишами; • висока плодючість, самка може відкладати сотні запліднених яєць, що спрощує статистичний аналіз; • ембріональний розвиток поза тілом, що дає можливість спостерігати ембріон на кожному етапі розвитку; • відносно невеликий геном (менше однієї десятої генома щура); • мутації можуть бути спрямовані на конкретні гени. Дослідження на дрозофілі заклали основи уявлень генетики про природу гена, генетичного зчеплення, сегрегації хромосом при мітозі і мейозі, механізмів мутагенезу і рекомбінації, генетичної нестабільності і мікроеволюційних процесів в популяціях. Ряд теоретичних питань генетики – штучне отримання мутацій і природа гена, визначення статі і локалізація статевих факторів в хромосомах, проблема гена, генетика популяцій, механізм расо- і видоутворення та багато інших проблем – інтенсивно вивчаються на дрозофілі протягом останніх

років і дають дуже важливі результати для вирішення не тільки спеціальних питань генетики, а й загальної біології та еволюції видів[124].

На протязі кількох десятиріч дослідження з використанням дрозофіли проклали шлях до розуміння центральних регуляторних механізмів, що лежать в основі розвитку тварин. Під час яких було виявлено ряд сигнальних систем, таких як Notch, Wnt та hedgehog, порушення в яких у теперішній час визнані головними факторами виникнення широко розповсюджених людських захворювань, у першу чергу онкологічних, серцевосудинних, нервових розладів[125, 126]. Дослідження на дрозофілі відіграє ключову роль у розумінні фундаментальних біологічних процесів, які безпосередньо зв'язані зі здоров'ям людини, таких як васкулогенез, вроджена іммуна відповідь, диференціація і збереження стовбурових клітин, клітинна і тканинна полярність, регуляція росту, утворення морфологічних структур, навчання та пам'яті, нейронна сітка та міжсинаптична передача, циркадні ритми, тривалість життя. Мушка також часто використовується для вивчення механізмів, що лежать в основі імунітету, діабету, раку і наркотичної залежності. Близько 61% відомих людських хвороб мають відповідність в генетичному коді плодової мушки, 50% білкових послідовностей мають аналоги у ссавців[126, 127]. Основні біохімічні процеси в клітинах *Drosophila melanogaster* і ссавців ідентичні. Під час процесу метаболізму у *Drosophila melanogaster* відбувається мікросомальна активація речовин. У результаті цього промутагени перетворюються у мутагени. Це дозволяє виявляти приховані мутагени, які набувають генотоксичність в процесі метаболізму. Тести з використанням *Drosophila melanogaster* рекомендовано ВОЗ для дослідження мутагенної і токсичної активності ксенобіотиків[288, 289]. . Одним з прикладів є застосування тестів з використанням *Drosophila melanogaster* при дослідженні штучних харчових ароматизаторів.

Актуальним питанням сьогодення є зростання попиту на харчові добавки, що викликані розвитком сучасних технологій отримання харчових продуктів на основі глибокої переробки сировини. Харчова промисловість

навчилася не тільки витягати аромат з натуральної сировини, а й синтезувати його в ході хімічних процесів. Основною проблемою є вивчення можливості використання штучних ароматизаторів у дозах безпечних для фізіологічного стану організму. Закон України «Про якість і безпеку продуктів і продовольчої сировини» трактує харчові добавки як «будь-яка речовина, яка зазвичай не вважається харчовим продуктом або його складником, але додається до харчового продукту з технологічною метою в процесі виробництва, та яка у результаті стає невід'ємною частиною продукту». Це - барвники, емульгатори, консерванти, антиоксиданти, згущувачі, підсолоджувачі, ферментні препарати тощо. Ароматизатори, за європейським законодавством, вже давно не вважають харчовими добавками [128, 132, 135, 136]. Харчовий ароматизатор - це запашні речовини (препарати та окремі натуральні, ідентичні натуральним, синтетичні ароматизатори), які використовуються у виробництві харчових продуктів та напоїв у невеликій кількості з метою надання готовим продуктам специфічного аромату. Джерелами ароматизаторів є запашні есенції (запашні олії), настої, прянощі та продукти їх переробки, речовини хімічного і мікробіологічного синтезу [129]. Ароматизаторами також називають добавки, які вводять в деякі побутові вироби (наприклад, в вироби з пластмаси, гуми для дезодорації, ароматизації синтетичної шкіри під натуральну і т. д.)

Постановка дослідження передбачала використання базового живильного середовища, яке розподіляли на 3 частини. У першу частину живильного середовища ароматизатори не додавали. У другу частину середовища, після його охолодження до 50-60°C інсуліновим шприцом додавали рекомендовану дозу обраних ароматизаторів (1мл ароматизатора на 1 кг середовища). У третю частину обрані ароматизатори вводилися у десятикратному збільшенні відносно рекомендованої дози (10 мл ароматизатора на 1 кг середовища). Піддослідні живильні середовища розливали у стерильні пробірки. У кожную пробірку з живильним середовищем поміщали по 5 самок і 6 самців. При появі перших лялечок

(через тиждень після схрещування) батьківські форми вилучали з пробірки. Підрахунок мух проводили через 5 діб з моменту вилучення батьків – перший раз, другий раз через наступних 5 діб. [123, 134]. Аналізуючи кількість одержаних потомків, можна зазначити, що найбільша чисельність одержаних мух спостерігалась у контрольній групі (135 мух). Використання ароматизаторів: «Апельсин», «Дюшес», «Малина» викликало зменшення чисельності нащадків на 17,09% ($P > 0,99$), 26,3% ($P > 0,99$), 36,4% ($P > 0,99$) відповідно до контролю. Використання нетипових для харчування ароматизаторів «Кава», «Коньяк», «Мигдаль» аналогічно викликало зменшення їх чисельності, а саме: ароматизатор «Кава» – на 29 мух ($P = 0,99$), ароматизатор «Коньяк» – на 79 мух ($P > 0,999$) у порівнянні до контрольної групи. Збільшення рекомендованої дози у 10 разів призвело до зменшення чисельності піддослідних груп.

Десятикратне збільшення рекомендованої дози, вище зазначених ароматизаторів, призвело до зниження чисельності усіх піддослідних нащадків. Так, кількість нащадків у контрольній групі складало 135 мух, а з використанням ароматизаторів «Малина» – 77 мух, «Дюшес» – 71 муха, «Апельсин» – 65 мух, «Кава» – 116 мух, «Мигдаль» – 95 мух, «Коньяк» – 73 мухи. Експериментально досліджувані ароматизатори спричинили зменшення чисельності у порівнянні до контролю на 12,93% ($P > 0,999$), 47,55% ($P < 0,99$), 51,86% ($P > 0,999$), 13,8% ($P < 0,99$), 29,42% ($P > 0,99$), 46,06% ($P > 0,999$) відповідно. Порівнюючи одержані результати, можна констатувати, що найбільшу чисельність *Drosophila melanogaster* лінії Normal одержано у контрольній групі без використання ароматизаторів. Застосування всіх піддослідних ароматизаторів спричинило зменшення чисельності нащадків, як у рекомендованій дозі (на 17 % – 58 %), так і у дозі десятикратного збільшення (13 % – 51 %), незважаючи на присутність природнього або нетипового аромату харчування. [133].

Біотестування синтетичних складових продуктів харчування для визначення їхніх генотоксичних властивостей на різних тест-об'єктах

набуває дедалі більшого значення, адже дає змогу з'ясувати мутагенну та/або цитотоксичну, та/або канцерогенну дію досліджуваних зразків, проте висновок про генотоксичну безпеку харчових добавок в Україні не є обов'язковим. Доказовим показником мутаційного процесу на клітинному рівні є виявлення хромосомних мутацій, підвищений рівень яких розглядається як хромосомна нестабільність, яка в подальшому може спричиняти розвиток злоякісних новоутворень [130, 122].

Домінантні летальні мутації, які виявляються за дії хімічних сполук у сперматозоїдах, призводять до смерті зиготи, – це може відбуватися за рахунок дефіциту хромосомного матеріалу в геномі або за рахунок різноманітних пошкоджень, які призводять до блокування процесів редуплікації. Цим методом фіксують пізні ембріональні леталі (яйця коричневого, жовтого кольору) та ранні ембріональні леталі (яйця білого кольору, всередині у них видно білі непрозорі ущільнення ембріона). Також за дії на мух мутагенами підвищується імовірність незапліднених яєць унаслідок фізіологічного пошкодження сперматозоїдів або зниження статевої активності самців [131]

Аналіз літературних джерел та законодавчих документів показав, що збереження генетичних ресурсів аборигенних та локальних порід сільськогосподарських тварин в Україні є досить актуальним сьогодні. На цей час розроблено методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин, класифіковано імпорتنі та вітчизняні породи за критеріями ризику, обґрунтовано мінімальні розміри стад зникаючих порід. Проте, видоспецифічність та породоспецифічність їх мінливості під впливом факторів різної природи до цього часу досліджено недостатньо.

Тварини кожної породи характеризуються специфічними біологічно-господарськими особливостями і здатні до розведення в певних геокліматичних та економічних умовах України. Тварини спеціалізованих комерційних порід переважають тварин локальних та автохтонних порід за ознаками продуктивності, проте вони більш вибагливі до умов утримання і

годівлі, мають проблеми з відтворювальною здатністю, тривалістю продуктивного використання, якістю продукції.

Встановлено, що між показниками цитогенетичних порушень та відтворювальною здатністю і резистентністю тварин існує асоціативний корелятивний зв'язок (Глазко Т.Т., Костенко С.О., Стародуб Л.Ф.). Це стало підставою для встановлення порівняльної каріотипової мінливості тварин вітчизняних локальних порід та комерційних порід в межах одного й того самого господарства.

Місце і час процесу доместикації коней зараз залишається на рівні гіпотез та здогадок. Дослідження палеонтологів та археологів остаточної відповіді на ці питання не дають. Тому, для оцінки популяційно-генетичної та внутрішньопородної диференціації аборигенних та малочисельних порід коней застосовують метод ISSR-PCR маркування. Існування філогенетичних зв'язків кінської ДНК сучасних коней та древніх еквід у літературі висвітлено мало. Це і сприяло проведенню досліджень, для отримання інформації про еволюційні відносини (дерева філогенезу) між аборигенними та малочисельними породами коней та викопними рештками кісток (плейстоценового, справжнього тарпана, давнього свійського коня) за допомогою ISSR-PCR маркерів.

У літературних джерелах описано використання *DROSOPHILA MELANOGASTER* як модельного об'єкту в області генетики, імунології та фізіології; тестів із застосуванням *DROSOPHILA MELANOGASTER* для визначення генотоксичних властивостей синтетичних складових в продуктах харчування. Проте застосування таких тестів для виявлення мутагенів, що впливають на організм сільськогосподарських тварин, зокрема, великої рогатої худоби не проводилися. Це питання і потребує подальшого вивчення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріал досліджень

Цитогенетичні дослідження сільськогосподарських тварин проводилися в Інституті розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця в відділі генетики та біотехнології протягом 2017-2021 р.р. Хромосомну нестабільність каріотипу тварин вивчали на 4 аборигенних породах великої рогатої худоби (сіра українська, червона польська, білоголова українська, бура карпатська) і 2 комерційних породах (українська червоно-ряба молочна, українська чорно-ряба молочна) племінних тварин великої рогатої худоби та 2 породах коней (гуцульська, коник польський), які відносяться до вітчизняних зникаючих та тих, що занесені до Червоної книги і знаходяться під егідою ЮНЕСКО у 5 господарствах і в приватному секторі. Молекулярно-генетичні дослідження проводили на 3 породах коней – локальній малочисельній породі; породі, яка занесена до Червоної книги і знаходиться під егідою ЮНЕСКО; одній із самих давніх порід (гуцульська, коник польський, арабська). Молекулярно-генетичні дослідження проводилися і на викопних рештках кісток 3 видів коней: плейстоценового, справжнього тарпана, давнього свійського коня (таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

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

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

Велика рогата худоба породи бура карпатська на цей час знаходиться тільки у приватному секторі (таблиця 2.2)

Таблиця 2.2.

Власники корів породи бура карпатська та їх помісей с. Нижні ворота Воловецького району Закарпатської області

Призвіще, ім'я по батькові приватного власника корови	ВРХ, порода
Бірчик Юсип Федорович	Бура карпатська; 1/2БК х 1/2ПЦ
Вайдич Микола Михайлович	Бура карпатська; 1/2БК х 1/2Г
Малильо Федір Іванович	Бура карпатська; 1/2БК х 1/2ПЦ
Балан Федір Федорович	Бура карпатська; 1/2БК х 1/2С
Грига Василь Михайлович	Бура карпатська; 1/2БК х 1/2С
Височанський Йосип Степанович	1/2 БК х 1/4 ПЦ х 1/4 УЧРМ; 1/2БК х 1/2Г
Козик Михайло Федорович	Бура карпатська; 1/2БК х 1/2Г
Бігарі Федір Миколаєвич	Бура карпатська (2гол.)
Комар Іван Ярославович	Бура карпатська; 1/2БК х 1/2Г
Кускевич Віктор Трохимович	Бура карпатська (2гол.)
Дужар Іван Васильович	Бура карпатська; 1/2БК х 1/2Г
Диркавець Ігор Ярославович	Бура карпатська; 1/2БК х 1/2Г
Реблан Степан Васильович	Бура карпатська (2гол); 1/2БК х 1/2ПЦ; Бура карпатська (телиця 1,5 р.); 1/2БК х 1/2УЧРМ; 1/2БК х 1/2ПЦ; 1/2БК х 1/2Г
Всього	15 гол. бурої карпатської; 15 гол. помісних тварин

Сучасний масив червоної польської худоби господарства ПрАТ «Мшанецьке» створений у результаті систематичного використання племінного матеріалу споріднених червоних порід: червоної датської, естонської, бурої латвійської, англерської, в основному через завезених плідників. Частку кровності досліджених корів червоної польської породи показано в таблиці 2.3.

Забір біологічного матеріалу для цитогенетичних досліджень проводили у 2012 році. На той час у господарстві проявлялись випадки захворювання та туберкульоз. Із 30 голів тварин, кров яких була відібрана для цитогенетичного тестування 20 % корів (6 гол.) були інфіковані збудником туберкульозу. На протязі 15 днів ці тварини підлягали обов'язковій утилізації.

У 2017 році здійснювався повторний забір крові у корів червоної польської породи та української червоно-рябої молочної породи для цитогенетичних досліджень. Господарство ПрАТ «Мшанецьке» було благополучне по відношенню до захворювання на туберкульоз.

За даними Тербовлянської 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.

Таблиця 2.3.

Частка кровності досліджуваних корів червоної польської породи

№ за п	Ідентифікаційний №	Кровність корови
1	3837	ЧД60,94+Ш20,31+ЧП12,5+Г6,25
2	3735	ЧД48,44+ЧП25+Ш20,31+Г6,25
3	3775	ЧД48,4+Ш20,31+ЧЕ12,5+Г12,5+ЧП6,25
4	3714	ЧД48,44+ЧП25+Ш20,31+Г6,25
5	86256	ЧД83,59+Ш13,91+ЧП12,5
6	3687	ЧП25+ЧЕ18,75+ЧД50+Г6,25
7	3794	ЧД48,44+ЧП25+Ш20,31+Г6,25
8	14666	ЧД83,59+Ш13,91+ЧП12,5
9	13396	ЧД83,59+Ш13,91+ЧП12,5
10	3648	ЧД48,44+ЧП25+Ш20,31+Г6,25
11	3767	ЧД48,44+ЧП25+Ш20,31+Г6,25
12	3574	ЧД56,25+ЧП25+ЧЕ18,75
13	0396	ЧД34,37+ЧП25+ЧЕ25+Ш15,63
14	3754	ЧД48,44+ЧП25+Ш20,31+Г6,25
15	2558	ЧД40,62+ЧП25+ЧЕ18,75+Ш15,63
16	3733	ЧД48,44+ЧП25+Ш20,31+Г6,25
17	3670	ЧД48,44+ЧП25+Ш20,31+Г6,25
18	3832	ЧД48,44+ЧП25+Ш20,31+Г6,25
19	3583	ЧД67,19+ЧП25+Ш7,81
20	2458	ЧД40,62+ЧП25+ЧЕ18,75+Ш15,63
21	3720	ЧД48,44+ЧП25+Ш20,31+Г6,25
22	3790	ЧД31,25+ЧП25+ЧЕ12,25+АН12,5+Ш12,5+Г6,25
23	3749	ЧД31,25+ЧП25+ЧЕ12,5+АН12,5+Ш12,5+Г6,25
24	3752	ЧД60,94+Ш20,31+ЧП12,5+Г6,25
25	3734	ЧД48,44+Ш20,31+ЧЕ12,5+Г12,5+ЧП6,25

Для вивчення історії розведення та збереження гуцульських коней на українських землях, починаючи з XIX століття, був проведений ретроспективний аналіз літературних, архівних матеріалів XIX–XX століття (Державний архів Львівської області), інформаційних даних із сімей колишніх наїзників та працівників Державної стаднини огирів (станція жеребців) у Судовій Вишні. Ці матеріали були надані їх родичами, які проживають у Польщі, та зібрані краєзнавцем Войціцьким Романом Володимировичем із містечка Судова Вишня, що на Львівщині. Висвітлення системи заходів збереження коней гуцульської породи в теперішній час було проведено на основі матеріалів, наданих співробітниками Національного природного парку “Верховинський” та Національного природного парку “Гуцульщина”.

Для відпрацювання методики одержання метафазних пластинок хромосом використовували мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку коня, мезенхімальні стовбурові клітини пуповини, одержані від трьох лоша́т чистокровної верхової породи та мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку кроля [137-141].

Загальна схема досліджень показана на рис. 2.1

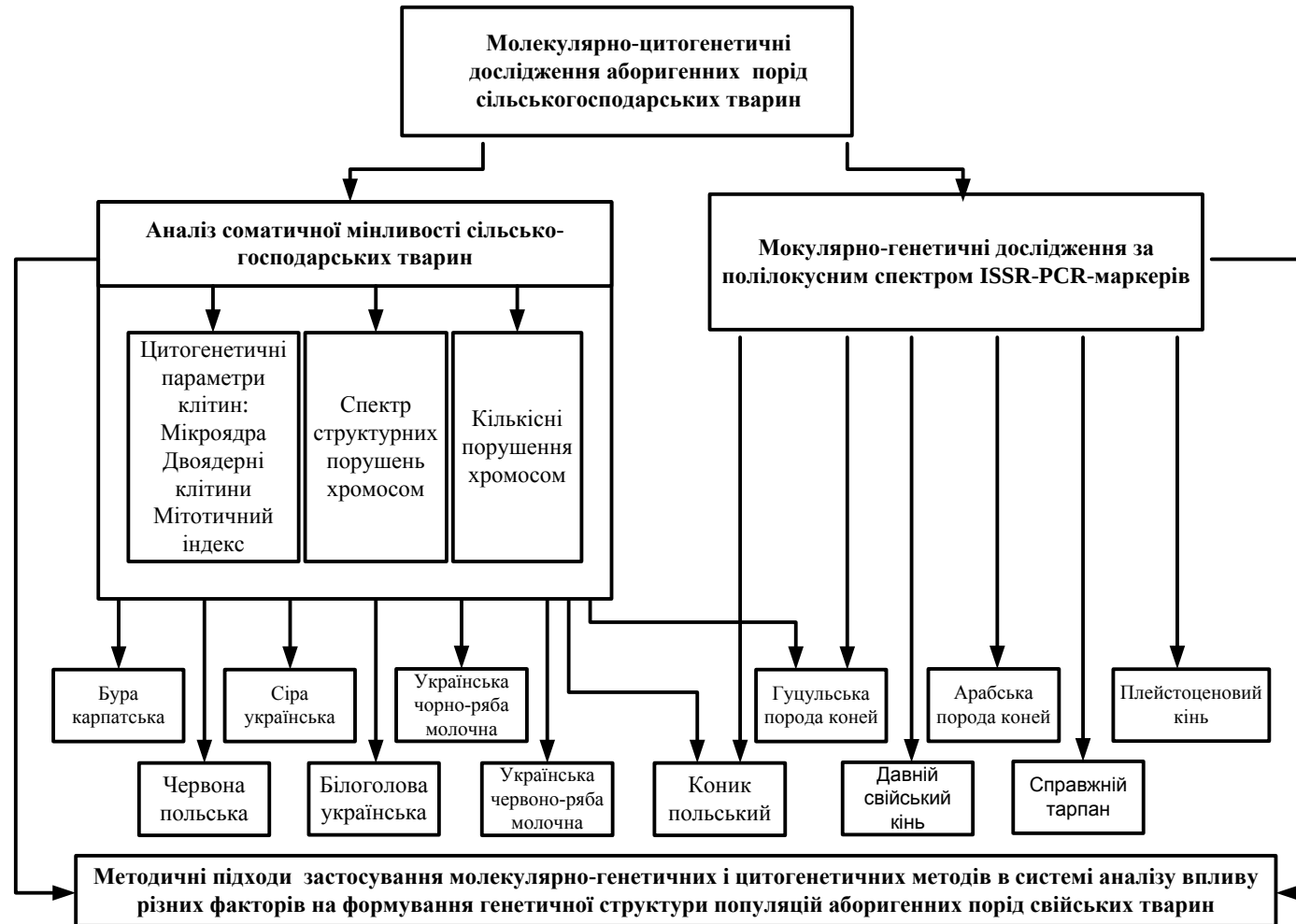


Рис.2.1 Схема досліджень

2.2 Отримання цитогенетичних препаратів

Препарати хромосом великої рогатої худоби можна одержувати з різного біологічного матеріалу: ембріональних фібробластів, клітин кісткового мозку, лейкоцитів периферійної крові, епітеліальних клітин нирок, шкіри. Але для практичного цитогенетичного контролю, як правило, використовують периферійну кров. Методика одержання препаратів із лімфоцитів периферійної крові передбачає таку послідовність етапів: взяття крові, її транспортування, підготовку стерильних флаконів із живильним середовищем, приготування препаратів, забарвлення, фотографування, аналіз метафазних пластинок.

Кров відбирали з яремної вени тварини. Необхідною умовою було дотримання стерильності на всіх етапах методики. Шкіру на місці проколу обробили загальноприйнятими методами асептики. Перед взяттям крові волосяний покрив тварини вистригали ножицями.

Відбір крові здійснюють традиційним шляхом або через спеціальну систему одноразового використання для взяття крові (ВК-10-01). Послідовність відбору проб крові: пункція яремної вени, зрошення, обмивання 2 – 3 с внутрішньої поверхні голки кров'ю, коротким кінцем голки пробивають гумову пробку стерильного флакона або одноразової пробірки з розчином гепарину, приготовленого шляхом додавання 0,2 мл аптечного розчину гепарину до 8 мл дистильованої води, в кожную пробірку додають 0,2 – 0,3 мл розчину.

Доставку проб крові на підприємство (лабораторію) генетичного контролю здійснювали у термосі, який здатний підтримувати тривалий час температуру + 4° С. Під час транспортування кров не повинна струшуватися [142 – 145].

2.2.1 Приготування цитогенетичних препаратів

Для культивування клітин крові в лабораторії заготовляли стерильні флакони; фасували середовище RPMI-1640 (Sigma, США) в стерильному боксі приблизно 5 мл у один флакон з 15 – 20 % сироватки крові великої рогатої худоби (бажано ембріональної). До культури додавали антибіотики з розрахунку (0,01 мл гентаміцину на 1 мл середовища), 0,5 мл цільної крові, а також мітоген – речовину, яка стимулює мітотичне ділення лімфоцитів у культурі. Дозування фітогемаглютиніну проводять залежно від його типу. ФГА типу Р додають у дозі 0,02 мл, типу М – 0,2 на 10 мл культуральної суміші. Суміш культивували в термостаті при + 37° С протягом 48 год., періодично струшуючи флакони.

За дві години до фіксації в культуру вводили підігрітий до 37° С розчин колхіцину в кінцевій концентрації 0,3 – 0,5 мкг/мл культурального середовища. Колхіцин затримує мітотичне ділення на стадії метафази, що дає можливість нагромадити метафазні пластинки. Починаючи з цієї операції, необхідності в стерильних умовах немає.

Після інкубації з колхіцином культуру струшували, переливали у центрифужні пробірки і центрифугували при 800 – 1000 об/хв протягом 8 – 10 хв. Надосадкову рідину зливали, а залишок ресуспендували в 5 – 10 мл гіпотонічного розчину, підігрітого до +37° С. Для гіпотонізації використовували свіжоприготовлений 0,55%-й розчин хлористого калію (0,28 г на 50 мл дистильованої води) або 0,9%-й розчин цитрату натрію. Гіпотонізацію проводили протягом 20 хв. в термостаті при +37° С.

Після закінчення гіпотонізації, культуру центрифугували, надосадкову рідину зливали, а до осаду обережно по стінці пробірки додавали охолоджену до +4° С фіксуючу рідину, яку готували безпосередньо перед вливанням. Змішували 1 частину льодяної оцтової кислоти з 3 частинами метилового (або етилового) спирту. Закриті гумовими пробками пробірки переносили в холодильник, де витримували при +4° С 20 хв. – 20 год. Після

цього осад ресуспендували і центрифугували, повторюючи цю операцію 2 – 3 рази, поки фіксатор не став абсолютно чистим і прозорим.

Суспензію клітин пастерівською піпеткою з висоти 20 – 30 см наносили на чисті охолоджені предметні скельця, рівномірно розподіляли її по всій поверхні. Висушували скло на повітрі.[142].

Для визначення кількісних характеристик та змін числа хромосом і деяких структурних порушень застосовували простий (так званий рутинний) спосіб забарвлення (за Романовським-Гімза).

Для рутинного забарвлення хромосом використовували готовий барвник Гімза (азур-еозин за Романовським). На 0,5 – 1 мл вихідного барвника брали 10 мл дистильованої води. Предметне скло поміщали у склянку з барвником. Через 5 – 10 хв. препарати споліскували дистильованою водою й висушували [143].

2.2.2 Аналіз цитогенетичних препаратів

Отримані препарати після їх забарвлення аналізували для проведення кількісної і якісної оцінки каріотипу. Цей аналіз вимагав дотримання наступних правил: аналіз препаратів проводили під мікроскопом Axiostar plus (Carl Zeiss, Німеччина). Аналіз клітин починали проводити під малим збільшенням мікроскопа в 100 разів, оцінювали мітотичний індекс та якість метафазних пластинок, за координатами препаратів визначали розташування метафаз, потім їх аналізували під імерсійним збільшенням мікроскопа у 1000 разів і мікрофотографували. При виборі для аналізу мета-або прометафазна пластинка повинна бути ціла, пластинки повинні бути відокремлені одна від іншої. У пластинці хромосоми повинні розміщуватись окремо або може спостерігатись невелика кількість взаємних накладень хромосом одна на іншу. Досліджували 100 метафазних пластинок. Ідентифікацію хромосом проводили згідно International System for Cytogenetic Animals [146].

Класифікацію і облік хромосомних аберацій проводили відповідно до загальноприйнятих рекомендацій [147]. В усіх дослідженнях, як параметри хромосомної нестабільності, визначали кількісні порушення хромосом (відсоток анеуплоїдних, поліплоїдних, гаплоїдних клітин від 100 проаналізованих), відсоток клітин із асинхронним розщепленням центромірних районів хромосом; структурні порушення хромосом (відсоток клітин із парними і поодинокими фрагментами, з розривами хромосом і хроматид від 100 проаналізованих).

У досліджуваних корів визначали відсоток метафазних пластинок із хромосомними (Хр) та хроматидними (Хм) розривами, відсоток анеуплоїдних (А, $2n \pm 10$) клітин, поліплоїдні клітини (ПП), а також із асинхронністю розщеплення центромірних районів хроматид (АРЦРХ).

2.2.3 Визначення частоти мікроядер та двоядерних лімфоцитів периферійної крові ВРХ, мітотичний індекс

Мікроядерний тест – тестування на мутагенність агентів різної природи. Мікроядро – автономно існуючий ацентричний фрагмент хромосоми, який виникає у результаті хромосомних аберацій або відставання у процесі руху клітини від анафази до телофази цілої хромосоми і розміщується у вигляді супутника біля основного ядра [148 -153].

Частота мікроядер (ЧМЯ)- визначали за формулою

$$\text{ЧМЯ} = (M/K) \times 1000, \quad (2.1)$$

де М – кількість мікроядер

К – загальна кількість проаналізованих клітин.

Двоядерні клітини можуть виникати як компенсація дії генотоксичних агентів для підтримки генотоксичного балансу в популяціях [79]. Деякі автори пояснюють наявність двоядерних клітин як наслідок старіння *in vivo* та *in vitro* і природного подовження тривалості цитокінезу [80].

Аналізували 3000 клітин. Частоту двоядерних лімфоцитів і мітотичний індекс підраховували за аналогічною схемою [152].

2.3 Вибір зразків біологічного матеріалу для проведення молекулярно-генетичних досліджень

Кров для дослідження відбирали із яремної або хвостової вени, використовуючи одноразові системи для взяття крові або одноразовий шприц в об'ємі 5 см³ у стерильну пробірку із антикоагулянтом (6% розчин ЕДТА у співвідношенні 1:19 або 4% розчин цитрату натрію у співвідношенні 1:9).

Закриту пробірку із кров'ю кілька разів перевертали для рівномірного змішування з антикоагулянтом.

Проби біологічного матеріалу поміщали у тару із холодоагентом (термос або валіза – холодильник). Їх доставляли у лабораторію у день відбору або наступного дня, зберігаючи за температури від 2 до 8°C.

Пробірки з кров'ю до дослідження зберігали у холодильнику при температурі (+4°C) до 5 годин. Для тривалого зберігання кров заморозували при (-20°C).

2.3.1 Загальні методи та обладнання, що використовували в роботі при виділенні ДНК із біологічного матеріалу

Обладнання:

1. Програмований термостат (термоциклер) ТП4-ПЦР-01 «Терцик» (Росія) з допустимим відхиленням температури від встановленого значення не більше ніж $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ та градієнтом температури не більше ніж $1^{\circ}\text{C}/\text{с}$.
2. Твердотільний термостат типу «Dry-block», $t - 95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. Мікроцентрифуга до 14000 хв⁻¹ для пробірок на 1,5 мл, «Eppendorf» (Німеччина).
4. Стерильна ламінарна шафа 2-го кл. захисту, БАВп-01- «Ламінар-С»-1,2.
5. Термостати «ТС – 80М-2» на 28 - 60°C.

6. Пробірки пластикові одноразові для ПЛР ємністю 0,2 - 0,5 мл відповідно до ДСТУ ISO 9001, «Ахуген», «Eppendorf».
7. Набір дозаторів піпеточних змінного об'єму від 0,5 до 200 мкл відповідно до ДСТУ ISO 9001, «Eppendorf» (Німеччина).
8. Одноразові наконечники для ПЛР ємністю 0,2 - 1,0 мл відповідно до ДСТУ ISO 9001, наприклад, «Ахуген», «Eppendorf».
9. Транслюмінатор UVT-1 (ООО «Компания Биоком»).
10. Камера для горизонтального гель-електрофорезу (ООО«Биоклон», РФ).
11. Камера для фотодокументації результатів «SONY» .
12. Блок живлення, «Б-5-50».
13. Холодильна камера на (-20°C), «NORD».
14. Ваги «OHAUS».
15. Термостати «ТС-80М-2»на 28 - 60°C ((ООО «Компания Биоком»).
16. Мікрозмішувач типу «Vortex».
17. Магнітна мішалка МН-5.
18. Лабораторний посуд (колби 25 - 1000 мл, мірні стакани об'ємом 25 - 1000 мл)

2.3.2 Виділення ДНК з біологічного матеріалу

Виділення ДНК із крові проводили із використанням стандартного комерційного набору «ДНК-сорб В» виробництва компанії «АмпліСенс» (НДІ Епідеміології, Москва, Росія) згідно з модифікованого протоколу із застосування комплекту реагентів для виділення ДНК з рідкої крові:

1. Вносили в кожну пробірку по 300 мкл лізуючого розчину.
2. В пробірки з лізуючим розчином вносили по 100 мкл крові.
3. Проби ретельно перемішували на вортексі і прогрівали 5 хв при 65°C. Центрифугували 5 с при 5000 хв⁻¹ на мікроцентрифузі. Якщо проба розчинилась не повністю, повторювали центрифугування пробірки на

мікроцентрифузі 5 хвилин при максимальних обертах і використовували для виділення ДНК супернатант, переносячи його в нову пробірку.

4. Ретельно ресуспендували сорбент на вортексі. В кожну пробірку окремим наконечником добавляли по 25 мкл ресуспендованого сорбенту. Перемішували на вортексі, ставили в штатив на 2 хвилини, ще раз перемішували і залишали в штативі на 5 хв.

5. Осаджували сорбент в пробірках центрифугуванням при 5000 g протягом 30 с. Видаляли супернатант, використовуючи окремий наконечник для кожної проби.

6. Добавляли в проби по 300 мкл розчину для першої відмивки, перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбента. Осаджували сорбент центрифугуванням при 5000 g на мікроцентрифузі протягом 30 с. Видаляли супернатант використовуючи окремий наконечник для кожної проби.

7. Добавляли в проби по 500 мкл розчину для другої відмивки, перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбенту. Осаджували сорбент центрифугуванням при 5000 хв^{-1} на мікроцентрифузі протягом 30 с. Видаляли супернатант використовуючи окремий наконечник для кожної проби.

8. Повторювали процедуру відмивки, починаючи з пункту 8, відбирали супернатант повністю.

9. Поміщали пробірки в термостат при температурі 65°C на 5-10 хв. для підсушування сорбенту. Кришки пробірок залишали відкритими.

10. В пробірки добавляли по 50 мкл TE-буфера для елюції ДНК. Перемішували на вортексі. Поміщали в термостат при температурі 65°C на 5 хв., періодично струшуючи на вортексі.

11. Центрифугували пробірки при 12000 хв^{-1} протягом 1 хв. на мікроцентрифузі. Після цього супернатант містить очищену ДНК.

Проби були готовими до постановки ПЛР.

Очищену ДНК можна зберігати від 1-го тижня при температурі 2-8°C до одного року при -20°C. Ефективність виділення ДНК складає 50-70% [154,155].

2.3.3 Техніка проведення електрофорезу

Електрофорез агарозного гелю проводили у горизонтальній камері 1-3 години при напрузі 2 В/см геля. Фарбування гелів здійснювались за допомогою бромистого етидію (0,5 мкг/мл) протягом 10 хв. з наступною їх багаторазовою відмивкою у дистильованій воді. Візуалізація фрагментів ДНК проводились в УФС світлі на транслюмінаторі при довжині хвилі 312 нм.

2.3.4 Проведення ПЛР в техніці міжмікросателітного аналізу ISSR

Для отримання ДНК-спектру продуктів ампліфікації використовували праймери (табл. 2.4). Склад реакційної суміші був наступним: 2 мкл буферу для ДНК полімерази, 1 мкл суміші трифосфатів («Амплісенс», Росія), 80 пмоль відповідного праймера (0,8 мкл/реакцію), 0,83 од. акт. (0,2 мкл) ДНК-полімерази («Fermentas», Литва). Геномна ДНК додавалась у кількості 1,5 мкл такої концентрації 35-50 нг/мкл. Загальний об'єм ПЛР-суміші становив 10 мкл.

Програма ампліфікації з праймерами S1, S2:

Початкова денатурація – 94°C – 7 хв.; 32 цикли: 30 сек. за 94°C, 30 с за 58°C – відпал праймерів, 2 хв за 72°C – синтез; денатурація 94°C – 30 сек.; термінальна елонгація – 7 хв за 72°C

Програма ампліфікації з праймерами S3, S4:

Початкова денатурація – 94°C – 7 хв.; 32 цикли: 30 сек. за 94°C, 30 с за 60°C – відпал праймерів, 2 хв за 72°C – синтез; денатурація 94°C – 30 сек.; термінальна елонгація – 7 хв за 72°C.

Програма ампліфікації з праймерами S5

Початкова денатурація – 94°C – 7 хв.; 32 цикли: 30 сек. за 94°C, 30 с за 54°C – відпал праймерів, 2 хв за 72°C – синтез; денатурація 94°C – 30 сек.; термінальна елонгація – 7 хв за 72°C.

Програма ампліфікації з праймером S6

Початкова денатурація – 94°C – 7 хв.; 32 цикли: 30 сек. за 94°C, 30 с за 44°C – відпал праймерів, 2 хв за 72°C – синтез; денатурація 94°C – 30 сек.; термінальна елонгація – 7 хв за 72°C.

Програма ампліфікації з праймером S7

Початкова денатурація – 94°C – 7 хв.; 32 цикли: 30 сек. за 94°C, 30 с за 56°C – відпал праймерів, 2 хв за 72°C – синтез; денатурація 94°C – 30 сек.; термінальна елонгація – 7 хв за 72°C.

Програма ампліфікації з праймером S8

Початкова денатурація – 94°C – 7 хв.; 32 цикли: 30 сек. за 94°C, 30 с за 64°C – відпал праймерів, 2 хв за 72°C – синтез; денатурація 94°C – 30 сек.; термінальна елонгація – 7 хв за 72°C.

Характеристика використаних праймерів

Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність (5'-3')	Температура випалювання
S1	AGAGAGAGAGAGAGAGC	58°
S2	GAGAGAGAGAGAGAGAC	58°
S3	ACCACCACCACCACCG	60°
S4	GAGGAGGAGGAGGAGC	60°
S5	AGAGAGAGAGAGAGCA	54°
S6	GAGAGAGAGAGACC	44°
S7	AGAGAGAGAGAGAGCG	56°
S8	CTCCTCCTCCTCCTC	64°

Розміри отриманих продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркеру молекулярних мас Thermo Scientific™ Gene Ruler 1 kb

Plus DNALadder, ready-to-use-75-20000 bp. Детекцію результатів проводили фотографуванням гелів цифровою камерою.

2.3.5 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації

Електрофоретичне розділення ампліфікованих ділянок ДНК в техніці ISSR проводили у 2 % агарозному гелі у тріс-боратному електрофорезному буфері (TBE: 0,0879 М Тріс, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕТДА рН 8,0), згідно методичних рекомендацій [290,291].

До 20 мкл ампліфікату, перед внесенням у лунки гелю, додавали 6-кратний буфер (0,25 % бромфеноловий синій, 0,25 % ксилолціанол, 30 % гліцерин) для нанесення зразка у співвідношенні: 6 частин зразка до 1 частини буфера. Напруженість електричного поля при розділенні фрагментів ДНК в агарозному гелі повинна становити від (7±1) В/см довжини гелю , або

3 ± 1 мА /см. Після вмикання джерела напруги, сліdkували за процесом електрофореzu – за міграцією барвників, що входить до складу буфера для нанесення зразка. Процес розділення ампліфікованих фрагментів ДНК припиняли при виході за межі гелю барвника бромфеноловий синій, пробігу ксилол цианолу на відстань на відстань 7 ± 1 см від верхнього краю гелю.

2.3.6 Приготування агарозних гелів

1. Для приготування 2,0 % агарозного гелю до 100 мл буфера TBE (1x) добавляли 2,0 г агарози;
2. Суміш нагрівали на киплячій водяній бані до повного розчинення агарози.
3. Після охолодження розчину агарози до $50-55^{\circ}\text{C}$ добавляли бромистий етидій до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл.
4. Приготовлений розчин, розливали в спеціальну електрофоретичну форму і відразу вставляли на відстані приблизно 1 см від одного з кінців форми гребінку, для формування лунок. Висоту гребінки підбирали так, щоб між її зубцями і дном форми залишався проміжок в 0,5-1.0мм.
5. Камеру ставили до повного застигання гелю при кімнатній температурі (від 30 до 40 хв) в горизонтальному положенні.
6. Форму з гелем, з якої обережно дістали гребінку, розміщували в електрофоретичну камеру.
7. Заповнювали камеру такою кількістю електрофоретичного буфера TBE (1x), що він покривав гель шаром товщиною 1-3 мм.

2.4 Короткостроковий тест: визначення мутагенної активності (сірководневої води) на організм *Drosophila melanogaster*

Дослідження мутагенного впливу сірководню на сільськогосподарські тварини проводили на організмі *Drosophila melanogaster* лінії Canton-S, яка відрізняється досить низькою спонтанною мутагенністю (Рис. 2.1).



Рисунок 2.1 *Drosophila melanogaster* лінії Canton-S, зовнішній вигляд;

Самка – ♀; самець – ♂

Для відбору мух для схрещування потрібно безпомилково розрізнити статі особин. Зазвичай статі у імаго розрізняють, аналізуючи зовнішні статеві органи. Геніталії самців оточені великими темними щетинками, які не спостерігаються у самок. Постеріорна частина черевця у самців завжди темніша, ніж у самок. Кінець черевця в самців більш заокруглений. Зазвичай, у межах однієї популяції самці менші за самок (рис.2.3). [156].



Рисунок 2.3 *Drosophila melanogaster* лінії Canton-S.

Будова черевця: Самець – ♂; Самка – ♀

Для визначення мутагенної активності ксенобіотиків (сірководню у воді) проводили облік індукованих домінантних летальних мутацій на постембріональній стадії розвитку (стадії лялечок) за рівнем постембріональних втрат, а наявність мутагенної активності констатують при достовірному перевищенні частоти домінантних летальних мутацій над спонтанним рівнем більше ніж у 2 рази.

Порядок проведення тесту:

1. Відсаджування самців і самок

- а). Виліт нового покоління;
- б). Розподіл мух на самців і самок-віргінних (жодного разу не запліднених самок). Зберігали їх окремо 3 дні.

2. Обробка самців

Відбирали 15 самців і поміщали на 1 добу у посудину з поживним середовищем, для приготування якого брали воду з сірководнем.

Склад поживного середовища, приготовленого на воді із сірководнем
100 мл води із сірководнем; 8 г дріжджів; 5 г цукру; 5 г манної крупи;
0,3 г агар-агар.

Склад поживного середовища контрольної групи:

100 мл дистильованої води; 8 г дріжджів; 5 г цукру; 5 г манної крупи; 0,3 г агар-агар.

Після відбору, оброблених самців схрещують з інтактними віргінними самками в окремих пробірках у співвідношенні 1:1. Пробірки з дрозофілами (15-20) пробірок культивують у термостаті при температурі 24°C протягом 8-10 діб. Домінантні летальні мутації – генетичні зміни, що відбуваються у батьківських статевих клітинах і викликають загибель першого покоління нащадків, проявляються на різних етапах онтогенезу дрозофіли – як на ембріональному (яйця), так і на постембріональному (личинки та лялечки). Ми проводили підрахунок на стадії лялечок. Для цього після виходу личинок на стінках пробірок спостерігається утворення лялечок. На цій стадії розраховують загальну кількість лялечок у дослідній і контрольній групах. Якщо з лялечки виходить імаго (доросла муха), то від неї на стінках пробірок залишається пуста прозора оболонка, яка легко відрізняється від загиблих темних непрозорих лялечок. Тому після закінчення виходу імаго виконують підрахунок загиблих лялечок.

Аналогічну роботу проводили і з контрольною групою, де поживне середовище готували на дистильованій воді.

Основним показником рівня домінантних летальних мутацій є частота постембріональних втрат, яка оцінювалася за відношенням кількості загиблих лялечок до загальної кількості лялечок за формулою:

$$\text{ДЛІМ} = \frac{\text{ЗЛ}}{(\text{ЖЛ} + \text{ЗЛ})} \times 100\%, \quad (2.1)$$

де : ЗЛ –кількість загиблих лялечок;

ЖЛ – кількість живих лялечок.

Про мутагенну активність хімічних речовин робили висновок з перевищення мутагенного ефекту над спонтанним рівнем більше ніж у 2 рази. [158,159].

2.5 Статистична обробка результатів

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали стандартними методами [160, 161].

Для того, щоб одержати характеристику не окремих об'єктів, а всієї групи в цілому, розраховували середню величину частоти клітин із цитогенетичними порушеннями (M) і помилку середньої арифметичної (m_M). Виявлення достовірності різниці середніх величин (t_d) здійснювали за критеріями Ст'юдента (t_d).

Ступінь і напрям зв'язку цитогенетичної мінливості у великої рогатої худоби, визначали за допомогою коефіцієнта кореляції (r), Достовірність коефіцієнта кореляції вираховували за допомогою критерію Фішера (t_r).

Силу впливу (η^2) породи, віку, паратипового чинника (збудника туберкульозу) на хромосомну мінливість великої рогатої худоби встановлювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу. Достовірність сили впливу (F) визначали за критеріями Фішера [129].

Розрахунок індексу поліморфного інформаційного змісту - PIC, вираховували за формулою:

$$PIC=2f(1-f), \quad (2.2)$$

де f – частота одного з двох алелів, яка вираховується як

$$f=\sqrt{R}, \quad (2.3)$$

де R -частота варіантів, у яких відсутній фрагмент ДНК, відповідної довжини (гомозигота за рецесивним алелем), оскільки ISSR-маркери характеризуються домінантним типом прояву.

Середнє на локус генне різноманіття вираховували за формулою:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2, \quad (2.4)$$

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

Розрахунки показників внутрішньопопуляційного різноманіття – середнє число морф/алелей (μ) і частка рідкісних морф/алелей (h_μ) та їх статистичних похибок проводили з використанням пакета програм Microsoft Excel за такими формулами [162]

$$\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m})^2 \quad (2.5)$$

$$h_\mu = 1 - \mu/m, \quad (2.6)$$

де p – частка поліморфних алелей; m – кількість поліморфних локусів.

Похибку середнього числа алелів обчислювали за формулою:

$$S_\mu = \sqrt{\mu(m-\mu)/N}, \quad (2.7)$$

де N загальне число особин ;

Похибку частки рідкісних алелів обчислювали за формулою:

$$S_h = \sqrt{h_\mu (1 - h_\mu)/N} \quad (2.8)$$

Індекс Шенона-Вінера для кількісної оцінки алельного різноманіття розраховували за формулою [165]:

$$H' = - \sum_{i=1}^n (p_i \times \ln p_i) \quad (2.9)$$

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

Відповідність фактичного і очікуваного розподілу живих та загиблих лялечок перевіряли за значенням критерія Пірсона (χ^2) за формулою:

$$\chi^2 = \frac{\sum (\Phi - T)^2}{T} \quad (2.10)$$

де Φ – фактична кількість загиблих лялечок;

T – теоретична кількість загиблих лялечок;

Розмір ампліфікованих фрагментів визначали з використанням

програмного забезпечення TotalLab 2.01 [163] та GelQuest 3.04 [164].

Статистичну обробку даних здійснювали за використання стандартних комп'ютерних програм (пакет STATISTICA 7) та за допомогою комп'ютерної програми MicrosoftExcel 2013. Побудова дендрограм генетичних відстаней між кіньми різних видів та порід із використанням методу М. Нея, здійснено з використанням програми TreeView X.

РОЗДІЛ 3.

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ АБОРИГЕННИХ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Генофонди локальних вітчизняних порід великої рогатої худоби є першочерговим об'єктом систематичних комплексних наукових досліджень. У нашій країні особливої уваги потребують популяції білоголової української, бурої карпатської, сірої української, червоної польської порід. З метою визначення впливу різних паратипових чинників на геном представників цих порід нами проведені цитогенетичні дослідження.

3.1 Каріотипова мінливість корів білоголової української породи

Білоголова українська порода великої рогатої худоби відноситься до малочисельних зникаючих порід [4]. За проведеними розрахунками відповідно до рекомендацій FAO порода перебуває в стані ризику зникнення [4]. Поголів'я чистопорідних самок і загальний розмір популяції не перевищує 1000 голів. Тварин цієї породи впродовж багатьох років розводять в одному племінному господарстві ТОВ «Подільський господар» Хмельницької області. Станом на 01.01.2021 року загальна кількість тварин у стаді – 647 голів, з них 300 гол. – дійні корови, 80 гол. – нетелі, решта – телиці до року та старше (автоматизована база даних про племінні стада суб'єктів племінної справи у тваринництві «Державний племінний реєстр»).

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 (рис. 3.1)



Рис. 3.1 Тварини білоголової української породи господарства
ТОВ «Подільський господар» Хмельницької області

Результати досліджень та їх статистична обробка наведені на рисунку 3.2.і в таблиці 3.1.



а

б

в

Рис.3.2 Каріотипова мінливість корів білоголової української породи.
а) $2n=60$ – норма; б) анеуплоїдія– $2n =59$; в) $2n=60$, хромосомний розрив,
зб.×1000 разів

Таблиця 3.1

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

Каріотипова мінливість корів, яких досліджували, проявилася у кількісних та структурних порушеннях хромосом. Середня частота кількісних порушення, зокрема анеуплоїдії, становила 6,5% і була представлена в основному гіпоплоїдним набором хромосом при $2n=52-58$. Різниця середніх величин цієї мінливості (6,0% і 7,0%) для тварин двох груп (селекційне ядро та виробнича група) була статистично недостовірною. Відсоток метафазних пластинок із анеуплоїдією не перевищував спонтанний рівень (1,5-8,3%) [6], характерний для корів порід молочного напрямку продуктивності. Кратне збільшення хромосом, поліплоїдію, у досліджуваних тварин виявлено не було. Асинхронне розходження центромірних районів хромосом у корів селекційного ядра проявилася із частотою 2,0%, а у досліджених корів виробничої групи виявлено не було. Середня величина метафазних пластинок із асинхронним розходженням центромірних районів хромосом становила 1,0% і не перевищувала спонтанний рівень цієї мінливості, характерний для виду *Bos taurus*. Частота структурних порушень хромосом (хромосомні розриви) у тварин двох груп становила 2,3% та 2,0% відповідно, що відповідає нормі (0,17 -11,1%) [6], характерній для великої рогатої худоби за спонтанного мутагенезу.

Для порівняльної оцінки проведено аналіз мінливості каріотипу групи корів української чорно-рябої молочної породи цього господарства. Тварини, які були сформовані у 2 групи, були одного віку (3-ої і вище лактацій), згідно

призначення корови – у виробничій групі та знаходилися в однакових умовах утримання (рис.3.3).

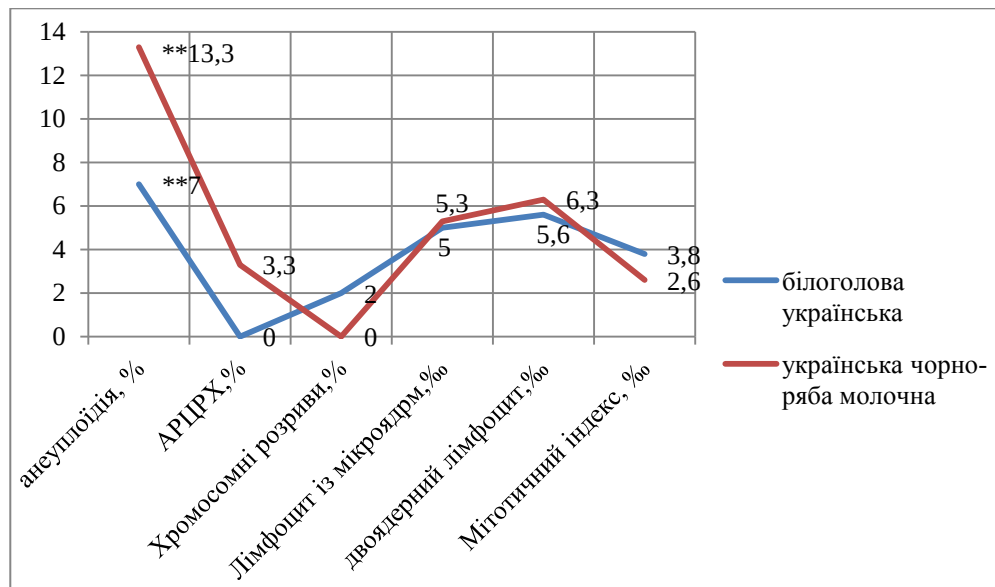


Рис.3.3 Каріотипова мінливість корів білоголової української та української чорно-рябої молочної порід господарства ТОВ «Подільський господар»

Примітка. ** $P > 0,99$

Результати досліджень показали, що каріотипова мінливість у тварин двох груп проявилася у кількісних порушеннях хромосом, зокрема анеуплоїдії. Так, 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 достовірною при $P > 0,99$. Частота клітин із анеуплоїдією у корів української чорно-рябої молочної породи вища за спонтанний рівень цієї мінливості. Таким чином, у корів української чорно-рябої молочної породи за умов інтенсивного використання спостерігається підвищення частоти метафаз із анеуплоїдією, що не проявилася у корів білоголової української породи [11]. Статистично вірогідної різниці за іншими показниками

хромосомної мінливості у досліджуваних тварин двох порід господарства ТОВ «Подільський господар» виявлено не було.

Отже, дослідження каріотипу корів білоголової української породи показали, що кількісні порушення хромосом, зокрема анеуплоїдія, у тварин двох груп (селекційне ядро та виробнича група) не перевищували спонтанний рівень цієї мінливості. Кратне збільшення числа хромосом (поліплоїдія) не проявилось.

Частота структурних порушень хромосом (хромосомні розриви) у тварин білоголової української породи відповідала нормі (2,0-2,3%), характерній для великої рогатої худоби за спонтанного мутагенезу. Це підтверджує, що формування в замкнутах популяціях здійснювалося за рандомізованою вибіркою

Встановлено породну особливість каріотипу корів білоголової української породи. Частота метафазних пластинок із анеуплоїдією у корів білоголової української породи становила 7,0%, а в української чорно-рябій молочної – 13,3% ($P > 0,99$).

3.1.1 Каріотипова мінливість корів червоної польської породи

В умовах сьогодення розвиток тваринництва супроводжується процесами, які призводять до поширення досить обмеженої кількості високопродуктивних спеціалізованих порід. Наслідком їх розширеного використання є зменшення поголів'я аборигенних та локальних порід, яким притаманні високі адаптаційні та резистентні властивості, екстер'єрно-конституційна міцність, висока життєздатність, пластичність, невибагливість до кормів та добра їх оплата, хороші відтворні та материнські якості, подовжена тривалість використання, багатоплідність [1, 178]. Генетичний потенціал існуючих аборигенних порід, їх внутрішньовидова мінливість і адаптаційна здатність забезпечують стійкий незалежний розвиток традиційного тваринництва у кожному конкретному регіоні [179, 180].

Локально адаптовані породи повинні залишатися функціональним елементом систем виробництва. Адже, комплекс ознак адаптованої пристосованості, вся гама яких залишається до цього часу ще не повністю вивченою, є для селекціонерів і фермерів одним із головних цінностей [166]. Нажаль, нині поза увагою залишається генетичний потенціал тварин локальних порід. Однією з таких порід великої рогатої худоби є червона польська порода української селекції. Тварин цієї породи розводять у Волинській та Тернопільській областях. Худоба добре пристосована до умов вологого клімату і кормів, вирощених на кислих ґрунтах, проте перебуває на межі повного зникнення, характеризується найгіршим становищем щодо виживання, має максимальну ступінь небезпеки – статус ризику Критичний [166]. Серед усіх порід великої рогатої худоби генотип цих тварин найменш вивчений. Тому актуальним є аналіз її каріотипової мінливості.

Цитогенетичний контроль здійснювали у корів червоної польської породи (30 гол.) господарства ПрАТ «Мшанецьке»Теребовлянського району Тернопільської області. (рис.3.2)



а

б

Рис.3.2 а) – корови червоної польської породи; б) - корови української червоно-рябої породи господарства ПрАТ «Мшанецьке»Теребовлянського району Тернопільської області,

Умови утримання тварин відповідали технології вирощування та виробництва молока. Мінливість каріотипу корів червоної польської породи показано на рис. 3.3

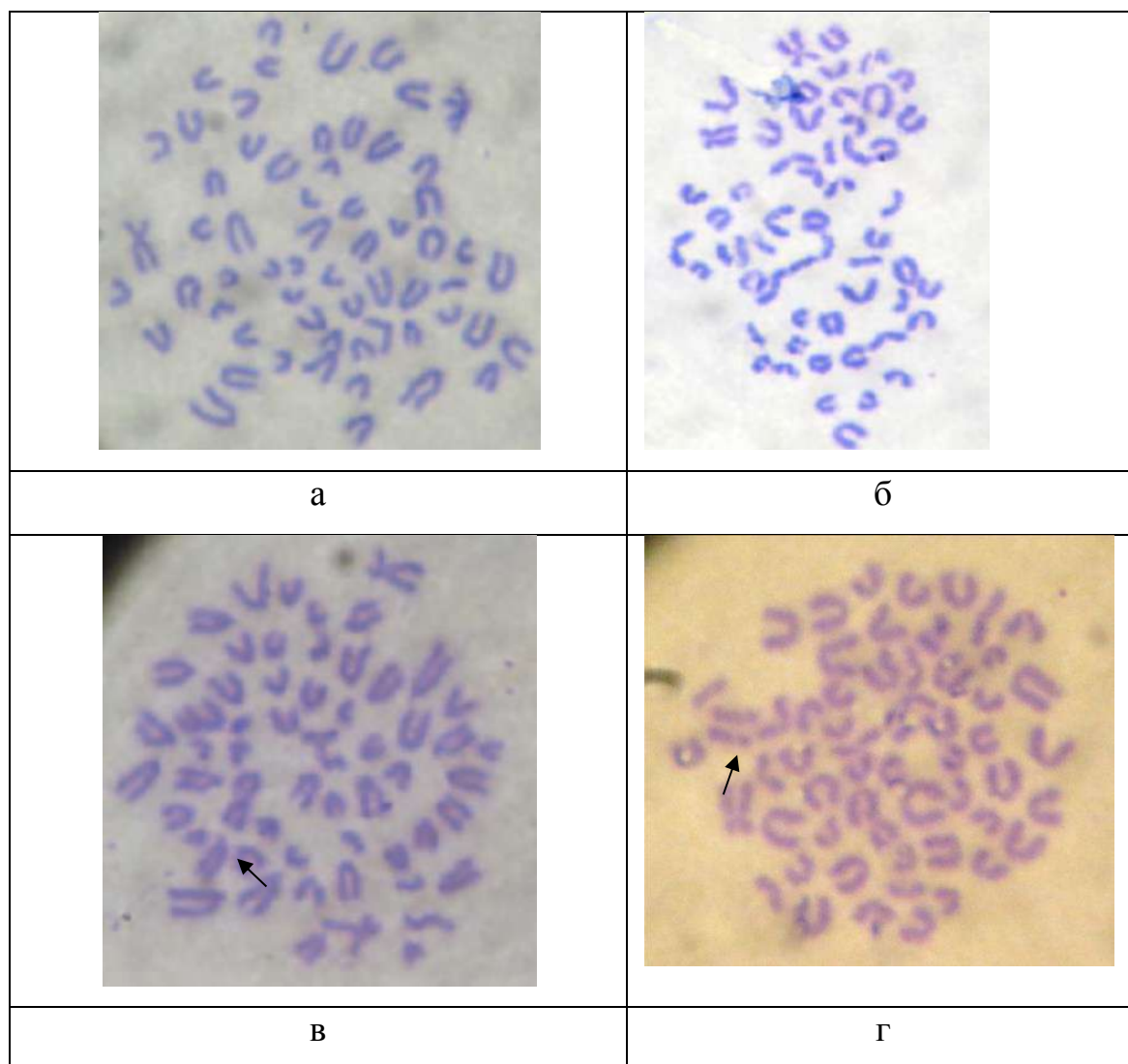


Рис.3.3 Мінливість каріотипу корів червоної польської породи:

а) норма каріотипу – $2n=60$; б) анеуплоїдія - $2n=56$; в) хромосомний розрив;
г) асинхронне розходження центромірних районів X- хромосоми, зб.×1000 разів

Територія, на якій розташоване господарство, характеризується особливим паратиповим чинником – підземні води села Мшанець, за даними Тереховлянської районної державної адміністрації, збагачені сірководнем і

використовуються для потреб сільськогосподарського підприємства. Дослідження щодо впливу води на здоров'я корів не проводились.

З метою дослідження стабільності каріотипу корів червоної польської породи господарства ПрАТ «Мшанецьке», було здійснено порівняльний аналіз цитогенетичної мінливості корів української червоно-рябої молочної породи (30 гол.) цього ж господарства (табл.3.2).

Таблиця 3.2

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

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

Одержані результати мінливості хромосом у досліджуваних тварин показали наявність кількісних та структурних порушень. Кількісні порушення, зокрема анеуплоїдія, у корів червоної польської породи становила 8,2%, а у тварин української червоно-рябої молочної породи – 6,1%, відповідно. Частка клітин із анеуплоїдією у корів української червоно-рябої молочної породи була нижчою порівняно з тваринами червоної польської породи, проте різниця середніх величин за цією ознакою виявилася статистично недостовірною. У досліджених тварин двох порід ця мінливість не перевищувала межі спонтанної хромосомної мінливості (1,5%–8,3%) у великої рогатої худоби [169].

Структурні порушення хромосом (хромосомні розриви) у представників двох порід знаходилися у межах 3,0%–5,1%, що теж не перевищують видові особливості, характерні для великої рогатої худоби за спонтанного мутагенезу [169]. У тварин червоної польської породи спостерігався вищий рівень кількісних та структурних порушень хромосом порівняно з тваринами української червоно-рябої молочної породи, проте з недостовірною різницею середніх величин за цими ознаками.

Вивчення нестабільності каріотипу популяції тварин, яких розводили у Польщі, показало наявність робертсонівської транслокації 1;29, частота якої становила 14% [292]. Це конститутивне цитогенетичне порушення не було виявлене у корів червоної польської породи української селекції господарства ПрАТ «Мшанецьке».

Сучасний масив червоної польської худоби створений у результаті використання племінного матеріалу споріднених червоних порід: червоної датської, естонської, англєрської. Такі чинники селекційного процесу можуть призводити до підвищеного рівня порушень хромосом [181].

3.1.2 Каріотипова мінливість корів бурої карпатської породи

Тварини бурої карпатської породи є прямими потомками древньої бурої карпатської худоби, яка була поширена по всій Середній Європі. Сучасна бура карпатська порода сформувалася у результаті складного відтворювального схрещування місцевої бурої худоби «рижка» і «мокань» із породами альпійського походження: горноїнською, монтафонською, швіцькою і альгауською. Одержані результати мінливості хромосом у досліджуваних тварин показали наявність кількісних та структурних порушень.

Нині бура карпатська порода є домінуючою в Закарпатській області. Вона добре пристосована для використання природних пасовищ в підніжжях гір, а також на височинах. Ці тварини характеризуються особливостями, які

не проявляються у тварин інших порід: високою стійкістю до захворювань, відсутністю кульгавості, твердим копитом з повільним стиранням.

Наразі бура карпатська порода відносяться до локальних малочисельних вітчизняних порід. За проведеними розрахунками, відповідно до рекомендацій FAO, вона перебуває в стані значного ризику. В Україні відсутні суб'єкти племінної справи з розведення цієї породи. Маточне поголів'я утримують лише у господарствах населення [11].

Для збереження специфічних особливостей та селекційних ознак, характерних для місцевих порід [11], необхідно володіти інформацією про спадковість цих тварин та своєрідність їх генотипу.

Цитогенетичний аналіз, спрямований на встановлення каріотипової мінливості корів бурої карпатської породи, проводили на біологічному матеріалі, відібраному у с. Нижні Ворота, Воловецького району Закарпатської області у одноосібних племінних господарствах. Досліджено 15 корів бурої карпатської породи та 15 помісних тварин (рис. 3.4).



Рис. 3.4 Корова бурої карпатської породи

Метафазні пластинки корів бурої карпатської породи зображені на рис.3.5

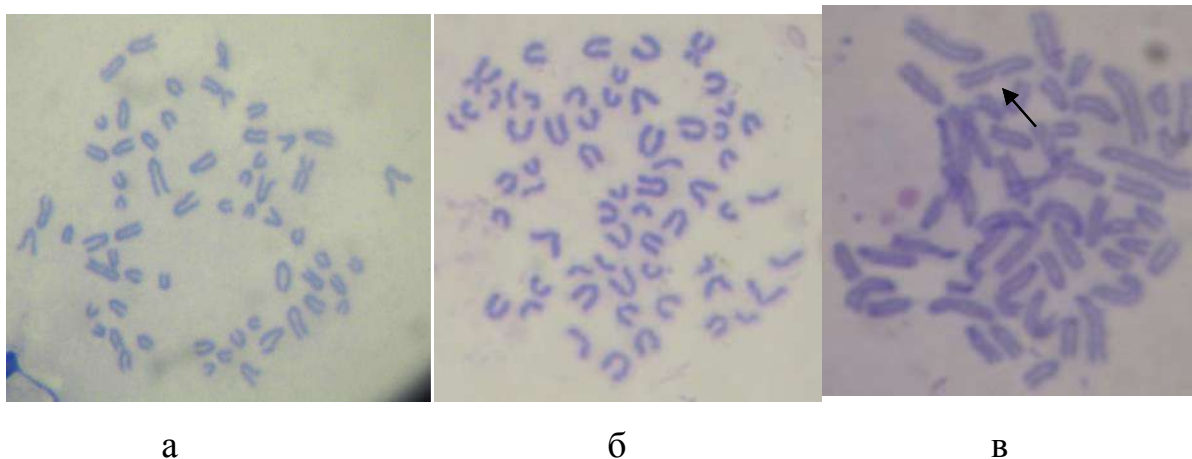


Рис.3.5 Каріотипова мінливість корів бурої карпатської породи

а) нома каріотипу $2n=60$; б) анеуплоїдія $2n=56$; в) $2n=60$, хромосомний розрив, зб. $\times 1000$ разів

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

Одержані результати показали, що для чистопородних тварин були характерні кількісні та структурні порушення хромосом. Кількісні порушення, анеуплоїдія, становили 1,6% і були виражені, в основному, гіпоплоїдними клітинами $2n=56-58$. Кратне збільшення хромосом, поліплоїдія, виявлена не була. Структурні порушення хромосом, хромосомні розриви, дорівнювали 0,76%, що не перевищує спонтанний рівень хромосомної мінливості, характерний для цього виду [6] (таблиця 3.3)

Таблиця 3.3

Мінливість каріотипу чистопородних і помісних корів, %, (M±m)

Порода	Кількість тварин (n)	Анеуплоїдія	Поліплоїдія	Хромосомні розриви
Бура карпатська	15	1,6±1,01**	-	0,76±0,37
Помісні тварини	15	3,3±1,88**	-	-

Примітка. ** – $p < 0,01$

Для помісних корів була характерна слідуєча каріотипова мінливість: частота метафазних пластинок із анеуплоїдією дорівнювала 3,3%, що відповідає спонтанному рівню цитогенетичної мінливості. Кратне збільшення хромосомної мінливості, поліплоїдія, не проявилася. Структурні порушення хромосом були теж відсутні. Центромірне злиття 1;29 пари хромосом за Робертсонівським типом у корів двох груп виявлено не було.

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 на рівні достовірності $p < 0,01$.

Частота структурних порушень хромосом менше одного відсотка або їх відсутність у корів бурої карпатської породи та їх помісей свідчить про низький ступінь соматичного мутагенезу. Це підтверджується і результатами інших дослідників. Зокрема, В.В. Дзіцюк зазначає кращу пристосованість локальних порід до «жорстких» умов середовища та стабільність їх геному [190].

3.1.3 Каріотипова мінливість тварин сірої української породи

Сіра українська порода є потужним джерелом генетичного матеріалу, який покладено в основу виведення багатьох вітчизняних комерційних порід

великої рогатої худоби [2]. Сьогодні сіра українська порода великої рогатої худоби належить до локальних малочисельних порід і знаходиться у стані ризику зникнення [11]. Серед усіх порід великої рогатої худоби генетичний потенціал сірої української породи вивчений недостатньо, тому аналіз її каріотипової мінливості є досить актуальним на цей час.

Проведення цитогенетичного аналізу сірої української худоби здійснювали у корів господарства Державне підприємство дослідне господарство Інституту тваринництва степових районів імені М.Ф. Іванова Асканія-Нова □ національного наукового селекційно-генетичного центру з вівчарства (30 голів) та господарства ДП «ДГ» «Поливанівка» ІЗК НААН (30 голів) (рис.3.6)



а

б

Рис.3.6 Тварини сірої української породи: а)-господарства ДП «ДГ» «Поливанівка» ІЗК НААН; б) –ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова»

Результати цитогенетичних досліджень корів сірої української породи представлені на рисунку 3.7 і в таблиці 3.4.

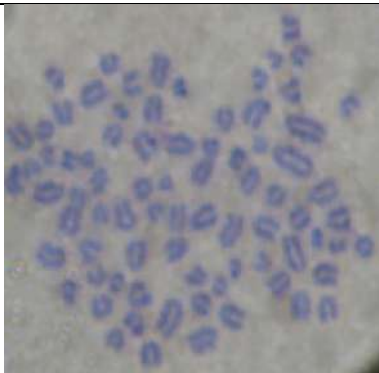
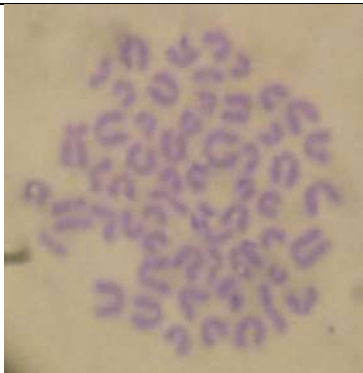
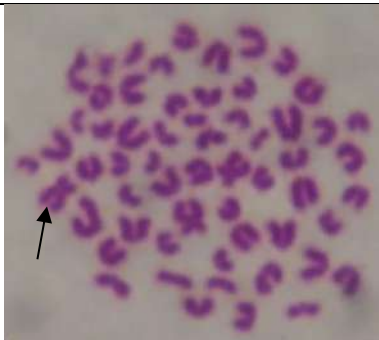
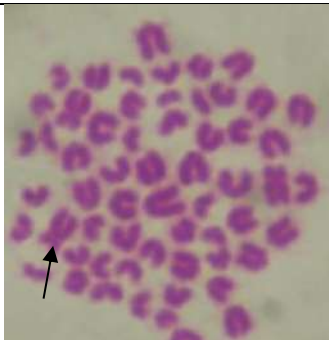
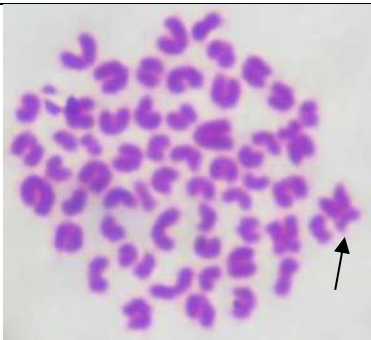
		
а) Каріотип в нормі, $2n=60$	а) Анеуплоїдія $2n=58$	а) Хромосомний розрив
		
б) Каріотип в нормі, $2n=60$	б) АРЦРХ-Х хромосоми	б) Поліплоїдія $4n=120$
		
б) Робертсонівська транслокація		

Рис. 3.7 Каріотипова мінливість корів сірої української породи: а) - господарства ДП ДГ ІТСП «Асканія-Нова»; б) - господарства ДП «ДГ» «Поливанівка» ІЗК НААН, зб. $\times 1000$ разів

Каріотипова мінливість тварин сірої української породи, %

Господарство	Анеу плоїдія	Полі плоїдія	АРЦРХ	Хромосомні розриви	РТ
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	—

Результати цитогенетичного аналізу показали, що частка клітин із анеуплоїдією у корів сірої української породи двох господарств становила 1,2 – 7,2% . Кратне збільшення хромосом у крові тварин господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» було відсутнє, а частота поліплоїдних клітин у крові тварин господарства ДП «ДГ «Поливанівка» становила 0,9%. Частота метафазних пластинок із асинхронним розходження центромірних районів хромосом для корів двох господарств знаходилася в межах 0,6–1,8%, що відповідає рівню спонтанної хромосомної мінливості. Хромосомні розриви, дорівнювала 1,5% у тварин господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» та 2,6 %, – у тварин господарства ДП «ДГ» «Поливанівка» ІЗК НААН та не перевищував спонтанний рівень цієї мінливості, характерний для виду *Bos taurus* [6].

При обстеженні тварин господарства ДП «ДГ» «Поливанівка» ІЗК НААН у однієї телиці була знайдена Робертсонівська транслокація 1;29, що становила 3,3% від усіх протестованих 30 голів тварин цього господарства. У

господарстві ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» Робертсонівської транслокації 1;29 виявлено не було.

Таблиця 3.5

Цитогенетична мінливість аборигенних порід великої рогатої худоби

Кількість тварин	Анеуплоїдія	Поліплоїдія	АРЦРХ	Хромосомні розриви	Робертсонівська транслокація
Білоголова українська					
Селекційне ядро - 20 гол.	6,0±3,64	—	2,0±1,81	2,3±1,95	—
Виробнича група -20 гол.	7,0±5,77	—	—	2,0±1,99	—
Червона польська					
30 гол.	8,2 ± 0,7	—	—	5,1 ± 0,4	—
Бура карпатська					
15 гол.	1,6±1,01	—	—	0,76±0,37	—
Сіра українська 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
Сіра українська ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова»					
30 гол.	1,2±0,27	—	0,6±0,25	1,5±0,45	—

Проведений цитогенетичний аналіз аборигенних порід великої рогатої худоби, які були досліджені, показав, що показники спонтанного соматичного мутагенезу мають широкі внутривидові межі, що зумовлено адаптогенними властивостями порід (табл. 3.5)

Так, у білоголової української, червоної польської, бурої карпатської, сірої української порід великої рогатої худоби найменший відсоток (1,2%) кількісних порушень (анеуплоїдії) проявився у тварин сірої української та найбільший (8,2 %) у корів червоної польської породи. Кратне збільшення числа хромосом, поліплоїдія, (0,9 %) було встановлене лише у тварин сірої української породи господарства ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК НААН. Межа розходження центромірних районів хромосом становила від 0,6 % у тварин сірої української господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова» до 2,0 % у тварин білоголової української. Найменший відсоток структурних порушень хромосом (0,76 %) – хромосомні розриви, були характерні для корів бурої карпатської породи та найбільший (5,1 %) – у червоної польської породи.

Частота тварин, яких дослідили із робертсонівською транслокацією 1;29 становила 3,3 % і була характерна для тварин сірої української породи господарства ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК НААН.

Для визначення впливу окремих генотипових та паратипових чинників на мінливість каріотипу великої рогатої худоби аборигенних (білоголової української, бурої карпатської, сірої української, червоної польської), 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 3/12УЧРМ був проведений однофакторний дисперсійний аналіз, результати якого наведені в таблиці 3.6

Таблиця 3.6

Сила впливу (η^2_x) породи на мінливість каріотипу, досліджуваних порід

Цитогенетичні показники	Число градацій	Порода	
		η^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.

3.2.1 Вплив збудника туберкульозу на стабільність каріотипу корів червоної польської породи

Цитогенетичний аналіз дозволяє виявляти тварин-носіїв конституційних порушень каріотипу, оцінювати рівень соматичного мутагенезу в клітинах їх крові, показувати наявність генотоксичних факторів, виділяти особин із стабільним каріотипом [182].

На час забору крові у тварин (25 гол.) господарства ПрАТ «Мшанецьке» Тереховлянського району Тернопільської області, господарство знаходилося на карантині у зв'язку з появою випадків захворювання на туберкульоз. (Акт дослідження на туберкульоз (туберкулінізація) від 15.05.2012р. Державна ветеринарна служба Тереховлянського р-ну Тернопільської обл.). Для встановлення впливу інфекційно-індукованого соматичного мутагенезу (збудника туберкульозу) на стабільність каріотипу було здійснено цитогенетичний моніторинг корів червоної польської породи. У 20 % досліджених корів (6 гол.) за результатами туберкулінізації був знайдений збудник туберкульозу.

Одержані 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 %. Відсоток анеуплоїдних клітин суттєво перевищує (у 2 рази) рівень спонтанної хромосомної мінливості за цією ознакою, характерною для тварин великої рогатої худоби [169]. Для повнішого вивчення причини появи метафаз із анеуплоїдією у лімфоцитах периферійної крові, досліджуваних тварин поділили на дві групи, відповідно до кількісного порушення хромосом (табл. 3.7).

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

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

Примітка. ***p<0,001

Першу групу складали тварини, у яких відсоток анеуплоїдії дорівнював 6,6–14,25 %, середній показник становив 9,9 %. У тварин другої групи відсоток таких клітин становив 15–30 %, середній показник – 22,6%. Різниця середніх величин за цією ознакою виявилася значущою (p<0,001). У другої групи тварин частка клітин із анеуплоїдією була значно вищою (у 3 рази) за спонтанний рівень (1,5–8,3 %) цієї мінливості [169]. На нашу думку, появи такої аномалії може передувати декілька причин. По–перше корови червоної польської породи української селекції це надто складні помісні тварини, при створенні яких використовували й використовують багато порід [184,185]. Такі чинники селекційного процесу можуть призводити до підвищеного рівня кількісних порушень хромосом. Така думка підтверджується дослідженнями вчених, проведеними на міжвидових, міжпородних та чистопородних тваринах великої рогатої худоби. Аналіз каріотипових характеристик показав, що загальне число клітин із абераціями у помісних тварин удвічі більше порівняно з чистопородними тваринами [181]. Друга причина, що викликає підвищений рівень анеуплоїдії – збудник туберкульозу.

Структурні порушення хромосом у представників цієї породи проявилися у вигляді хромосомних розривів. Середня частота їх становила 12,3 %. Це не перевищує рівень спонтанної хромосомної мінливості (0,17–11,1%), характерної для великої рогатої худоби [169]. На нашу думку

високий рівень хромосомних розривів (18,3 %) у 6-ти тварин—це результат підвищеної чутливості до інфекційних процесів. Оскільки, віруси, бактерії і інші мікроорганізми здатні викликати порушення апарату поділу клітин, змінюючи при цьому процес розходження хромосом, а також сприяти виникненню хромосомних аберацій [183], а в даному господарстві були зареєстровані випадки захворювання на туберкульоз.

Отже, дослідивши групу тварин червоної польської породи, можна зробити такі висновки: при породотворчому процесі цитогенетичний контроль є необхідним як маркер, який характеризує стабільність каріотипу тварин;

Серед 20 % досліджених тварин червоної польської породи української селекції встановлено підвищення кількісних порушень хромосом (анеуплоїдії) у 3 рази порівняно з рівнем спонтанної хромосомної мінливості.

Підвищений рівень структурних порушень хромосом (хромосомні розриви) проявився у 20 % тварин і розмах цієї мінливості становив 16,4–20,2 %. Однією з причин виникнення хромосомної мінливості у тварин червоної польської породи української селекції може бути інфікованість тварин збудником туберкульозу.

Однофакторний дисперсійний аналіз, проведений у корів червоної польської породи господарства ПрАТ «Мшанецьке», виявив силу впливу паратипового чинника (збудника туберкульозу) на стабільність каріотипу цих тварин (табл.3.8).

Таблиця 3.8

Сила впливу (η^2_x) збудника туберкульозу на стабільність каріотипу корів червоної польської породи

Цитогенетичні показники	Число градацій	Збудник туберкульозу	
		η^2_x	F
Анеуплоїдія	2	0,6275*	3,5
Хромосомні розриви	2	0,0169	0,03

Примітка. * $p < 0,05$

Частка впливу паратипового чинника (збудника туберкульозу) на кількісні порушення хромосом виявилася достовірною і становила 62%.

Для більш повної оцінки соматичного мутагенезу у корів господарства ПрАТ «Мшанецьке» використовували мікроядерний тест. Результати проведеного мікроядерного тесту у корів червоної польської породи за індукованого соматичного мутагенезу (збудника туберкульозу) показано у таблиці 3.9

Таблиця 3.9

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

Група	Лімфоцити із мікроядром, ‰	Двоядерні лімфоцити, ‰	Мітотичний індекс, ‰	Апоптоз, ‰
I група тварин	2,1±1,22	2,6±0,80	5,1±0,66	4,4±2,6
II група тварин	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 група тварин - відсоток анеуплоїдії дорівнював 6,6-14,25 %,

II група тварин - відсоток анеуплоїдії дорівнював 15-30 %

За даними літератури підвищена частота мікроядер (МЯ) у клітинах периферійної крові добре узгоджується із знайденою у них підвищеною частотою анеуплоїдії і тенденцією до відносно великої частоти метафаз із ХА, які є джерелом формування клітин із мікроядрами [193, 173]. Для тварин першої групи частота лімфоцитів із мікроядрами становила 2,1‰, що не перевищувала параметрів цитогенетичних показників великої рогатої худоби (lim 1,00–3,67‰) за спонтанного мутагенезу [172]. Для тварин другої групи

частка клітин лімфоцитів із мікроядром становила 4,8‰, що у 2,2 рази більше у порівнянні з тваринами першої групи. Оскільки, наявність мікроядер у лімфоцитах периферійної крові є показником генотоксичного впливу на організм тварини [172], нами був проведений кореляційний аналіз для встановлення взаємозв'язку кількості лімфоцитів із анеуплоїдією і лімфоцитів із мікроядрами. Визначено помірно виражену залежність між цитогенетичними показниками соматичних клітин для тварин першої групи при ($r=0,5035$) та сильно виражену залежність для тварин другої групи при ($r=0,7011$), проте, дані показники є невірогідні. Кореляційний аналіз показав середню силу зв'язку між лімфоцитами з мікроядрами і розривами хромосом. Частка апоптозних клітин у корів двох груп суттєво не відрізнялася між собою, а середня величина її становила 8,2‰, це у 4 рази більше за спонтанний рівень цитогенетичної мінливості [172]. За даними Ильинских при інфекційних процесах відбуваються апоптичні зміни в клітинах [183]. Середній показник частки двоядерних лімфоцитів у цьому стаді корів становив 3,0‰, що характерно для тварин порід молочного напрямку умовно контрольної групи [155]. Проте, у тварин другої групи частка двоядерних лімфоцитів була у два рази більша у порівнянні з першою групою корів. Вчені припускають, що двоядерні клітини можуть виникати як компенсація дії генотоксичних агентів для підтримки генотоксичного балансу в популяціях[172].

3.2.1 Співвідносність віку і хромосомної нестабільності у аборигенних порід великої рогатої худоби

Частота хромосомних змін залежить від віку тварин. Встановлені особливості вікових змін частоти хромосомних аберацій є загальнофізіологічною закономірністю для ссавців [91]. Збільшення частоти хромосомних аберацій з віком, обумовлене пониженням активності репарації ДНК і зміною макромолекулярного складу і фізико-хімічних властивостей хроматину [95, 96].

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».

Для аналізу впливу віку на спонтанну мінливість каріотипу, тварин яких досліджували, розділили на дві вікові групи (телиці 9-16 місяців та корови 2-2,5 роки). Результати досліджень показані у таблиці 3.10.

Таблиця 3.10

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

п го л.	Вік	Анеуплоїдія, %	Хромосомні розриви, %	АРЦРХ, %	Двоядерні лімфоцити, ‰	Лімфоцити із мікроядром ‰
15	9-16 міс.	10,4±1,50 ***	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 ***	1,5±0,36	-	1,8±0,42	3,2±0,20

Примітка. *** $p < 0,001$

Одержані результати цитогенетичного аналізу показали, що для досліджених тварин характерні структурні та кількісні порушення хромосом. У телиць 9-16 міс. частка клітин із анеуплоїдією дорівнювала 10,4%, це 1,5 рази вище за спонтанний рівень (1,5-8,3%) цієї мінливості, а у корів віком 2-

2,5 роки відсоток анеуплоїдних клітин становив 1,3%, і не перевищував рівень спонтанної хромосомної мінливості, характерної для великої рогатої худоби [169]. Різниця середніх величин за цією ознакою виявилася значущою на рівні достовірності ($p < 0,001$). На нашу думку підвищений рівень анеуплоїдії у молодих тварин є загальнофізіологічною закономірністю [177]. Дослідниками встановлено вплив віку на спонтанну частоту хромосомної нестабільності у лімфоцитах периферійної крові ссавців. Це підтверджується дослідженнями на організмі людей. Вікова динаміка частоти анеуплоїдних наборів хромосом у людей характерна для особин старечого віку та дітей [177]. Структурні порушення хромосом (хромосомні розриви) спостерігалися у телиць з частотою 2,6% та у корів 1,5% і не перевищували межі спонтанної хромосомної мінливості (0,17–11,1%), характерної для великої рогатої худоби. Різниця середніх величин за цією ознакою у тварин двох вікових груп була статистично недостовірною. Асинхронне розходження центромірних районів хромосом (АРЦРХ) проявилось лише у телиць із частотою 1,1%, і відповідало параметрам цієї мінливості (1,5–3,7%) за спонтанного мутагенезу.

Отже, 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%) [11] 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 ДПДГ ІТСР «Асканія-Нова» (табл. 3.11).

Сила впливу (η^2_x) віку на прояв мінливості каріотипу тварин сірої української породи

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

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

Одержані результати показали, що частка впливу віку тварин на мінливість їх каріотипу (анеуплоїдію, АРЦРХ, хромосомні розриви) є достовірною. Отже, встановлені особливості вікових змін у дослідженій популяції тварин є загальнофізіологічною закономірністю.

При проведенні мікроядерного тесту у різновікових тварин сірої української породи (телиці віком 9–16 місяців та корови віком 2–2,5 міс.) господарства ДПДГ ІТСР «Асканія-Нова» вірогідної різниці за часткою двоядерних лімфоцитів та лімфоцитів із мікроядром не спостерігалось.

Частка двоядерних лімфоцитів та лімфоцитів із мікроядром у клітинах периферійної крові досліджених тварин становила 1,8–2,6‰ та 3,2–3,4‰ відповідно та знаходилася на спонтанному рівні цитогенетичної мінливості у розрізі їх видової належності [168, 172]

3.2.2 Використання мікроядерного тесту для оцінки соматичного мутагенезу у тварин великої рогатої худоби локальних та малочисельних порід

Мікроядерний тест дозволяє виявити пошкодження хромосом, спричинені кластогенними (розрив хромосом) та анегенними (руйнуючи

апарат веретена) чинниками. Під час поділу клітин, фрагменти хромосоми більше не інтегруються в ядра дочірніх клітин. Вони залишаються в цитоплазмі, генеруючи мікроядра, які можна виявити за допомогою світлооптичної мікроскопії. Збільшення частоти мікроядер означає непоправне пошкодження ДНК і, таким чином, виявляється генетичне пошкодження, що говорить про ризик для успішного покоління клітин.

Тому для оцінки соматичного мутагенезу у тварин великої рогатої худоби локальних та малочисельних порід був проведений мікроядерний тест. На приготовлених цитогенетичних препаратах підраховують кількість двоядерних лімфоцитів (ДЯ) та одноподібних лімфоцитів із мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ). Частоту ДЯ, МЯ, МІ вираховують на 1000 клітин у промілі (‰) (Рис. 3.8).

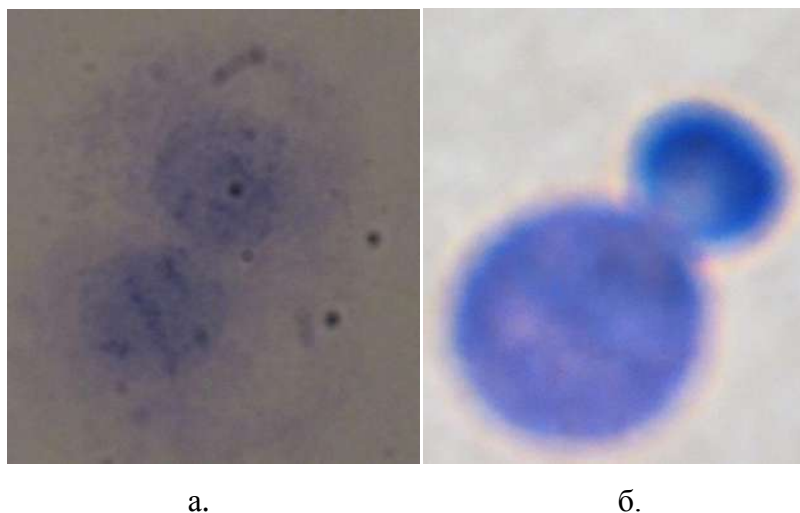


Рис. 3.8 Цитогенетичні параметри клітин: а) – двоядерний лімфоцит; б) – лімфоцит із мікроядром, зб. $\times 1000$ разів

Для детальнішої оцінки соматичного мутагенезу у корів червоної польської та української червоно-рябої молочної порід, які не вражені збудником туберкульозу, був проведений мікроядерний тест як показник генотоксичного впливу на організм тварини (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Результати мікроядерного тесту у корів червоної польської та української червоно-рябої молочної породи за спонтанного мутагенезу

Порода	Лімфоцити із мікроядром, ‰	Двоядерні лімфоцити, ‰	Мітотичний індекс ‰
Червона польська	$4,1 \pm 1,0$	$2,4 \pm 0,5^{***}$	$2,5 \pm 0,6$
Українська червоно-ряба молочна	$3,2 \pm 0,9$	$7,8 \pm 1,1^{***}$	$2,8 \pm 0,3$

Примітка. *** – $p < 0,001$

Частка одноядерних лімфоцитів із мікроядром у корів червоної польської та української червоно-рябої молочної порід знаходилася у межах 3,2–4,1‰, що не перевищувала показника (6,0‰), характерного для тварин молочного напрямку продуктивності [192].

Кількість двоядерних лімфоцитів у корів червоної польської породи дорівнювала 2,4‰, що відповідає рівню спонтанної хромосомної мінливості, характерної для тварин порід молочного напрямку продуктивності [26]. 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. Результати виявилися значущими на рівні достовірності $p < 0,001$. Підвищений рівень двоядерних лімфоцитів свідчить про дію токсичних агентів різної природи [194].

Для встановлення дії загального мутагенного навантаження на організм досліджуваних корів білоголової української, був проведений мікроядерний тест (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

Результати мікроядерного тесту, проведеного у корів білоголової української породи

Група тварин	Кількість	Лімфоцит із мікроядром, ‰	Двоядерний лімфоцит, ‰	Мітотичний індекс, ‰
Селекційне ядро	20	4,8±1,19	6,4±0,27	2,8±0,55
Виробнича група	20	5,0±1,17	5,6±0,57	3,8±1,34
M±m		4,9±0,09	6,0±0,39	3,3±0,49

Результати тесту показали, що частота лімфоцитів із мікроядрами у тварин двох груп знаходилася у межах 4,8 – 5,0‰, при середньому значенні 4,9‰, що не перевищує межу спонтанного рівня цитогенетичних показників великої рогатої худоби (6,0‰), характерної для тварин молочного напрямку продуктивності [155].

Для встановлення зв'язку між анеуплоїдією та лімфоцитами з мікроядром був проведений кореляційний аналіз. Проте, сила зв'язку між досліджуваними ознаками виявилася слабкою і недостовірною.

Середній показник частки двоядерних лімфоцитів (6,0‰) у досліджуваних корів, не перевищував показників, характерних для тварин порід молочного напрямку продуктивності [196]. Це свідчить про відсутність впливу несприятливих факторів на тривалість мітозу. Ушкодження хромосом і мітотичного апарату під впливом несприятливих факторів супроводжується утворенням атипових мітозів, що призводить до появи гігантських ядер або багатоядерних клітин [197].

Середній показник клітин, які ділилися (мітотичний індекс) становив 3,3‰, що майже у 2 рази нижче за частку двоядерних лімфоцитів. Такі показники мітотичного індексу свідчать про те, що територія, на якій

знаходиться господарство, не зазнає впливу радіонуклідного забруднення [198]. Мікроядерний тест у тварин бурої карпатської породи та їх помісей показав такі результати (таблиця 3.14).

Таблиця 3.14

Результати мікроядерного тесту корів бурої карпатської породи та їх помісей,
‰

Порода	Кількість тварин (n)	Лімфоцит із мікроядром	Двоядерний лімфоцит	Мітотичний індекс
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

Всі показники мікроядерного тесту (частка лімфоцитів з мікроядром 1,7–2,0 ‰, двоядерних лімфоцитів 1,5–2,7‰, та мітотичний індекс 4,8–5,5 ‰, відповідно) у помісних тварин порівняно з чистопородними тваринами бурої карпатської породи були вищі, проте з невірогідною достовірністю і не перевищували межу спонтанного рівня хромосомної мінливості за умов відсутності прямого генотоксичного впливу.

Отже, низький рівень соматичного мутагенезу та більш стабільний каріотип спостерігався у чистопородних тварин бурої карпатської породи порівняно з помісними. Цитогенетичні параметри клітин (‰) аборигенних порід великої рогатої худоби відображено у зведеній таблиці 3.15.

Таблиця 3.15

Результати мікроядерного тесту аборигенних порід великої рогатої
худоби, ‰

Порода	n гол.	Лімфоцит із мікроядром	Двоядерний лімфоцит	Мітотичний індекс
ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова»				
Сіра українська	30	1,1±0,32	2,2±0,34	2,8±0,30
ПРАТ «Мшанецьке» Тербовлянський район Тернопільської області				
Червона польська	30	4,1 ± 1,00	2,4 ± 0,50	2,5 ± 0,60
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

Так, у досліджених тварин аборигенних порід, частка клітин із мікроядром коливалася у межах 1,1 для сірої української та 5,0 ‰ для білоголової української; частка двоядерних лімфоцитів – 1,5 (бура карпатська) – 6,4 ‰ (білоголова українська) та швидкість поділу клітин становила 2,5 (червона польська) – 4,8 ‰ (бура карпатська).

Каріотип корів сірої української породи, яких досліджували, характеризується високою стабільністю цитогенетичних параметрів клітин (‰), що є свідченням наявності унікального генетично-детермінованого механізму високої репарації та адаптивної стійкості до несприятливих факторів навколишнього середовища.

Корови червоної польської породи характеризуються зниженою чутливістю до мутагенних чинників.

За результатами мікроядерного тесту у корів білоголової української породи встановлено середню частоту лімфоцитів із мікроядрами - 4,9‰, що не перевищує межу спонтанного рівня, характерного для тварин молочного напрямку продуктивності. Середній показник частки двоядерних лімфоцитів (6,0‰) свідчить про відсутність впливу несприятливих факторів на

тривалість мітозу, а показники мітотичного індексу (3,3‰) свідчать про те, що територія, на якій знаходиться господарство, не зазнає впливу радіонуклідного забруднення.

Встановлено вищу за спонтанний рівень частоту клітин із анеуплоїдією у корів української чорно-рябої молочної породи порівняно з коровами білоголової української породи. Різниця середніх величин за цією ознакою у корів білоголової української та української чорно-рябої молочної порід виявилася значущою на рівні достовірності $p < 0,01$.

Низький рівень показників мікроядерного тесту у корів бурої карпатської породи свідчить про стабільність каріотипу та високу коадаптаційну здатність до умов навколишнього середовища.

3.3 Короткострокове тестування «Спосіб визначення мутагенної активності (сірководневої води) на організм *Drosophila melanogaster*»

Підвищений рівень двоядерних лімфоцитів у крові корів української червоно-рябої молочної породи господарства ПрАТ «Мшанецьке» свідчить про дію токсичних агентів різної природи [199]. За даними Тереховлянської державної адміністрації надра району містять значні ресурси мінеральних вод. Найбільш збагачені сірководнем води у с. Мшанець.

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*».

Короткостроковий тест «Визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster*» був використаний шляхом обробки ксенобіотиком самців, їх схрещування з інтактними віргінними (жодного разу не заплідненими) самками та подальшого обліку індукованих домінантних летальних мутацій у їх потомків. Аналізували самців *Drosophila*

melanogaster лінії Canton-S (15 культур), що були вирощені на середовищі, до складу якого входила вода з сірководнем (рис.3.9).



а

б

Рис. 3.9 Визначення мутагенної активності сірководневої води на *Drosophila melanogaster*

Примітка. а – культура дрозоділи, вирощена на контрольному середовищі; б – культура дрозоділи, вирощена на поживному середовищі, приготовленому на воді із сірководнем

Мутагенний ефект оцінювали за індукцією домінантних летальних мутацій (ДЛМ) на постембріональній стадії розвитку дрозоділи – на стадії лялечки. Основним показником рівня домінантних летальних мутацій є частота постембріональних втрат, яка оцінюється за відношенням кількості загинувших лялечок до загальної кількості лялечок за формулою:

$$\text{ДЛМ} = \text{ЗЛ} / (\text{ЖЛ} + \text{ЗЛ}) \times 100\%, \quad (3.1)$$

де: ЗЛ – кількість загиблених лялечок;

ЖЛ – кількість живих лялечок [201].

Самок вирощували на середовищі, приготовленому на дистильованій воді. Схрещених із самцями (контрольної та дослідної групи) самок утримували на середовищі з дистильованою водою.

Після виходу личинок на стінках пробірок спостерігали утворення лялечок. На цій стадії розраховували загальну кількість лялечок у дослідній та контрольній групі. Кількість лялечок для дослідної та контрольної групи була практично однаковою (470 та 487 відповідно). Якщо з лялечки виходить імаго (доросла муха), то від неї на стінках пробірки залишається пуста прозора оболонка. Загиблі лялечки – темні непрозорі залишаються на стінках пробірок. Частка загиблених лялечок у контрольній групі становила 11,3%, а у дослідній – 22%. Показником рівня домінуючих мутацій було відношення кількості загиблених лялечок до загальної кількості лялечок. Для статистичної обробки даних використовували критерій χ^2 [200] (табл.3.16).

Таблиця 3.16

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

Проаналізовано культур дрозопіл	Частота	Значення	
	ПЕЛМ* %, М ± m	χ^2	P
Контроль			
15	11,3 ± 2,64	–	
Вода з сірководнем			
15	25,0 ± 0,71	10,23	< 0,01

Примітка: * ПЕЛМ – постембріональні летальні мутації

Проведений тест показав, що у культур дрізофіл, вирощених на середовищі, приготовленому на воді з сірководнем, частота ПЕЛМ (25%) у 2 рази вища порівняно з контролем (11,3%), що свідчить про наявний мутагенний ефект сірководню ($\chi^2=10,23$; $p < 0,01$), але слабкої активності (якщо частота домінантних летальних мутацій у досліді перевищує спонтанний рівень у 2–3 рази, це свідчить про слабку мутагенну активність) [201].

Отже, підвищення частки двоядерних лімфоцитів у периферійній крові корів української червоно-рябої породи господарства ПрАТ «Мшанецьке» може бути викликане паратиповим чинником (сірководнем у воді). Спонтанний рівень цієї мінливості у корів червоної польської породи цього ж господарства, яких утримують у цих самих умовах, пояснюється зниженою чутливістю до мутагенних чинників, порівняно з коровами української червоно-рябої молочної породи.

Проведений тест «Спосіб визначення мутагенної активності сірководню на *Drosophila melanogaster*» показав наявний мутагенний ефект сірководню ($\chi^2 = 10,23$; $p < 0,01$), проте слабкої активності.

Підвищення частки двоядерних лімфоцитів у периферійній крові корів української червоно-рябої породи викликане паратиповим чинником (сірководнем у воді).

Висновки до розділу 3

1. У корів білоголової української породи виявлено спонтанну цитогенетичну мінливість у таких параметрах: кількісні порушення хромосом (анеуплоїдія – 6,5%); АРЦРХ – 1,0%; структурні порушення (хромосомні розриви) – 2,2%.
2. Встановлено породну особливість каріотипу корів білоголової української та української чорно-рябої молочної порід. Підвищений відсоток метафаз

- із анеуплоїдією (13,3% $p < 0,01$) виявлено у корів української чорно-рябої молочної породи.
3. Встановлено особливості каріотипу корів бурої карпатської породи та їх помісей. У 2 рази вищий відсоток клітин із анеуплоїдією (3,3% $p < 0,01$) виявлено у помісних тварин бурої карпатської породи.
 4. Статистично вірогідних 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 Rb 1; 29 – 3,3% у корів господарства ДП «ДГ» «Поливанівка» ІЗК НААН.
 5. Встановлено вікову мінливість прояву анеуплоїдії у телиць сірої української породи віком 9–16 міс. та корів віком 2 – 2,5 років господарства ДП «ДГ ІТСР «Асканія-Нова». Межа мінливості становила 10,4 –1,3 % ($p < 0,01$).
 6. Породної особливості каріотипу корів червоної польської та української червоно-рябої молочної породи за кількісними та структурними порушеннями хромосом виявлено не було.
 7. За інфікування збудником туберкульозу у корів червоної польської породи спостерігалось статистично достовірне підвищення частоти лімфоцитів із анеуплоїдією ($p < 0,001$) у 3 рази, розривів хромосом ($p < 0,001$) –у 2,2 рази (у 20% тварин) порівняно із неінфікованими тваринами.
 8. Паратиповий чинник, сірководень у воді, викликає підвищення рівня двоядерних лімфоцитів (7,8%) у корів української червоно-рябої молочної породи, що у 3 рази більше, порівняно з коровами червоної польської породи.

Список власних публікацій, результати яких відображені в цьому розділі

1. Стародуб Л. Ф., Остаповець Л.І. Міжпородна диференціація корів порід абердин–ангус і українська чорно-ряба молочна за рівнем соматичного мутагенезу. *Біологія тварин*. Львів, 2012. Т.14. № 1–2. 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. Київ: 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. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України, 2013. 5 (41).URL: [http://nbuv.gov.ua/j-pdf / Nd.2013.5.9.pdf](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.Стародуб Л.Ф. Вплив екзогенних факторів на стабільність каріотипу великої рогатої худоби . *Розведення і генетика тварин*. Київ. 2015. № 50. С. 167–173

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

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

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

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

9. Копылов О. К., Стародуб Л., Мохначева Н., Супрович Н. Особенности изменчивости генома крупного рогатого скота серой украинской породы по цито- 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).

10. Стародуб Л.Ф. Особливості каріотипу корів білоголової української породи. Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН. 2020. №134. С.177-185. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

11. Стародуб Л. Ф., Резникова Н. Л., Височанський Й. С. Каріотипова мінливість корів бурої карпатської породи. *Розведення і генетика тварин*. Чубинське: 2021. С. 226 – 231. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

РОЗДІЛ 4.

ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ ЛОКАЛЬНИХ ТА ЗНИКАЮЧИХ ПОРІД КОНЕЙ

4.1 Гуцульська порода коней – аборигенна порода українських Карпат

За останні десятиріччя в Україні задокументовано племінне розведення 17 порід коней, яких поділяють на групи за переважним використанням і походженням [166]. Гуцульські коні є найстарішою українською породою, [142] (Golovach MJ, Golovach MM 2013), сформованою понад 400 років тому [214] на просторах гірської частини Українських Карпат – Гуцульщини. Незамінні у всіх сферах життєдіяльності місцевих жителів у минулому, ці коні й досі залишаються надійними помічниками при різному використанні в складних кліматичних та географічних умовах. Збереження генофонду гуцульської породи коней, удосконалення її племінних та господарських якостей були включені в «Програму збереження генофонду локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин в Україні на 2017-2025 роки». За даними Державного племінного реєстру, зробленого в динаміці 2011-2017 років, спостерігається тенденція до щорічного скорочення кількості як племінних господарств так і загального й маточного поголів'я коней гуцульської породи. За проведеними розрахунками, відповідно до рекомендацій FAO, ці тварини перебувають за статусом ризику в критичному стані [213]. За іншою системою оцінки згідно з рекомендаціями Європейської асоціації з тваринництва, що розраховується за показниками рівня інбридингу протягом 50 років відтворення (ΔF -50), гуцульська порода коней перебуває в сильній небезпеці втрати генофонду породи. Розрахований рівень статусу ризику, в яких перебуває порода, надає інформацію для зацікавлених осіб (перш за все, відповідним державним структурам) про те, де і як швидко необхідно приймати відповідні дії [176]. Питання вивчення особливостей породи гуцульського коня, її історії розвитку та збереження є досить актуальним на сьогоднішній день для

подальшого сприяння захисту унікальних гірських коней та збільшення їх чисельності. Тому, метою нашої роботи було проведення ретроспективного аналізу літературних даних історії розведення та збереження гуцульських коней на українських землях, починаючи з XIX століття та висвітлення системи заходів збереження коней гуцульської породи в теперішній час.

Для вивчення історії розведення та збереження гуцульських коней на українських землях, починаючи з XIX століття, був проведений ретроспективний аналіз літературних даних, архівних матеріалів, фотографій і листівок XIX- XX ст. із сімей колишніх наїзників та працівників Державної стаднини огирів (станція жеребців) у Судовій Вишні, а також висвітлено систему заходів збереження коней гуцульської породи в теперішній час.

Аналіз архівних матеріалів та літературних даних про розведення та збереження гуцульських коней на українських землях, починаючи з XIX ст., свідчить про те, що гуцульські коні - це найстаріша українська порода коней, які отримали назву від українських горян. Гуцульських коней було виведено на території Східних або Лісистих Карпат в районі Гуцульщини і Буковини в верхніх течіях рік Черемоша, Прута і Путили. До кінця не встановлено, яким є походження цієї породи. Існує думка про виникнення існуючого гуцульського коня від примітивних коней таких як тарпан і кінь Пржевальського у поєднанні з благородними арабськими, польськими, турецькими, норицькими кінями, загартованими гірською природою [214]. Основним ареалом поширення гуцульського коня була територія українських Карпат. Отже, порода гуцульських коней формувалася у сім'ях українських гуцулів, а вже потім була вдосконалена австрійськими, польськими та румунськими конярами [42, 218]. У кінці XIX – початок XX ст. територія Буковинської Гуцульщини була найбільшим осередком гуцульського конярства. На полонині Лучині, в Південній Буковині, знаходилася станція конярства расових гуцульських коней (1877р.). Основоположником конярства на Лучині був гуцул-коняр Ревенчук із села Молдавиці-Сулиці. Йому вдалося знайти серед коней-гуцулів 10 кобил і одного огира чисто

гуцульської раси. Їхня кількість невдовзі зросла до тисячі. У Галицькій Гуцульщині австрійський уряд тримав дві стаї гуцульських огирів: у Косові, засновану у 1891 році та в селищі Жаб'є, створену у 1895 році [43]. Свідченням розведення та збереження породи гуцульських коней на українських землях є рис. 4.1

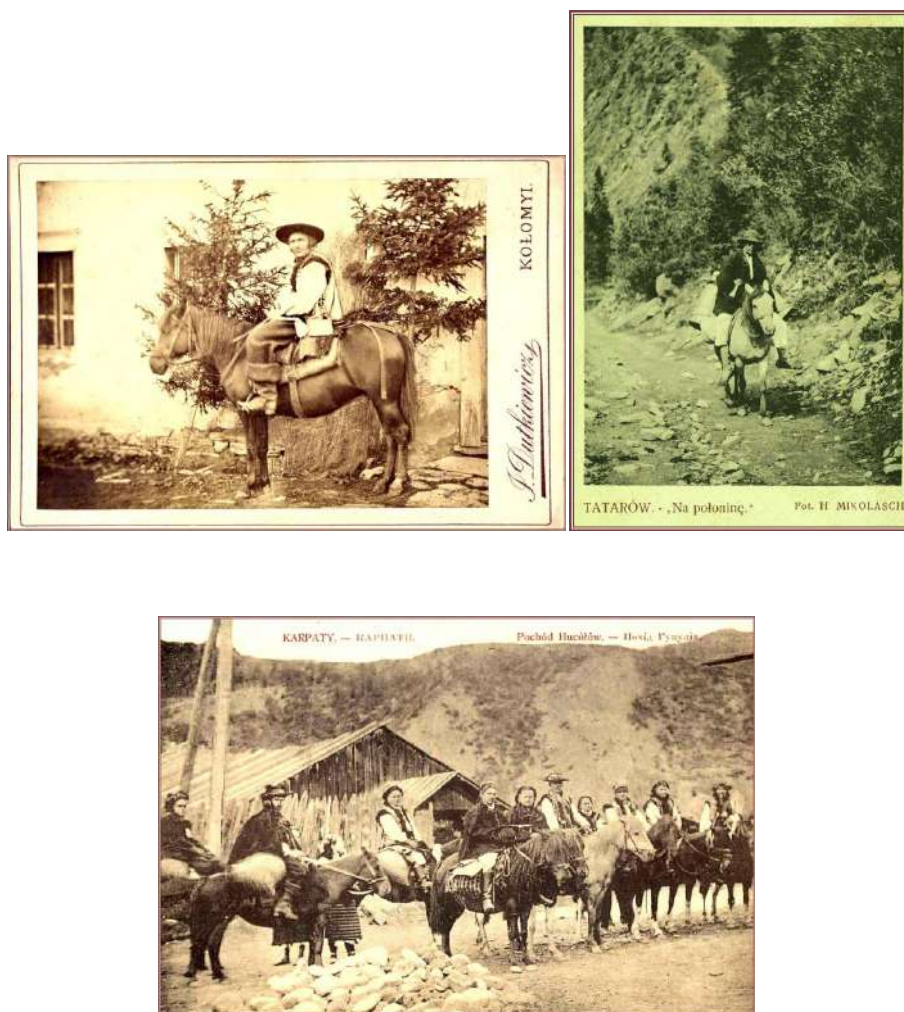


Рис. 4.1 На зде́сїу: 1/5 Нуцулі на коніах Нуцульскіах. Zdejęcia, pocztówki z XIX / XX w. На фото: 1/5 Гуцули на гуцульських конях. Фотографії, листівки XIX / XX століття [43]

Історичним фактом формування 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 (Gazeta Lwowska, 1909) (рис. 4.2).



Рис. 4.2 Вирізка з газети (Gazeta Lwowska, 1909) Розпорядження про перенесення Державної Стаднини огирів з Дроговижа до Судової Вишні

За короткий час збудували три конюшні на 150 коней, стайню-лікарню для хворих коней, велику крыту школу верхової їзди, каретний двір, кузню (Рис.4.3, Рис.4. 4).(Pocztówka, 1908, Pocztówka, 1909) [216, 217].

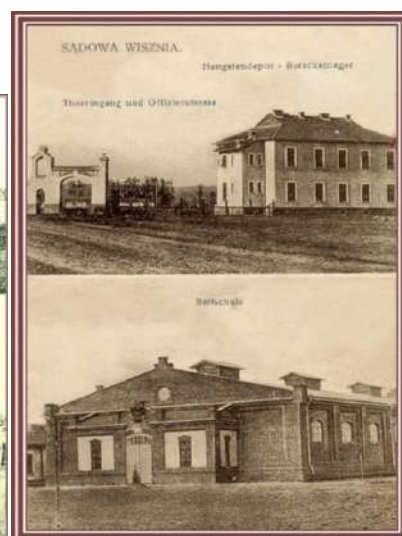
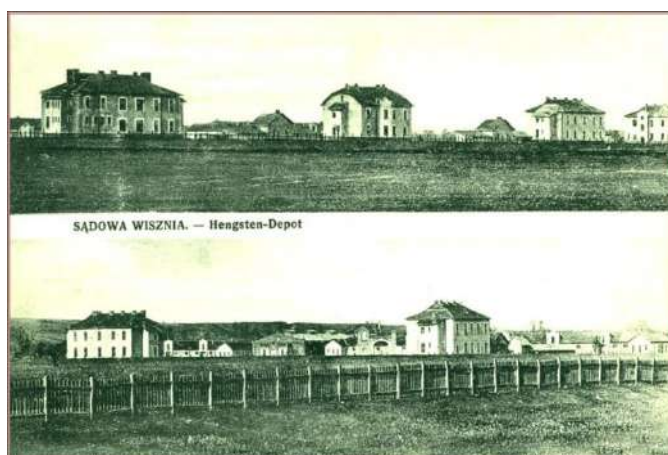


Рис. 4.3 Побудована та Рис.4.4 Головна брама. огорожена Державна стаднина огирів Школа верхової їзди, м. Судова Вишня, 1908 р. [216] 1909 р. [217]

З кінця XIX- до початку XX ст. жеребців із Судової Вишні перевозили до пунктів розмноження (тоді в Австрії їх називали «Кінські підстанції») в

Коломию, Львів, Косів, Станіслав, Перемишль, де розміщувалася австрійська кіннота, та підрозділи, де були коні для офіцерів у піхотних, артилерійських та саперних частинах.

До другої світової війни Державна Стаднина огирів обслуговувала військові частини та приватних власників коней у воєводствах Львівському, Тернопільському та Станіславському (Табл. 4.1) [215].

Таблиця 4.1

Місцевість, де використовувалися жеребці гуцульської породи з Державної Стаднини огирів

Повіт, місцевість	Порода коней
Бучацький повіт, місто Бучач	гуцульська
місто Яворів	арабо - гуцульська
Станіславський повіт, село Павелче	гуцульська
Мостиський повіт, село Ружники	гуцуло-коник
Мостиський повіт, містечко Судова Вишня	гуцульська, гуцуло-коник
Гміна Жаб'є	гуцульська

Дані ретроспективного аналізу архівних та літературних матеріалів свідчать про те, що формування та збереження породи гуцульських коней відбувалося на українських землях.

Всіх разом у Судовій Вишні в 1933 році було 144 голів коней, в тому числі й жеребці гуцульської породи (табл.4. 2), [215].

Таблиця 4.2.

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, Góral - 4, Góral -12, Hroby –I, Hroby – 4, Kapitan, Pryslić	10
Арабо-гуцульські помісні	Capul – 15	1
Гуцуло-коник помісні	Halicz, Harbuz	2

Існує 6 генеалогічних ліній видатних жеребців-плідників гуцульської породи, які признані в країнах, де розводять цих коней. З них три огирі народжені на українських землях (Горал, народжений в 1899 р. в околицях селища Жаб'є, Гургул - в 1924 р. та Полян - в 1929 р., народжені в Косівському повіті), а три інших - Гробі народжений в 1895 р., Оусор в 1929 р., Петросу в 1930 р. в Румунії[215].

Дані ретроспективного аналізу архівних та літературних матеріалів свідчать про те, що формування та збереження породи гуцульських коней відбувалося на українських землях.

Заходи щодо збереження та розвитку коней гуцульської породи проводяться і зараз. Так, у національному природному парку (НПП) «Гуцульщина» на відповідному рівні проводиться науково-дослідна робота, спрямована на збереження генофонду гуцульської породи коней, а також своїми силами вже розпочато створення центру з відтворення гуцульських коней та гіпотерапії – формується селекційне стадо. Метою діяльності Центру стане забезпечення основних напрямків ведення племінного,

виробничого, спортивного, рекреаційного, продуктивно-прикладного конярства.

Гуцульський кінь повинен стати своєрідним символом парку і зображенням-логотипом на сувенірній продукції НПП. Зараз у НПП «Гуцульщина» знаходиться 12 голів племінних гуцульських коней. Чистопородного жеребця 52 Варніка 255 лінії Оусора завезено з Польщі, використовують по обміну як плідника в Закарпатську та Житомирську області. (Рис. 4.4).



Рис. 4.4 Чистопородний плідник 52 Варнік 255 гуцульської породи.

Національний природний парк «Гуцульщина»

У напрямку збереження гуцульської породи коней в Карпатському регіоні досить актуальним є міжнародне співробітництво в рамках програми транскордонного співробітництва Польща-Білорусія-Україна. Так, Національний природний парк «Гуцульщина» в 2015 році прийняв участь в проекті «Створення Польсько-Українського центру розведення та популяризації коней гуцульської породи». Спільно з польськими партнерами було розроблено стратегію «Повернення гуцульського коня в його природне середовище». А Національний природний парк «Верховинський» у 2020 році

приймає участь у міжнародному українсько-польському проекті «Пізнання природи і багатства Карпат з гуцульським конем».

На Гуцульщині та Закарпатті до цього часу дотримуються давньої традиції проведення виставок – оглядів коней, які ще з 1925 року за ініціативи спілки конярів почали проводити спочатку у Жаб'є, а потім у Косові та Устеріках [218]. Дані про проведення однієї з виставок коней у НПП «Верховинський»: в урочищі Запідок на околицях Верхнього Ясенова 28 гривастих особин із Криворівні, Буківця, Верхнього Ясенова, Верховини та Яворова змагалися за право бути кращими. Виставка проводилася з метою популяризації аборигенної породи гуцульських коней та переваги їх використання в рекреаційно-туристичній галузі. Власне, акція відбулася за сприяння Європейського Союзу в рамках семінару-навчання «Гуцульський кінь в культурі Карпат» (Рис 4.5).



Рис.4.5 Виставка-огляд коней гуцульської породи. Національний природний парк «Верховинський»

Однак, за останні роки, через кризові явища в економіці України, спостерігається суттєве зменшення державної фінансової підтримки галузі конярства, племрепродуктори з розведення гуцульської породи коней в Україні опинились в скрутному економічному стані. На сьогодні в Україні тільки 2 господарства (НВА «Племконецентр» та ФГ «Полонинське

господарство») з розведення гуцульської породи коней мають статус племрепродуктора. (табл.4.3).

Таблиця 4.3

Наявність племінного поголів'я гуцульської породи коней (гол.), станом на 01.01.2020 р.

Область	Господарство	Жеребці	Кобил о матки	Ремонтний молодняк	Реєстр
Закарпатська	НВА «Племконецентр »	3	30	2	З Державного реєстру суб'єктів племінної справи у тваринництві
	ФГ «Полонинське господарство»		22	56	
Івано- Франківська	Національний природний парк «Гуцульщина»	2	5	5	За даними інвентаризації поголів'я НПП «Гуцульщина»
	Національний природний парк «Верховинський»				За даними інвентаризації поголів'я НПП Верховинський

Племінне поголів'я гуцульської породи коней різко зменшилося. Складна ситуація склалася також в конярстві селянських господарств, які останні 25 років були основним суб'єктом з розведення гуцульських коней і

залишаться таким надалі. Селекційно-племінна робота в цих господарствах проводиться стихійно, або не проводиться зовсім. (Табл.4.4).

Таблиця.4.4

Поголів'я типових гуцульських коней у селянських господарствах
Львівської, Івано-Франківської та Закарпатської областях станом на
01.01.2020 р.

Область	Всього коней у селянських господарствах	Коні гуцульської породи, %	Реєстр
Закарпатська	3000 гол.	10-20%	Держспоживслужба ідентифікації тварин
Івано-Франківська	7484 гол.	10-20%	За даними статистичної форми 6 сілрада річна статистика
Львівська			Держпродспоживслужба
Турківський р-н	2762 гол.	20%	
Сколівський р-н	910 гол.	20%	

Отже, для збереження унікальної гуцульської породи коней сьогодні виникла необхідність об'єднати власників (племінні та приватні господарства) чистопородного і найбільш типового поголів'я гуцульських коней, науковців і фахівців з метою покращення селекційно-племінної роботи, застосування економічно-ефективних методів вирощування, годівлі, утримання та використання, впровадження наукових розробок для покращення господарсько-корисних та племінних якостей коней, а також налагодження міжнародної співпраці.

Отже, дані ретроспективного аналізу архівних та літературних матеріалів свідчать про те, що вивчення, формування та вдосконалення породи гуцульських коней в XIX – XX ст. відбувалося на українських землях.

В напрямку збереження гуцульської породи коней досить актуальним є міжнародна співпраця в рамках програми транскордонного співробітництва Польща-Білорусія-Україна.

Починаючи з 2011 року, спостерігається тенденція до щорічного скорочення кількості як племінних господарств так і загального й маточного поголів'я коней гуцульської породи. Для збереження унікальної гуцульської породи коней необхідна об'єднана співпраця власників (племінні та приватні господарства) чистопородного і найбільш типового поголів'я гуцульських коней, науковців та фахівців.

4.2 Особливості каріотипу української аборигенної гуцульської породи коней

Для розв'язання однієї з глобальних проблем, які постали перед людством у XXI столітті – збереження біорізноманіття нашої планети, необхідні знання про структуру генофонду та оцінку генетичного різноманіття локальних порід домашніх тварин, як пріоритетних об'єктів охорони в агробіоценозах [213]. Гуцульські коні відносяться до найстаріших порід коней в Україні [42], які за назвою генофондового об'єкту належать до групи «Місцеві (гірські та поні)» I-шої категорії (генофондовий об'єкт, який вже зараз перебуває на межі зникнення) вітчизняної класифікації та ТР–транскордонної регіональної (класифікації FAO) генофондових об'єктів за загрозами для існування та підходами до зберігання [213,176]. Одним із принципів визначення якісної своєрідності гуцульських коней є проведення генетичного моніторингу.

Спонтанна цитогенетична мінливість коней у порівнянні з іншими видами сільськогосподарських тварин вивчена набагато менше. У конярстві цитогенетичні дослідження, в основному, проводять у тварин, у яких спостерігається безпліддя або інші відхилення від норми [219]. До тепер

недостатньо вивченим залишається породоспецифічний хромосомний поліморфізм коней. Тому, дослідження цитогенетичних особливостей спонтанного мутагенезу коней гуцульської породи є досить актуальним на сьогоднішній день.

Цитогенетичний контроль здійснювали у коней гуцульської породи Національного природного парку «Гуцульщина» (20 гол.) м. Косів та господарства ТЗОВ «Край неба» (20 гол.) Коломийського району с. Лісна Слобідка Івано-Франківської області. Більшість із досліджених тварин занесені до Державної книги племінних коней гуцульської породи (том II) (рис.4.6).



Рис.4.6 Коні гуцульської породи

Для визначення генетичної специфічності на хромосомному рівні, виявлення темпів соматичного мутагенезу, з'ясування факторів мутагенного впливу коней гуцульської породи був здійснений цитогенетичний контроль. Цитогенетичні дослідження коней різних порід підтверджують наявність породоспецифічності частоти прояву кількісних та структурних хромосомних порушень [221,220]. У процесі досліджень враховували: кількісні порушення хромосом – анеуплоїдію (А), поліплоїдію (ПП), клітини із асинхронністю розщеплення центромірних районів хромосом (АРЦРХ), структурні аберації – розриви хромосом (ХР). На цих самих препаратах підраховували кількість двоядерних лімфоцитів (ДЯ) та одноядерних

лімфоцитів із мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ). Частоту ДЯ, МЯ, МІ вираховували в проміле (‰), кількість на 1000 клітин

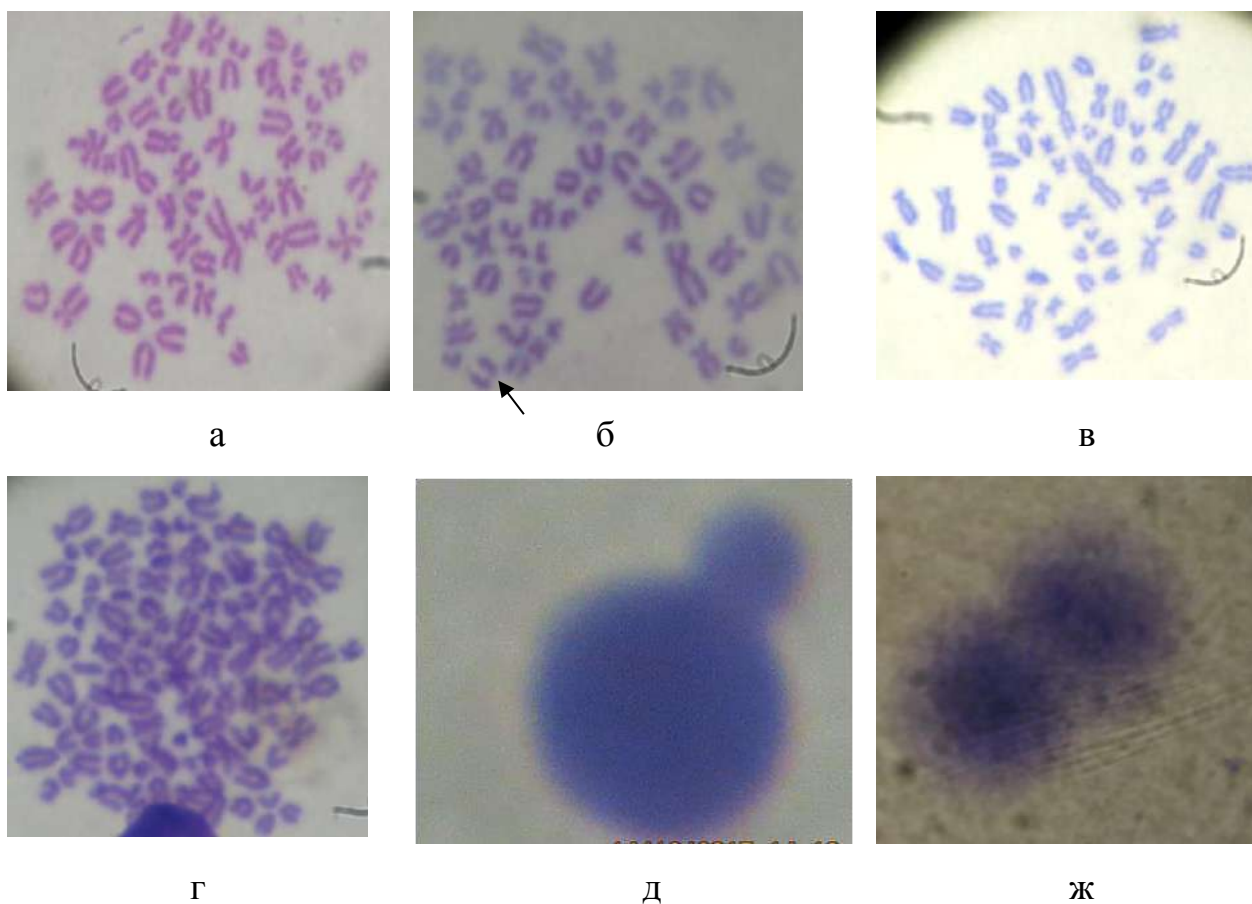


Рис. 4.7 Особливості каріотипу коней гуцульської породи

Примітка. 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, зб. $\times 1000$ разів

Результати цитогенетичного аналізу досліджуваних коней гуцульської породи показали, що для них характерні геномні та структурні порушення хромосом (таблиця 4.5).

Таблиця 4.5

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

Господарство	Анеуплоїдія	Поліплоїдія	АРЦРХ	Хромосомні розриви
Національний природний парк «Гуцульщина»	11,1±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	□
М ± m	10,82,10	1,4±0,93	3,9±1,77	0,7±0,59

Геномні порушення хромосом, анеуплоїдія, були виражені в основному гіпоплоїдними клітинами ($2n=54-62$), середня величина яких становила 10,8%, розмах значень цієї мінливості 8,8-11,1% у тварин господарства ТзОВ «Край неба» та Національного природного парку «Гуцульщина» відповідно. Проте, різниця середніх величин частоти анеуплоїдних метафаз у лімфоцитах крові коней двох господарств виявилася статистично недостовірною. За цією мінливістю, у досліджених тварин, спостерігався індивідуальний поліморфізм. Кореляційний зв'язок між віком та анеуплоїдією, у досліджуваних гуцульських коней, виявився слабким та недостовірним. Кількість поліплоїдних клітин у коней двох господарств знаходилася у межі 1,1%-2,0%, середнє значення якого становило – 1,4% і не перевищувало видові показники цієї мінливості [219].

Встановлено, що асинхронне розходження центромірних районів хромосом виникає у результаті передчасної реплікації прицентромірних гетерохроматинових ділянок, асоційованих з активністю центромери [6]. У гуцульських коней, яких досліджували, розмах цієї мінливості становив 2,0%

- 6,0%, при середньому значенні – 3,9%, що відповідає спонтанному рівню для коней в цілому (2,2%-9,1%)[181].

Структурні порушення хромосом (хромосомні розриви) у коней господарства ТзОВ «Край неба» не були виявлені, а у тварин Національного природного парку «Гуцульщина» відсоток метафазних пластинок із хромосомними розривами був невисокий і становив 1,1% (межа хромосомних розривів у коней за спонтанного мутагенезу становить 1,6% - 4,7% [181,198]. Це свідчить про стабільність каріотипу досліджуваних тварин.

Результати мікроядерного тесту (таблиця 4.6) показали, що частка лімфоцитів із мікроядром для тварин двох господарств була, практично, однаковою. Розмах цієї мінливості становив 4,0-4,2‰. (табл. 4.6)

Таблиця 4.6

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

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

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

Кількість двоядерних лімфоцитів (6,2‰) перевищувала показник мітотичного індексу (4,3‰). Проте, різниця середніх величин між частотою двоядерних лімфоцитів та рівнем поділу клітин – мітотичним індексом, виявилася недостовірною. Дослідженнями на інших видах тварин встановлено, що зі збільшенням рівня забрудненості, зокрема

радіонуклідами, підвищується розмах індивідуальної мінливості за МІ, частотою лімфоцитів із мікроядром і зменшується кількість двоядерних лімфоцитів [198]. Тому, з отриманих даних можна зробити висновок, що досліджувані тварини знаходилися в екологічно чистих умовах відносно рівня радіонуклідного забруднення і характеризувалися стабільністю каріотипу та зниженою чутливістю до мутагенних чинників різної природи.

Отже, за результатами цитогенетичного аналізу встановлено наявність геномних та структурних порушень хромосом у досліджуваних коней гуцульської породи

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

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

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

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

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

4.3 Історія походження потомків диких коней - тарпанів (коника польського) на території Передкарпаття

Відпрацювання ефективних методів збереження генофонду порід на сучасному етапі неможливе без вивчення, переосмислення та творчого використання історичного досвіду минулого. Усвідомлене розуміння важливості існуючого різноманіття генетичних ресурсів тварин є необхідною умовою накопичення знань і управління генетичними ресурсами.

Актуальною залишається проблема формування транскордонних природоохоронних територій, зокрема транскордонних біосферних резерватів ЮНЕСКО (ТБР), які є інструментом загального управління. Вони дістали офіційне визнання на міжнародному рівні як установи ООН, створені для співпраці в галузі збереження і сталого використання біорізноманіття завдяки загальному управлінню спільними екосистемами [224]. Україна межує з багатьма європейськими державами і має великі можливості для розширення співробітництва з ними щодо створення відповідної мережі транскордонних біосферних резерватів [10]. Так, першим резерватом нового типу в Україні, що забезпечує сталий розвиток регіону й охоплює окремі природоохоронні об'єкти у вигляді природних ядер для збереження біорізноманіття, а також розвитку транскордонної співпраці став міжнародний українсько-польський біосферний резерват ЮНЕСКО «Розточчя» (сертифікат ЮНЕСКО від 29.06.11) [225].

У Республіці Польщі науковці та природоохоронці розробили мапу Міжнародного транскордонного біосферного резервату «Розточчя», який діятиме під егідою ЮНЕСКО. Цю карту офіційно передано директорів природного заповідника «Розточчя», що в Яворівському районі Львівської області, Ярославіві Бовту. «Українська частина Міжнародного транскордонного біосферного резервату «Розточчя» включена ЮНЕСКО до світової мережі біосферних заповідників. Зокрема, 13 грудня 2011 року у Львові міністерству екології та природних ресурсів України було урочисто

вручено сертифікат ЮНЕСКО про надання статусу Міжнародного транскордонного біосферного резервату «Розточчя» (рис.4.8) [235].

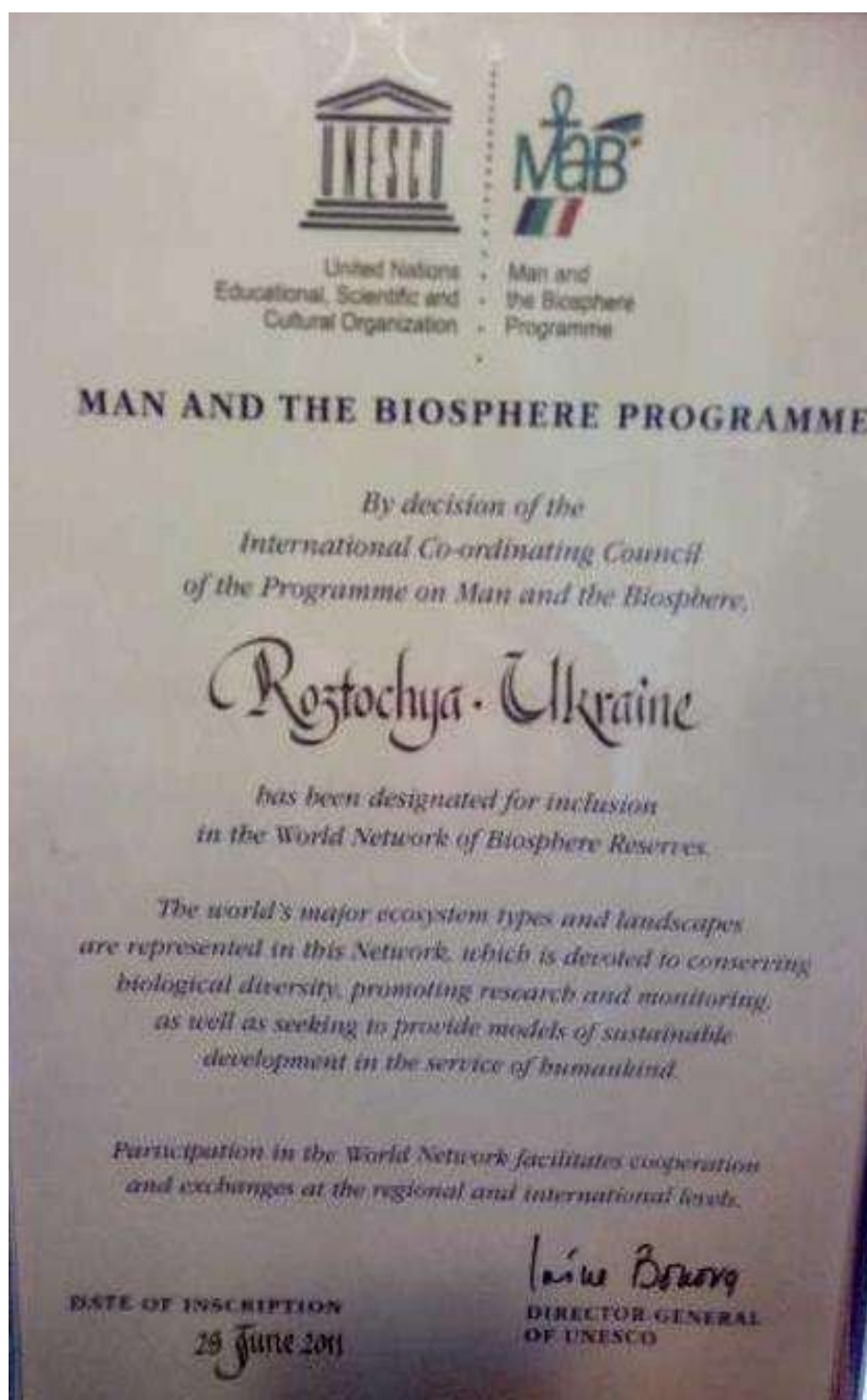


Рис. 4.8 Сертифікат ЮНЕСКО про надання статусу Міжнародного транскордонного біосферного резервату «Розточчя»

З ініціативи Міністерства екології та природних ресурсів України з питань створення нових і розширення існуючих центрів відновлення особливо цінних видів тварин, у Яворівському національному природному парку (частина Міжнародного біосферного резервату «Розточчя») успішно проживає вид коней, якому загрожує зникнення. У 2009 році, в рамках співпраці між природоохоронними установами, до Яворівського НПП із Розточанського національного парку (Республіка Польща) було завезено 4 особини тарпановидних коней. «Сьогодні розточанськими пагорбами тупоче табун із близько 10 особин. Цей приклад дає надію майбутнім поколінням побачити багатогранне біорізноманіття не лише на сторінках Червоної книги, але й у вільних просторах рідних теренів» (Інформація прес-служби Мінекології про засідання круглого столу у Яворівському національному природному парку) [235].

Для встановлення диких предків одомашнених порід коней на території Передкарпаття був проведений ретроспективний аналіз літературних даних філогенетичної систематики сучасних еквід (коника польського) та їх вимерлих предків.

На думку палеонтологів у четвертинному періоді (плейстоцені-голоцені) на території Передкарпаття і Волино-Поділля, як і на півдні Східної Європи, розвивалися коні двох філогенетичних гілок: великорослі коні видів *Eguus* (*Eguus*) *podolicus* nov. sp. (у середньому плейстоцені), *Eguus* (*Eguus*) *tyvericus* nov. sp., *E. (E.) eguus* *Pidoplitshko* (у пізньому плейстоцені - голоцені) та малорослі коні видів *E. (E.) vuniavensis* nov. sp. (у пізньому плейстоцені) та форми близькі до *E. (E.) gmelini* *Antonius* (у голоцені) [226]. Ареал *E. eguus* охоплював територію всієї України від Подесення до Прикарпаття та суміжну частину Польщі. Вид *E. (E.) gmelini* *Antonius* (або ж тарпан) появився не у голоцені, а значно раніше – коні з типовими для нього ознаками існували на Передкарпатті вже у пізньому плейстоцені і не були рідкісним елементом тогочасної фауни [227, 228]. Скелетні рештки еквід (черепи, нижні щелепи із зубами та розрізнені зуби) плейстоценового та голоценового

віку із понад 100 місцезнаходжень в українському (Львівська, Тернопільська, Івано-Франківська, Чернівецька області) та польському Передкарпатті, а також у Мізині (Чернігівська область) свідчать про це. Поява гібридних таксонів коней внаслідок випадкового схрещування траплялася на всіх етапах їхньої тривалої історії. Гібридні тварини, народжені від схрещення тарпанів із свійськими кінями, також народжують плідних потомків із успадкованими від обох предків деякими морфологічними ознаками, про що свідчить історія сучасного «коника польського» [229, 230]. Вчені-палеонтологи прийшли до висновку, що породи коней (*E.*) *saballus gmelini* var. *Polonika* або ж «коників польських» представляють собою нащадків степових тарпанів (*E.*) *saballus gmelini*) з домішками крові коней інших порід [231,232]. Подібну думку щодо гібридного походження “коника польського” висловив палеонтолог Е. Скорковський за результатами дослідження морфології корінних зубів, які мають найважливіше значення для ідентифікації, систематики та встановлення філогенії еквід. Більшість ознак у цих коней успадковано від великорослих порід, а розміри від малорослого. Матеріали з фондів Державного природничого музею НАН України дозволяють простежити поступову зміну морфології корінних зубів коней пізньоплейстоценового періоду і сучасного свійського коня, що вказує на можливість походження порід свійських коней від автохтонного дикого предка [237].

Процес формування свійського коня *Eguus saballus* L. відбувався одночасно із витісненням та зменшенням чисельності диких коней. Одомашнення коней почалося на межі Східної Європи і Центральної Азії приблизно 5-6 тисяч років назад. Давши початок домашнім коням, тарпан згодом з ними не схрещувався. Пояснюється це просто — дикі коні були харчовими конкурентами домашніх, тому там, де їхні шляхи перетиналися, люди безжально знищували тарпанів. Століття за століттям ареал диких коней скорочувався, а їх кормові угіддя діставалися худобі. В результаті такого витіснення дикий кінь вже до XVI сторіччя майже зник з лиця Землі.

Історичні дані про існування дикого коня того часу збереглися лише з однієї частини Європи - району «Великої пустині». «Велика пустиня» -це площа лісів і боліт без втручання людини, розміщена на території колишньої Східної Пруссії та частково сусідніх Польщі і Литви. Дикий кінь, скоріш за все, існував там з кінця 13-го до початку XVI століття (Mager 1960). Опис диких коней , проживаючих там, їх зовнішній вигляд (розмір тіла, колір шерсті), їх характер, ставлення людини до них (спроба приручення , створення і розміщення їх в звіринцях з метою врятування виду) можуть слугувати переконливими аргументами існування останньої популяції диких коней Центральної Європи.

В кінці XVI століття надходження інформації про існування дикого коня в дикій природі раптово припиняється. З того часу згадки про дикого коня були пов'язані з Яном Замоїським (впливовим польським графом) і його сім'єю. В кінці XVIII століття Ян Замоїський заснував великий і престижний звіринець і парк дикої природи недалеко від містечка Звезинець , в Польщі. Відомості і опис диких коней з цього зоопарку надійшли з кінця XVIII століття

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 – схожого на тарпана, сірого окрасу з темним ремнем на спині та темними ногами, який довгий час був традиційним робочим конем польських селян [233, 236].

Роботи по відтворенню унікального дикого коня ведуться і зараз. Відновленням породи займаються не тільки вчені Польщі, а й Башкирії, Німеччини. Під час експериментів зі схрещування жеребців коня Пржевальського з кобилами коника вдалося отримати тварину, яка за виглядом майже не відрізняється від справжнього тарпана. Шляхом ретельного відбору вчені добились того, щоб надати їй максимально тарпаноподібного вигляду: мишасту масть, чорну гриву, хвіст і ноги, від

гриви до основи хвоста по спині проходить чорний ремінь. Польські коники можуть змінювати відтінок масті в залежності від сезону: влітку вони темніші і коричневіші, а до зими світлішають. Така мінливість не характерна для домашніх коней, зате часто зустрічається в диких тварин, яким сезонний диморфізм допомагає залишатися непомітними на будь-якому тлі. Проте, є і фенотипові відмінності. По-перше, у польських коників грива не стояча, в той час як очевидці описували тарпанів, як коней зі стоячою, жорсткою і трохи кучерявою гривою. По-друге, характер польських коників дуже врівноважений, чого не скажеш про їх неприборканих диких предків. Нарешті, в окремих коней на ногах можуть бути білі відмітини, що також розглядається як незаперечна ознака прирученості [233].

Відновлений тарпан – це фактично своєрідна порода домашніх коней, яка призначена для того, щоб демонструвати її у зоопарках, як «живого нащадка» дикого коня. Але Всесвітній фонд дикої природи (WorldWideFundforNature, WWF) приступив до програми повернення польського коника у природу. Тому тарпановидні коні були завезені у Білоруську частину Біловезької пущі та на південний захід Латвії [234]. У 2009 році за згодою Мінприроди України та Міністерства охорони природи Польщі на територію Яворівського НПП з Розточанського парку народного завезено коней нащадків дикого коня-тарпана з метою збереження та відтворення генофонду нащадків диких коней, який необхідний для виведення нових продуктивних порід та для використання в рекреаційних, господарських та інших видах діяльності (рис.4.9).



Рис. 4.9 Коні породи коник польський

Польський коник – сильний, витривалий кінь. Він невибагливий і може цілий рік знаходитися на пасовищі без стайні. Відрізняється високою плодючістю, міцним здоров'ям і довголіттям. Коні слухняні, мають добрий характер, ними легко управляти. Рухи швидкі у всіх трьох алюрах, добре стрибає і скаче галопом. Проте, фенотиповий опис забезпечує грубу оцінку середніх значень по функційних варіантах генів, присутніх у даних індивідуумів або популяцій. До цих пір основна частина фенотипів більшості соматичного мутагенезу нез'ясована і, таким чином, з'ясування наявності факторів мутагенного впливу на організм, адаптацію організму до певних умов середовища є можливим при використанні показників цитогенетичної мінливості [235].

4.4 Особливості каріотипу потомків нащадків диких коней – тарпанів, які занесені до Червоної книги

Каріотиповий аналіз здійснювали у 10 голів коней нащадків диких коней - тарпанів (коника польського), яких утримують в урочищі «Мочарі» Яворівського національного природного парку на Львівщині. Усі тварини

перебували в умовах напіввільного утримання (резерваті), що відповідали нормам годівлі та зоогігієнічним і ветеринарно-санітарним вимогам.

Аналіз каріотипової мінливості коней породи коник польський показав, що норма каріотипу соматичних клітин становить $2n=64$ хромосоми. За одержаними результатами цитогенетичного аналізу коней встановлено, що для них характерні кількісні порушення хромосом, зокрема анеуплоїдія. Геномні мутації, які пов'язані з порушенням кількості хромосом у досліджуваних тварин – анеуплоїдією, в основному були гіпоплоїдні, тобто зі зменшеною кількістю хромосом ($2n=57-60$ хромосом) (Табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Аналіз каріотипу коней породи коник польський за спонтанного
мутагенезу

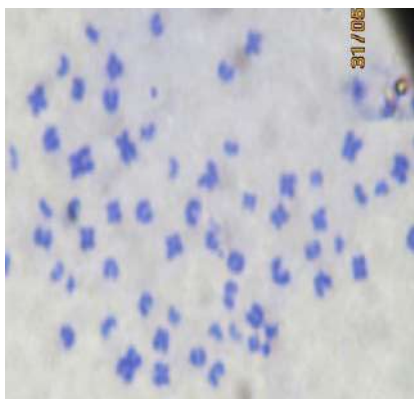
Цитогенетичні показники	Анеуплоїя, %	Асинхронне розходження центромірних районів хромосом, %	Лімфоцити із мікроядром ‰	Двоядерний лімфоцит, ‰	Мітотичний індекс, ‰
$M \pm m$	$9,3 \pm 3,3$	$0,2 \pm 0,03$	$1,2 \pm 0,29$	$1,3 \pm 0,53$	$2,6 \pm 0,73$

Частка клітин із анеуплоїдією у 1,5 разів вище відносно рівня спонтанної цитогенетичної мінливості (1,5-6,8 %) соматичних клітин у розрізі їх видової належності [189, 238]. На нашу думку, причина появи такої аномалії є те, що коні породи коник польський є складними помісями, при створенні яких використовували багато порід. Такі чинники селекційного процесу можуть призводити до підвищеного рівня кількісних порушень хромосом [238].

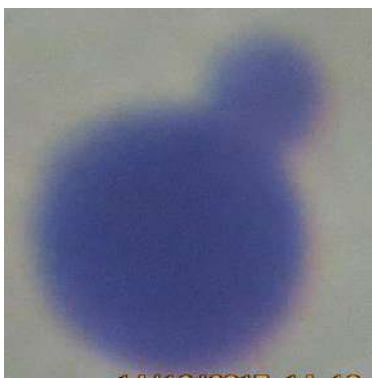
Кратне збільшення хромосом (поліплоїдія) у каріотипі цих тварин не спостерігалось). Структурні порушення хромосом (хромосомні та хроматидні розриви) виявлені не були. Відсутність хромосомних аберацій свідчить про стабільність каріотипу досліджуваних тварин. Адже, особливе місце в інфекційному та іншому мутагенезі, за даними Н.Н. Іл'їнських та ін. [183]

займають розриви хромосом. Вчені встановили, що відновлення цитогенетичної норми (елімінація пошкоджень хромосом) залежить від активності імунної системи, особливо Т-лімфоцитів. Отже, на нашу думку, коні породи коник польський мають стійку імунну систему.

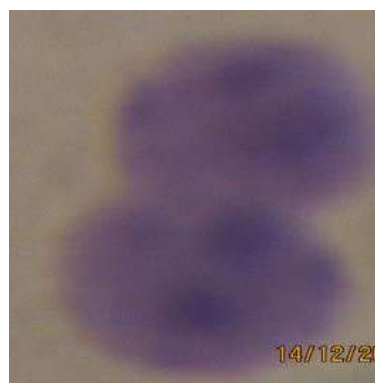
Для повнішої оцінки соматичного мутагенезу досліджуваних коней провели мікроядерний тест, за яким встановили, що частка лімфоцитів із мікроядром (МЯ) становила – 1,53%, двоядерні лімфоцити (ДЯ) зустрічалися з частотою 1,13% та мітотичний індекс (МІ) дорівнював 2,23% відповідно. Отже, цитогенетичні параметри соматичних клітин знаходилися в межах спонтанного мутагенезу і не перевищували видові особливості, характерні для цього виду [189] (рис.4.10).



Норма каріотипу, $2n=64$



Лімфоцит із мікроядром



Анеуплоїдія, $2n=56$

Двоядерний лімфоцит

Рис. 4.10 Метафазні пластинки каріотипу коней породи коник польський, зб.×1000 разів

З отриманих результатів робим висновок, що у досліджених коней породи коник польський виявлено підвищення рівня кількісних порушень хромосом (анеуплоїдії), порівняно з рівнем спонтанної хромосомної мінливості. Причиною виникнення цієї мінливості можуть бути породотворчі процеси. Відсутність хромосомних аберацій (хромосомні та хроматидні розриви) свідчить про стабільність каріотипу досліджуваних тварин і вказує на наявність унікального генетично-детермінованого механізму високої репарації та адаптивної стійкості до несприятливих факторів навколишнього середовища.

Для встановлення впливу факторів різної природи на формування генетичної структури порівняльної оцінки стабільності каріотипу популяції аборигенної гуцульської породи коней та малочисельної популяції коней породи коник польський був здійснений ретроспективний аналіз цитогенетичних досліджень комерційної породи коней (російської рисистої), яку утримували на Київському державному іподромі (табл. 4.8)

Таблиця 4.8

Порівняльний аналіз мінливості каріотипу популяцій комерційної породи коней та досліджуваних коней аборигенної гуцульської і коник польський порід, %

Порода	А	ПП	АРЦРХ	Хм. р.	Хр. р.	МЯ ‰	ДЯ ‰	МІ ‰
Російська рисиста	0,6±0,12	—	0,2±0,05	0,9±0,20	0,3±0,06	2,1±0,84	4,7±0,45	1,7±0,30
Гуцульська	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	9,3±3,31	—	0,2±0,03	—	—	1,2±0,29	2,6±0,53	1,3±0,73

За результати цитогенетичного аналізу 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 російської рисистої породи ця мінливість становила 0,6 %. Поліплоїдні клітини було знайдено у крові тварин гуцульської породи з величиною 1,4 %, а у представників порід російська рисиста, коник польський поліплоїдію не виявлено. 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, а найнижча частка цитогенетичних параметрів клітин крові спостерігалася у коней породи коник польський. Для встановлення впливу факторів різної природи на формування генетичної структури коней нами був проведений однофакторний дисперсійний аналіз (табл. 4.9).

Таблиця 4.9

Сила впливу (η^2_x) породи та умов утримання на мінливість каріотипу коней порід, яких досліджували

Цитогенетичні показники	Число градацій	Порода, умови утримання	
		η^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 та умов утримання тварин 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.

Висновки до розділу 4

1. Дані ретроспективного аналізу архівних та літературних матеріалів свідчать про те, що збереження та розвиток породи гуцульських коней в ХІХ – ХХ ст. відбувалося на українських землях.

2. Відсутність хромосомних аберацій (хромосомні та хроматидні розриви) свідчить про стабільність каріотипу коней породи коник польський.

3. Результати цитогенетичного аналізу коней гуцульської породи свідчать про те, що кількісні та структурні порушення хромосом у досліджуваних тварин не перевищують спонтанного рівня хромосомної мінливості, характерного для виду *Equus caballus*.

4. Каріотипова мінливість коней великою мірою залежить від генотипових та паратипових факторів.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях :

1. 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).

2. 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).

3. 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 у зборі архівних матеріалів та даних по збереженню гуцульських коней у наш час).

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

5. 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. 2021. С. 62-64.

РОЗДІЛ 5

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

Питання, пов'язані з розумінням механізмів еволюції, динаміки дивергенції видів ссавців (як диких так і domestikованих) у часі, процеси породоутворення дотепер залишаються відкритими. Дослідження філогенезу того чи іншого виду тварин, насамперед, опирається на палеонтологічні дані, які на конкретному матеріалі дозволяють документально відновити хід історії тієї чи іншої групи організмів. Так, надана і обговорена інформація з палеонтологами Журавльовим Олегом Петровичем (Київський Інститут археології НАНУ) та Дригантом Данилом Михайловичем (Львівський історичний музей) і одержані зразки археозоологічних решток кісток для досліджень, знайдених у результаті палеонтологічних експедицій провідними палеонтологами нашої країни Київського національного науково-природничого музею НАН України, відділом палеонтології та Львівського історичного музею дали змогу одержати нову аналітичну та молекулярно-генетичну інформацію щодо еволюції коня, зокрема, і залишків аборигенних порід, на теренах сучасної України.

5.1 Ретроспективний аналіз літературних даних щодо поширення плейстоцен-голоценових коней на території України

Європейський дикий кінь – це не вид, чітко визначений палеонтологами. Його систематика до цього часу залишається заплутаною і дуже суперечливою, внаслідок нестачі osteo–антропологічного та археологічного матеріалу.

На думку палеонтологів О.Ф. Чернової та Н.Н. Спаскої існує дві гіпотези розвитку роду *Eguus*. Одна гіпотеза стверджує про те, що розвиток роду *Eguus* бере свій початок з Північної Америки біля 4 млн. років назад. Перший представник роду – *E. simplicidens* – кінь Гегермана або

американська зебра. Це один з найстаріших коней роду *Eguus* [189]. Представники роду конячих на території Євразії з'явилися 2,5 млн. років назад і були потомками *E. Simplicidens*. На думку вчених, в подальшому, еволюція роду проходила паралельно в Північній Америці та Євразії. Древні коні Старого світу належали групі *E. stenonis* – зебра Стенона, що населяла Євразію в плейстоцені і швидко розповсюдилася від Китаю до Західної Європи, що дало початок географічним і стратиграфічним підвидам.

Інше твердження про еволюцію еквід у Євразію, якого дотримувалися палеонтологи, полягало в існуванні міграційних хвиль тварин із Північної Америки. Найбільше поширення давні коні зазнали в плейстоцені. Для Євразії описано 15 видів плейстоценових коней і більше 50 видів в Північній і Південній Америці [266-269].

На межі плейстоцена і голоцена різноманітність коней різко зменшилась. За даними Кіладзе А.Б., Ібраєва М.В. до історичного часу дожило, скоріш за все, три види диких коней: на Європейській території – тарпан (*Eguus. C. gmelini* до XIX ст.), в степовій азіатській частині – кінь Пржевальського (*E. Przewalskii*), в природі існував до 1960-70 –х років і в північно-східній частині Сибіру – ленський кінь *E. Lenensis* (до кінця XVIII ст.). В обох Америках коні вимирають в кінці плейстоцену – початку голоцена і з'являються там знову тільки з приходом європейців [189].

Регіон одомашнення коней за даними дослідників на цей час залишається точно не встановленим. Палеонтологи вважають, що сучасні аборигенні коні з різних територій можуть походити від різних видів древніх коней: якутський кінь – від ленського коня *E. Lenensis*, європейські ваговозні породи - від *E. Germanicus*, арабська порода – від тарпанів. Думку про походження свійських коней від коня Пржевальського вчені відкидають на основі морфологічних та генетичних даних [244]. Частково поліфілетичну гіпотезу походження свійського коня підтверджують і молекулярно – генетичні дослідження: сучасні породи коней різняться між собою за білками і ферментами крові так і за мітохондріальною ДНК.

Порівнюючи коней з археологічними стоянками, палеонтологи не можуть впевнено зробити висновок, оскільки в музеях знаходиться один скелет тарпана і один череп помісного коня тарпана з свійськими кінями. Знахідки великорослих коней з північного Казахстану, Ботая, наводять на думку, що їхнім предком міг бути широкопалий плейстоценовий кінь, який за своїми розмірами більший від тарпана [189].

Рештки пізньоплейстоценових коней з теренів України описані лише із східних (Подесення, Подніпров'я, Слобожанщина) та південних (Причорномор'я) районів, проте відносно їхньої видової розбіжності думки різних дослідників є розбіжними. Згадки про знахідки решток викопних коней на території України були описані і зображені за матеріалами з палеонтологічної стоянки у Новгород–Сіверському І.Г. Підоплічком [245]. Для коней палеоліту І.Г. Підоплічко запропонував нову видову назву *Eguus eguius* (або кінь первісний) [246, 263, 264]. Інформацію про знахідки решток коней подав у своїй монографії К.А. Татаринов [247]. У плейстоцені та голоцені він розрізняв два види коней – *Eguus eguius* Підоплішко (первісний або дикий кінь) та (*E.*) *caballs* L.(свійський кінь). Палеонтолог В. І. Громова опублікувала результати дослідження історії роду *Eguus* у Євразії і при описі пізньоплейстоценових видів із Східної Європи були використані матеріали з України (з палеонтологічних стоянок у Мізині, Новгороді-Сіверському, Старому Кодаку і Шолоховому. В.І. Громова описала згаданий вид коней як «широкопалих» (*E.*) *caballs latipes* (Громова) [265]. .

Наукові доробки І. Є. Кузьміної вказують на те, що у пізньому плейстоцені «широкопалий кінь», крім Дону, заселяв також Подесення (Мізин, Новгород-Сіверський, Чулатів), Подніпров'я (Старий Кодак, Межиріч, Канів, Табурище), Крим (Кіік–Коба, Кош–Коба) та Північний Кавказ [248]. За даними І.Є. Кузьміної широкопалий кінь зникає в кінці пізнього плейстоцену.

Останнім диким конем, що дожив на Україні до кінця XIX ст. на думку В. І. Громової, Н.Г. Белан, В.І. Бібікової був тарпан. Більшість археозоологів

вважають тарпана найбільш можливим предком домашнього коня. Проте, це твердження дотепер 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 думки дотримувався В. І. Цалкін та український палеонтолог О. П. Журавльов. [250].

Вивчаючи матеріал по конях з енеолітичного поселення Деріївки (друга половина IV тис. до н. ери), В.І. Бібікова встановила, що це рештки кісток самого давнього свійського кіня. Деріївський кінь і дотепер знаходиться під пристальною увагою науковців із різних країн. Визначення абсолютного віку кісткових залишків деріївського коня становить 6 тис. р. до н. е. [251].

Завдяки роботі археозоологів, зокрема, Топачевського (1979) був накреслений південно-євразійський центр domestикації коня. Проте, підтвердити чи заперечити це твердження на сьогодні неможливо. Структурна стійкість цих тварин пояснює проблеми, з якими палеонтологи зіштовхнулися при спробі розробити еволюційну історію коня. Відсутність діагностичних, анатомічних і біометричних критеріїв не дає можливість визначити археозоологічні рештки коня. [252]. Отже, уточнення систематики видового складу *Egidae*, які населяли Україну в минулі геологічні епохи, встановлення філогенетичних зв'язків між ними є досить актуальним на цей час. Але, для розв'язання цього питання окрім палеонтологічних та археологічних досліджень необхідне використання наукових засобів інших наук, таких як палеоекологія та досліджень з молекулярно – генетичного аналізу геному представників роду *Eguus*.

Узагальнений аналіз ретроспективних даних поширення плейстоцен-голоценових коней на території України показаний в таблиці 5.1. та рис. 5.1.

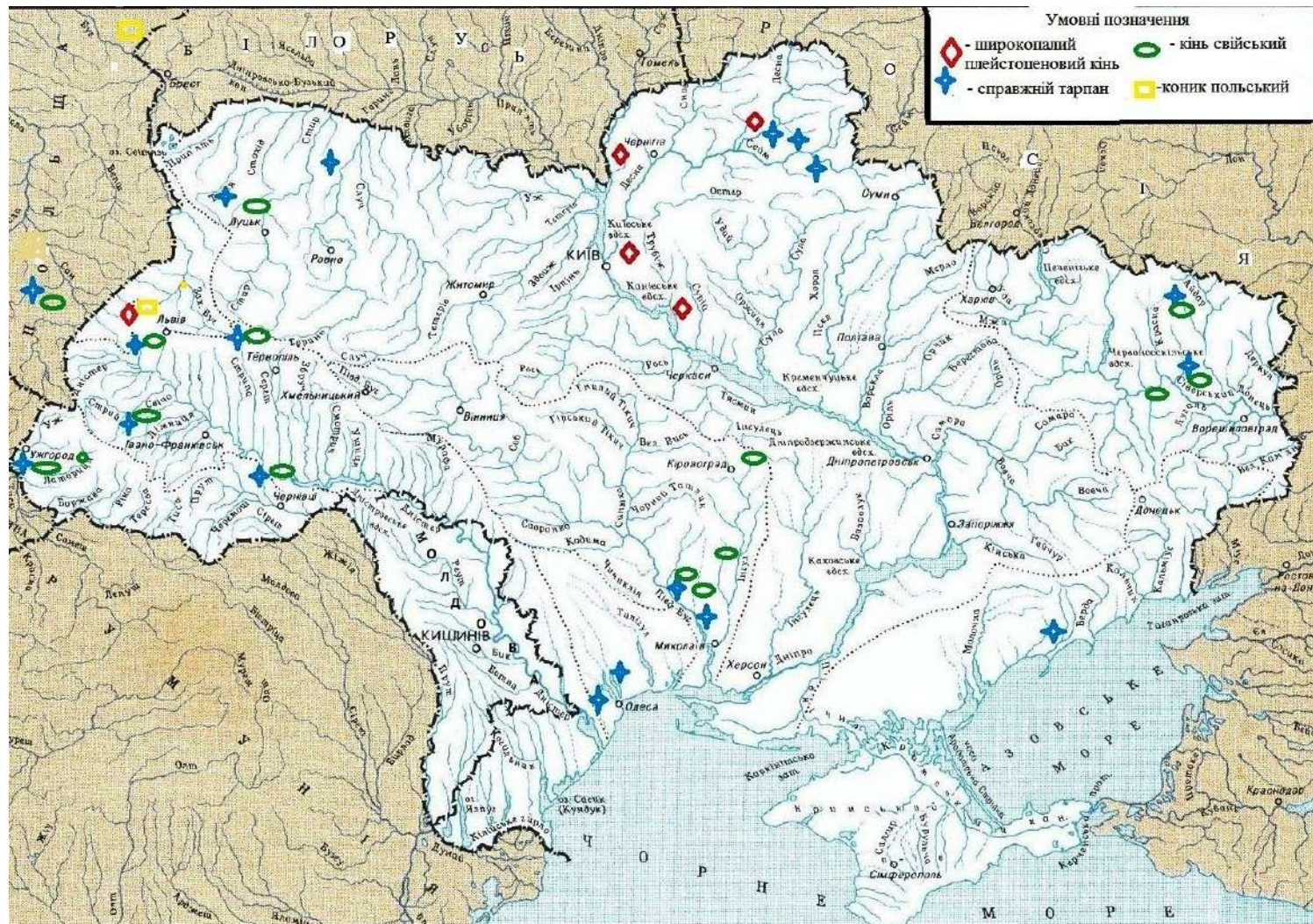


Рис. 5.1 Карта поширення плейстоцен-голоценових коней на території України

Таблиця 5.1

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); [265. 270] Справжній тарпан (Eguus gmelini Antonius,1912) Дригант 2006. [245]
Пізній плейстоцен	Подесення, Подніпров`я, Мізин	Широкопалий кінь (Eguus cabalus latipes, Громова,1949) [226, 229, 270, 271].
Ранній голоцен, пізній мезоліт 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) [229, 253, 272].
Ранній неоліт 6-4 тис.р.до н.е.	С.Погорілівка (Подесення)	Справжній тарпан Eguus gmelini Antonius (Громова, 1949) [, 273].
Кінець 5- середина 4 тис.до н.е.	Погорілівка-Вирчище (с.Погорілівка,Кролевецький р-; с. Лизогубівка, Конотопський р-н, Сумська обл., річка Єсмань	Кінь – вид невизначений (Бібікова 1972 р.)[229, 253, 254, 256, 257, 272, 274] Ймовірно дикий кінь (Даниленко) [255, 275, 276,]
Друга половина 4 тис.до н. е.	Деріївка, Кіровоградська обл.	Кінь свійський Eguus cabalus (Телігін. 1960, Бібікова, 1969) [258,259]

4200-3800 р. до н.е.	Гірка Полонка, Гнідава Луцький р-н, Волинська обл.	Кінь свійський Eguus caballus (Журавльов 1996) [257]
Кінець III-II тис.до н.е.	Ново-Розанівка 2 р.Інгул, Миколаївська обл.	Кінь свійський Eguus caballus (Шапошникова, Неприна, 1968, Бібікова 1972) [254]
Голоцен	Тернопільська, Волинська, Івано-Франківська, Львівська, Чернівецька, Закарпатська, Підкарпатське воєводство (Польща)	Справжній тарпан Eguus gmelini Antonius Кінь свійський Eguus caballus (Дригант 2016) [260]
Голоцен	Бережниця, Рівненська обл.	Коні, з характерними ознаками свійського та тарпановидних коней із сучасним «коником польським» (Скорковський Е., Дригант 2016) [260]
XIII-XVI ст.	Район «Великої пустині» - східна Прусія, частково Польща, Литва	Справжній тарпан Eguus gmelini Antonius; (Магер 1960) [261, 275]
XVIIIст.-XIX ст.	М.Звежинець (Польща), парк дикої природи, фермери (Польща)	Справжній тарпан Eguus gmelini Antonius; Коник польський (Граф Ян Замойський)
1925 р.	Резерват у Біловезькій пущі (польська Puszeza Biaowieska)	Відновлення первісного типу дикого коня Офіційне визнання породи «Коник польський»(професор Тадеуш Ветулані) [262]
1995 р.-2009 р.	Розточанський парк народовий (Польща) Яворівський національний природний парк (Україна)	Резерват коника польського

5.2 Генетичний поліморфізм популяцій коней за ISSR-маркерами

Аналіз послідовностей ДНК (мікросателітних локусів і ділянок фланкованих інвертованими повторами мікросателітів) у різних видів ссавців, викликають особливий інтерес, оскільки, вивчення даного питання, можливо, дозволить підійти до розуміння механізмів еволюції, динаміки дивергенції видів у часі як у диких, так і доместикованих видів в тому числі і процесів пороодоутворення. Мікросателіти або прості тандемні повтори, це послідовності ДНК, що складаються з багато разів повторених олігонуклеотидів довжиною в 2, 3, 4 нуклеотиду. Вони розподілені по геному в великій кількості і характеризуються високим рівнем поліморфізму по довжині повторів [281]. Численні дослідження в даній області вказують на їх не випадковий розподіл, однак їх функціональне значення, генетичні та еволюційні механізми формування до сих пір залишаються нез'ясованими. [282]. Передбачається, що відмінності за присутністю мікросателітів в ділянках ДНК пов'язані зі специфікою відбору, спрямованого проти змін, що призводять до зсуву рамки зчитування і порушення структури кодуючих ділянок [283, 284, 285]. У ряді досліджень показано залучення мікросателітних локусів в формування адаптивних мутацій в процесах видоутворення [286-289]. Відмінності в швидкостях мутацій за різними мікросателітними локусами виявлені в залежності від виду, нуклеотидного мотиву повтору [270, 271]. Передбачається, що частина мікросателітів може приймати участь у формуванні просторової конфігурації ділянок ДНК і впливати на процеси транскрипції, трансляції, рекомбінації ДНК і відбір може перешкоджати накопиченню повторів збільшеного розміру

Очевидно, що одним з джерел інформації про можливі функції мультилокусних ділянок може бути оцінка їх консервативності і розподілу в геномах різних видів та порід.

Одним з методів дослідження генетичного поліморфізму є метод ISSR-PCR, який дає змогу аналізувати варіабельність міжмікросателітних фрагментів ДНК, які знаходяться між двома інвертованими повторами

геному. Сукупність ISSR-маркерів результативно використовують для рішення завдань з оцінки внутрішньовидової і міжвидової генетичної варіабельності, проведення генетичного моніторингу в популяціях з метою збереження алелофонду небагаточисельних порід [266]. Для різних видів тварин, породи яких зберігають, рекомендовано проводити визначення параметрів генетично-популяційної структури, а також здійснювати оцінку ступеня внутрішньопородної диференціації. За результатами міжнародної практики, саме підтвердження унікальності і консолідованості тієї чи іншої породи є основою для включення її в національні програми із збереження біоресурсів. Все вище наведене стосується самих різних галузей тваринництва та у повному обсязі має безпосереднє відношення до конярства [305].

У рамках дисертаційної роботи нами були проведені дослідження загальних генетико-популяційних параметрів дослідних груп коней різних порід. 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.

Для розуміння процесів доместикації коня, окрім археологічних і палеоонтологічних методів дослідження, необхідністю стає використання засобів з інших галузей біологічних наук – з боку молекулярної біології в цілому та ДНК-технологій зокрема (молекулярно-генетичний аналіз зразків ДНК)[291-295]. Використання ISSR-маркерів є одним із ефективних та широко використовуваних варіантів тест-систем для рішення завдань визначення генетичного поліморфізму, що дає змогу на основі аналізу

ампліфікованих фрагментів ДНК визначати відповідні філогенетичні зв'язки у досліджених групах тварин.

В лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН за останні декілька років проведено низку досліджень у галузі палеогенетики, а саме – вивчення молекулярно-генетичної складової у викопних рештках древніх представників роду *Equus* за допомогою ISSR-маркерів. Визначним моментом в підборі методики дослідження було те, що аналіз міжмікросателітного поліморфізму є зручним та надійним інструментом дослідження міжвидової і внутрішньовидової генетичної мінливості дослідних популяцій тварин. Одним із основних завдань дисертаційних досліджень є визначення видо- та породоспецифічних ампліфікованих фрагментів ДНК, отриманих при ISSR-аналізі, що й забезпечило широке застосування цього методу при вивченні генетико-популяційних особливостей різних порід та породних груп коней [296-300].

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.

5.2.1. Поліморфізм фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими ди- і три нуклеотидними тандемними повторами, в геномі коней гуцульської породи

З метою моніторингу алелофонду аборигенних малочисельних порід досліджено внутрішньовидову генетичну варіабельність гуцульських коней методом ISSR-PCR маркування (табл.5.2, Рис. 5.2).

Таблиця 5.2

Аналіз поліморфізму фрагментів ДНК за ISSR-маркерами у коней
гуцульської породи (n=30)

П.н.	(GA) ₉ C	(AG) ₉ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ CG	(GA) ₆ CC	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(CTC) ₆ C
1700 1750					П			П
1500 1550					П			
1350 1400								К
1000 1050		П	П		П	П		
880- 930	П							
820- 870	П		П	К	П		П	П
760- 810		П					П	
680- 710			П	К	К	К		П
640 670	П							
600- 630	П				К	П	К	
530- 550			П			П		
500- 520	К	П	К	К	К		П	
470- 490	П						П	
380- 400	К	К	К	К	К	П	К	
340- 350				К				
360 370							К	
320- 330		К					П	
300- 310			К	К				
280- 290							П	
260- 270	П		П					
Локуси	8	5	9	6	8	5	9	4

Примітка. П – поліморфні локуси; К – консервативні локуси;

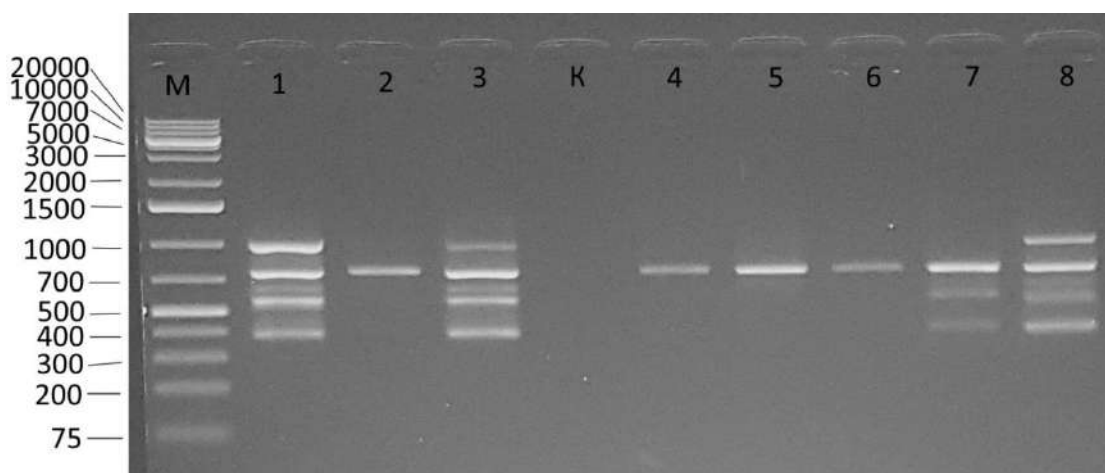


Рис. 5.2 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК гуцульської породи коней за праймером (ACC)₆G. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-8 продукти ампліфікації ДНК коней гуцульської породи; К- контроль.

За результатами проведеного аналізу з'ясовано, що в спектрі продуктів ампліфікації із використання в якості праймера послідовності (GA)₉C виявлено 8 фрагментів. Межі довжин виявлених локусів становили 280-930 пн. Найбільш консервативними фрагментами цього спектру були амплікони з довжинами 380-400 пн та 500-520 пн. Найбільш поліморфними виявилися ділянки розміром 280-290, 600-630, 640-670 та 880-930 пн, частка поліморфізму яких дорівнювала 78 % та ділянка 470-490 пн з часткою поліморфізму 67 %. Найменшим рівнем поліморфізму (11%) є характерним для амплікону довжиною 820-870 пн. Розрахунок індексу поліморфного інформаційного змісту (PIC) показав, що локуси з довжинами 280-290, 470-490, 600-630, 640-670 та 880-930 пн. є помірно інформативними, оскільки значення PIC дорівнює 0,50; а локус 820-870 пн – є низько інформативними (PIC=0,12).

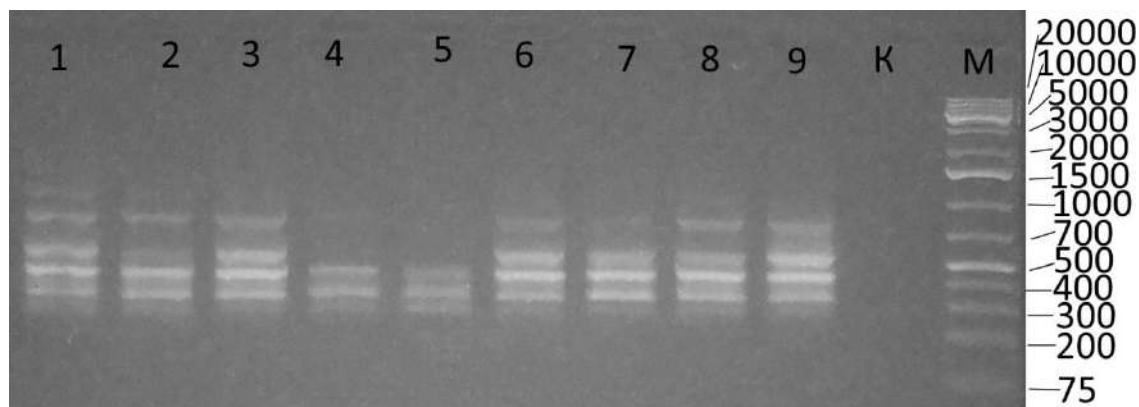


Рис.5.3 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК гуцульської породи коней за праймером $(AG)_9C$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-9 продукти ампліфікації ДНК коней гуцульської породи.

В спектрах ампліконів праймера $(AG)_9C$ виявилося 5 фрагментів ДНК, (Рис.5.4) межі яких становили 320-1050 пн. Амплікони довжиною 320-330 та 380-400 пн. були найбільш консервативними, а поліморфними виявилися ділянки в 500-520, 760-810 та 1000-1050 пн, частка поліморфізму яких становила 77 %. Розрахунок індексу поліморфного інформаційного змісту показав, що значення PIS дорівнює 0,50, отже, ці локуси – є помірно інформативними.

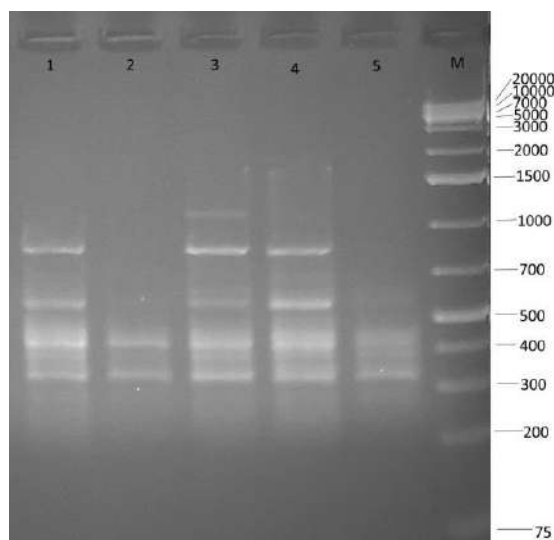


Рис. 5.4 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК гуцульської породи коней за праймером $(AG)_8CA$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1–5 продукти ампліфікації ДНК.

При використанні в якості праймера послідовності $(AG)_8CA$ (Рис. 5.4) виявлено 9 фрагментів ДНК. Консервативними виявилися 3 фрагменти – 300–310, 380–400 та 500–520 пн. Всі інші фрагменти цього праймера – помірнополіморфні. Для амплікону розміром 680–710 п. н. частка поліморфізму (P) становила 50%, в той час як значення PIC дорівнювало 0,41. Амплікони розміром 820–870, 1000–1050 та 1180–1230 пн з $P=33\%$, та індексом поліморфного інформаційного змісту (PIC) 0,31 та амплікони розміром 260–270 та 530–550 пн з $P=17\%$ та $PIC=0,48$ відносилися до помірноінформативних локусів.

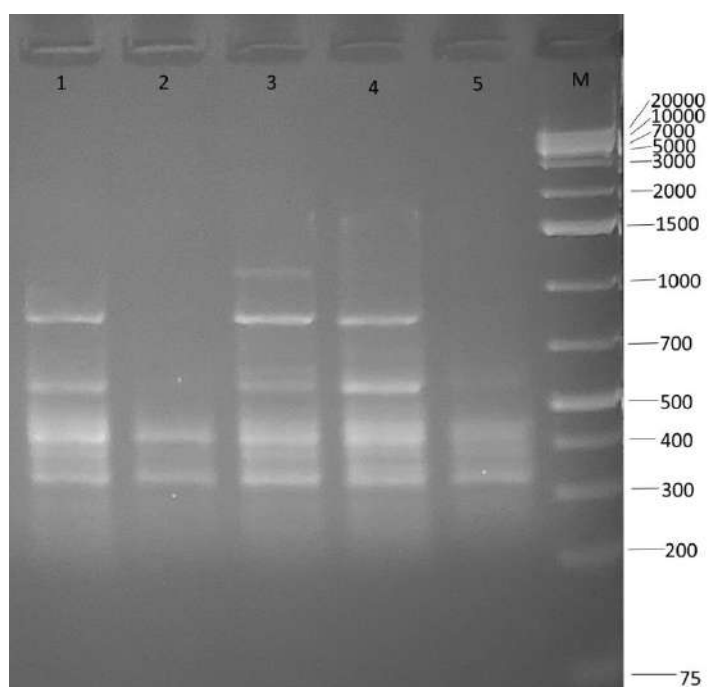


Рис. 5.5 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК гуцульської породи коней за праймером $(AG)_8CG$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-5 продукти ампліфікації ДНК.

В спектрі продуктів ампліфікації праймера $(AG)_8CG$ (Рис. 5.6), було виявлено 6 локусів, всі з яких були консервативні. Межі довжин їх становили: 300–310 пн, 340–350 пн, 380–400 пн, 500–520 пн, 680–710 пн, 820–870 пн.

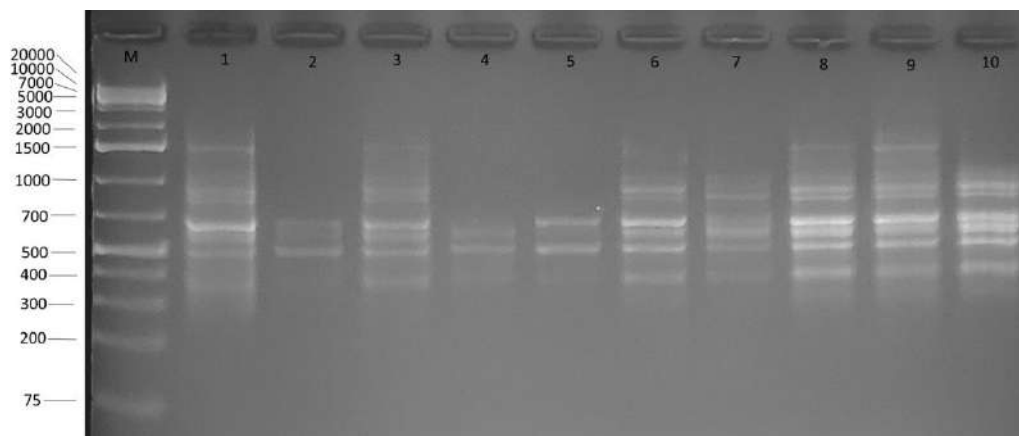


Рис. 5.6 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК гуцульської породи коней за праймером $(GA)_6CC$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-5 продукти ампліфікації ДНК.

За праймером $(GA)_6CC$ виявлено 8 відтворюваних локусів, межі яких становили 380-1750 пн. За цим праймером консервативними є фрагменти ДНК довжиною в 380-400, 500-520, 600-630 та 680-710 пн. Найбільший рівень поліморфізму спектрів цього праймера виявлено в ампліконів розміром 820-870 та 1000-1050 пн при $P=70\%$ та $PI=0,49$. Це помірноінформативні локуси. Амплікони розміром 1500-1550 пн з часткою поліморфізму $P=50\%$ та $PI=0,45$ також відносилися до помірноінформативних. Фрагмент довжиною 1700-1750 пн, при $P=20\%$ та $PI=0,20$ є низько інформативним.

За допомогою праймера $(ACC)_6G$ (Рис. 5.2) виділилось 5 фрагментів ДНК, межі довжин яких становили 380-1050 пн. Фрагмент розміром 680-710 пн виявився консервативним. Поліморфними фрагментами ДНК цього праймера були ділянки розміром 380 -400 пн, 530-550 пн при $P=50\%$ та $PI=0,41$. Ці амплікони відносяться до помірно поліморфних. Також помірно поліморфними були фрагменти розміром 600-630 пн, 1000-1050 пн ($P=38\%$, $PI=0,33$).

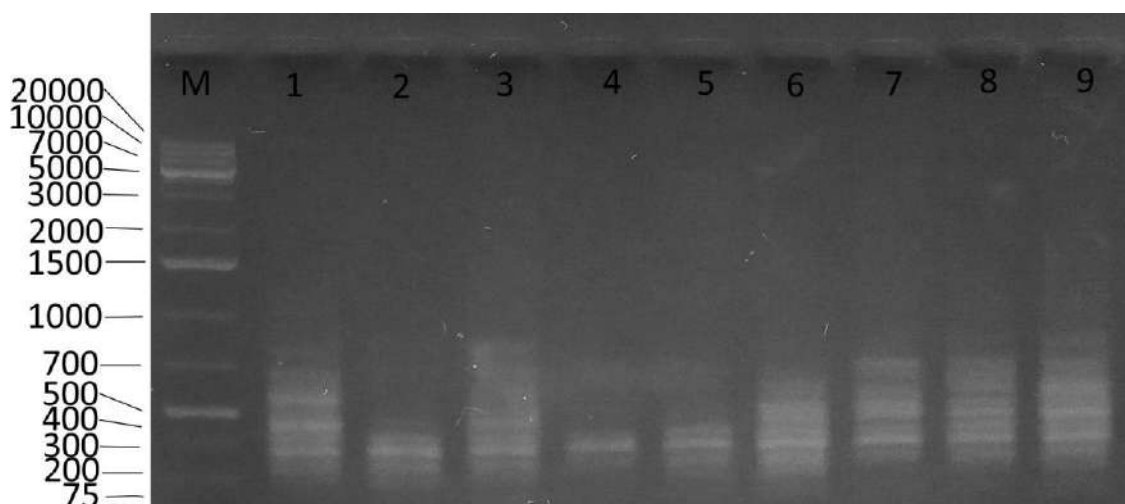


Рис. 5.6 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК гуцульської породи коней за праймером $(GAG)_6C$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-9 продукти ампліфікації ДНК.

Із застосування праймера $(GAG)_6C$ виявлено 9 локусів з межами довжин 280–870 пн. Найбільш консервативними ампліконами виявилися 3 фрагменти спектра з довжинами 360-370, 380-400 та 600-630 пн. Найвищий поліморфізм спектрів цього праймера виявлено у ділянках 470-490 пн при $P=88\%$ та $PI=0,60$. Ці локуси є високоінформативними. Фрагменти ДНК, розміром 760-810 пн при $P=77\%$ та $PI=0,50$ та амплікони розміром у 280-290, 320-330 та 500-520 пн з $P=66\%$ та $PI=0,49$, а також фрагменти 820-870 п. н. з $P=55\%$ та $PI=0,45$ відносяться до помірноінформативних.

При використанні праймера $(CTC)_6C$ (Рис.5.7) ампліфіковано 4 фрагменти довжиною від 680 до 1750 пн. Консервативними ампліконами виявилися фрагменти довжиною 1350-1400 пн. Поліморфними фрагментами цього праймера були ділянки ДНК розміром 680-710 ($P=40\%$ та $PI=0,35$), 820-870 ($P=20\%$ та $PI=0,49$) та 1700-1750 п. н. ($P=40\%$ та $PI=0,35$). Всі ці локуси є помірно інформативними.

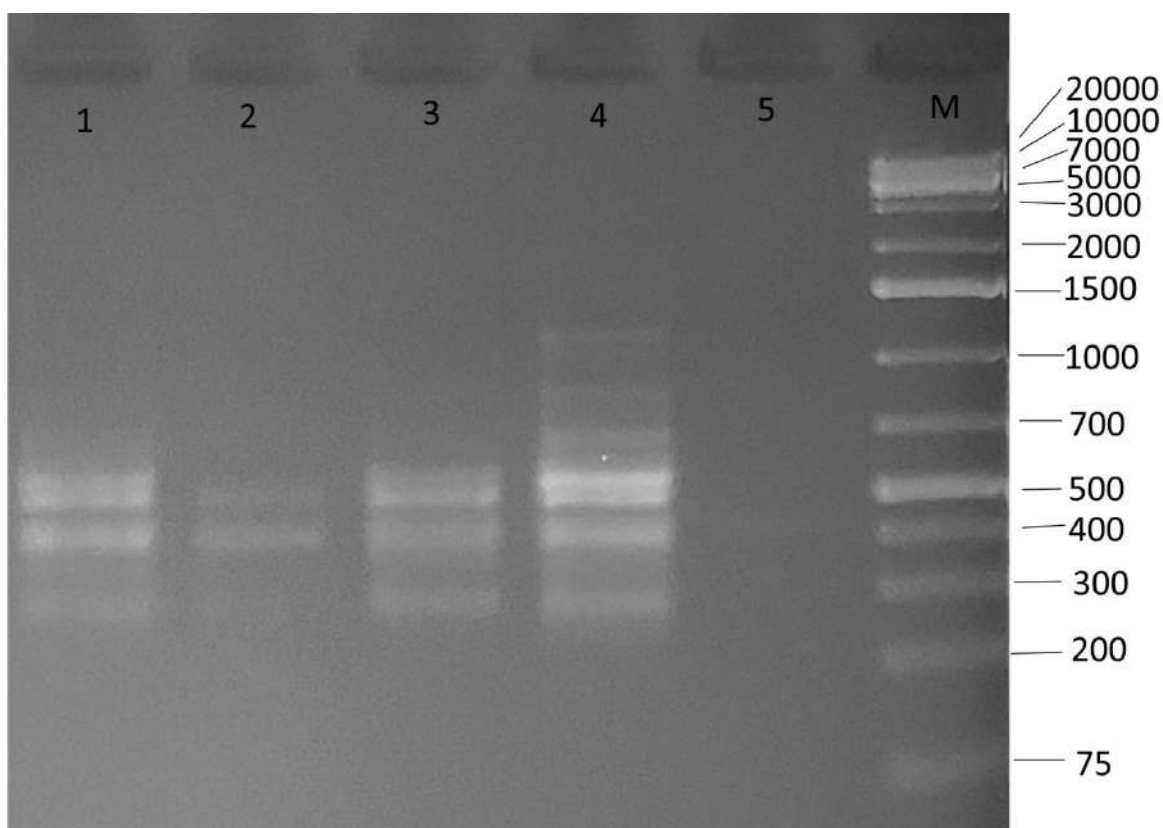


Рис. 5.7 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК гуцульської породи коней за праймером (СТС)₆С. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-4 продукти ампліфікації ДНК; 5 – контроль.

З таблиці 5.2 бачимо, що найбільш консервативними фрагментами, за всіма досліджуваними праймерами, є амплікони в районі довжин 380-400 пн та 500-520 пн, а найбільш поліморфні – ділянки розміром 1000-1050 пн.

Всі основні параметри спектрів ампліфікації 8-ми ISSR-PCR праймерів були узагальнені і виведені в окрему таблицю 5.3

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

Праймер	(GA) ₉ C	(AG) ₉ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ CG	(GA) ₆ CC	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(CTC) ₆ C	Σ
К-сть локусів	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
Полімо рфних 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
Р, %	75	60	67	0	50	80	67	75	59,2

На основі генотипування 30-ти коней гуцульської породи знайдено 54 локуси, 33 з яких є поліморфними. Аналіз значень індекса РІС, який показує рівень інформативності локуса, виявив, що досліджувані особини гуцульської породи за спектром ампліконів при використанні праймерів (GA)₉C, (AG)₉C, (GA)₆CC, (ACC)₆G, (GAG)₆C, (CTC)₆C, характеризувалися помірною поліморфністю із значенням РІС в межах 0,29-0,41. У протестованих тварин, спектр ампліконів при використанні праймера (AG)₈CA характеризувався високим рівнем інформативності із значенням РІС=0,60. Лише при використанні одного праймера (AG)₈CG спектр одержаних ампліконів був повністю консервативним. Отже, досліджувана популяція коней гуцульської породи характеризується оптимальним рівнем генетичного різноманіття.

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

Для визначення поліморфізму фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими ди- і тринуклеотидними тандемними повторами, у коней породи коник польський, проведені дослідження полілокусних спектрів, використовуючи при цьому ПЛР реакцію, в якості праймерів якої були ди і тринуклеотидні мікросателітні повтори, що відрізнялися коровими мотивами (ISSR-PCR маркери). У спектрі продуктів ампліфікації із використання в якості праймерів динуклеотидних мікросателітних повторів з якорними послідовностями (GA)₉C, (AG)₉C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC одержано наступні результати (Рис.5.8 □ 5.10).

За праймером (AG)₈CG виявлено 7 максимально консервативних фрагментів. Довжини фрагментів становили 300 - 1290 пар нуклеотидів (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Аналіз поліморфізму фрагментів ДНК за ISSR-маркерами у популяції коней породи коник-польський

П.н.	(GA) ₉ C	(AG) ₉ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ CG	(GA) ₆ CC	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(CTC) ₆ C
1700-1750								К
1500-1550					К			
1400-1450						П		
1350-1400								
1300-1350			К					
1240-1290		П		К		П		
1000-1050		П			К		К	К
900-940						П		
820-870	К		К	К	П			К
760-810								
720-750						П		
680-710		К	К	К	К	К	К	К
640-670							К	
600-630	К				К	П		К
560-590		П	К	К				
530-550						П	К	
500-520	К	К	К		К		К	
460-440	К							
380-400	П	К	П	К		П	К	
370-360	К						К	
340-350				К				
300-310		К		К			К	
260-270		К						
240-250		П					К	
Локуси	6	9	6	7	6	8	9	5

Примітка. П □ поліморфні локуси; К □ консервативні локуси

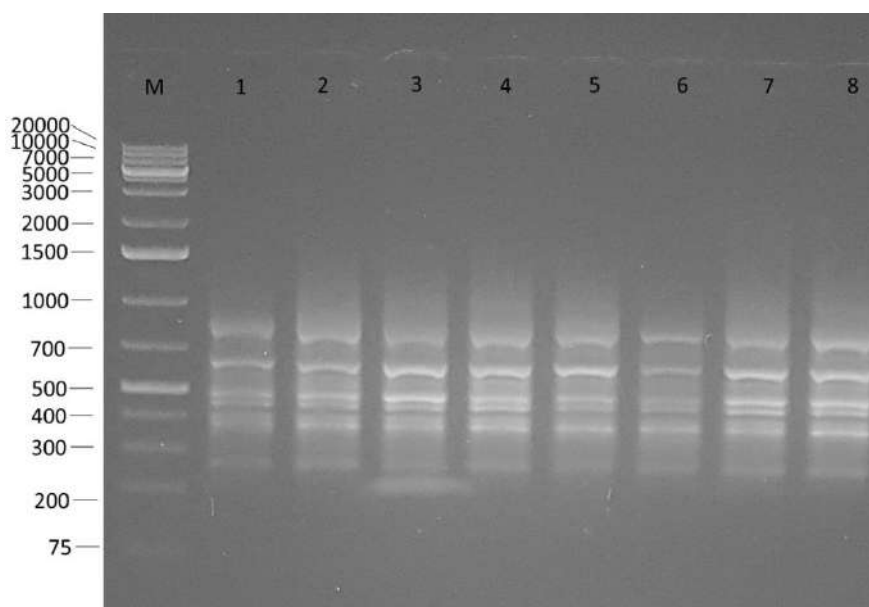


Рис. 5.8 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней породи коник польський за праймером $(GA)_9C$, Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-8 продукти ампліфікації ДНК. Розміри отриманих продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркеру молекулярних мас [Thermo Scientific™ Gene Ruler 1 kb Plus DNALadder, ready-to-use-75-20000 bp](#)

У спектрах ампліконів праймера $(GA)_9C$ (Рис. 5.8) виявлено 6 фрагментів. Межі довжин локусів становили 360-870 пн. Консервативними виявилися 5 фрагментів в районі довжин 360-370, 440-460, 500-520, 600-630 пн та 820-870 пн. Лише один фрагмент розміром 380-400 пн був помірно поліморфним ($PI=0,50$), частка поліморфізму становила 75%.

За праймером $(AG)_8CA$ (Рис. 5.9) виявлено 6 фрагментів. Найбільш консервативними ампліконами виявилися 5 фрагментів з довжинами 500-520, 560-590, 680-710, 820- 870, 1300-1350 пн та один амплікон в районі 380-400 пн, який був помірно поліморфним при $PI=0,48$, з часткою поліморфізму 62%.

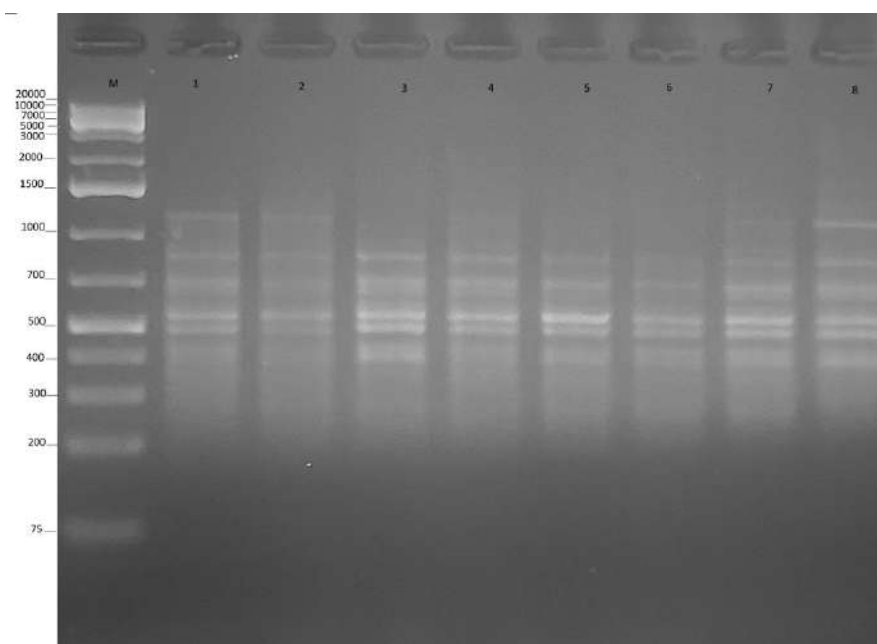


Рис. 5.9 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней породи коник польський за праймером $(AG)_8CA$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-8 продукти ампліфікації ДНК.

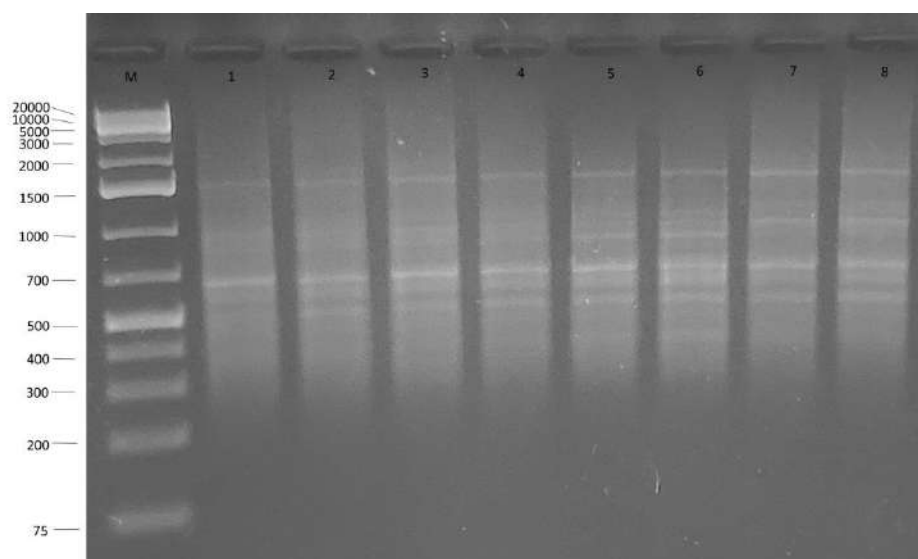


Рис.5.10 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней породи коник польський за праймером $(GA)_6CC$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-8 продукти ампліфікації ДНК.

Використання $(GA)_6CC$ (Рис. 5.10) дало змогу виявити 6 локусів, 5 з яких є найбільш консервативними. Довжина консервативних фрагментів становить 500-520, 600-630, 680-710, 1000-1050, 1500-1550 пн та один локус

довжиною 820-870 пн низько поліморфний при $PIC=0,24$, з часткою поліморфізму 25 %.

За праймером $(AG)_9C$ (Рис.5.11) виявлено 9 фрагментів, межі довжин яких становили 240-1290 пн. П'ять фрагментів довжиною 260-270, 300-310, 380-400, 500-520 та 680-710 пн виявилися консервативними. Помірно інформативними були 4 фрагменти довжиною 240-250, 560-590, 1000-1050 пн, (частка поліморфності яких становила 62 % при $PIC=0,47$) та фрагмент довжиною 1240-1290 пн з $P=75$ % при $PIC=0,50$.

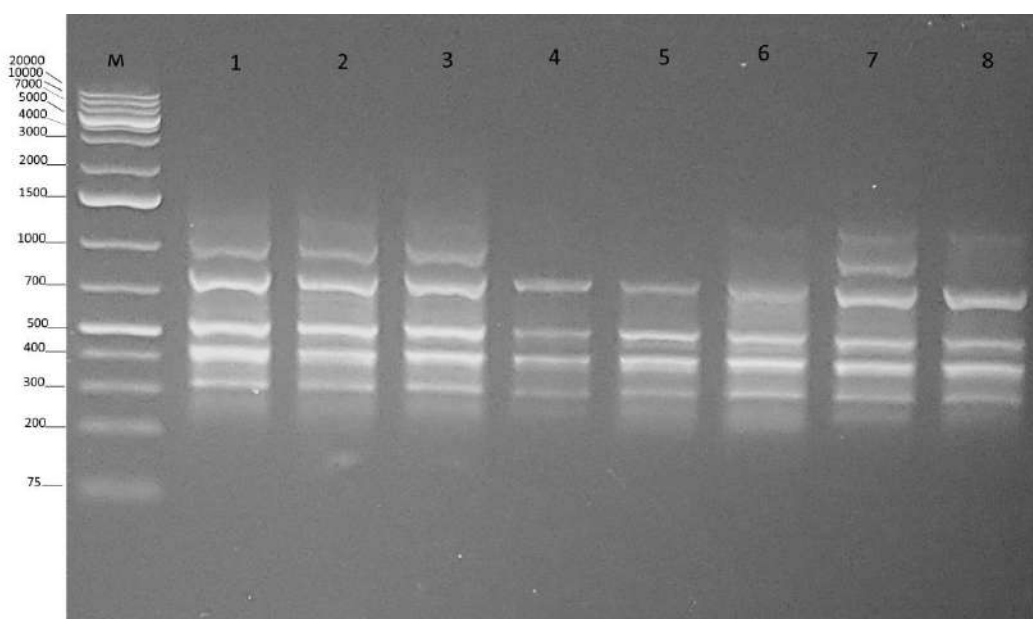


Рис. 5.11 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней породи коник польський за праймером $(AG)_9C$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-8 продукти ампліфікації ДНК.

При використанні праймерів $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$, $(CTC)_6C$ отримані наступні результати (табл. 5.4). В спектрах ампліконів праймера $(ACC)_6G$ (Рис 5.11) виділено 7 фрагментів ДНК. Найбільш консервативним є фрагмент

довжиною 680-710 пн. Помірно поліморфними були локуси довжиною 530-550, 600-630 та 720-750 пн ($PI_C=0,47$), частка поліморфізму яких становила 62 %, та локуси довжиною 900-940 та 1240-1290 пн. з $PI_C=0,50$ та $P=75\%$. Амплікон розміром 380-400 пн був низько інформативним, рівень гетерозиготності становив 0,13, а частка поліморфізму 12 %.

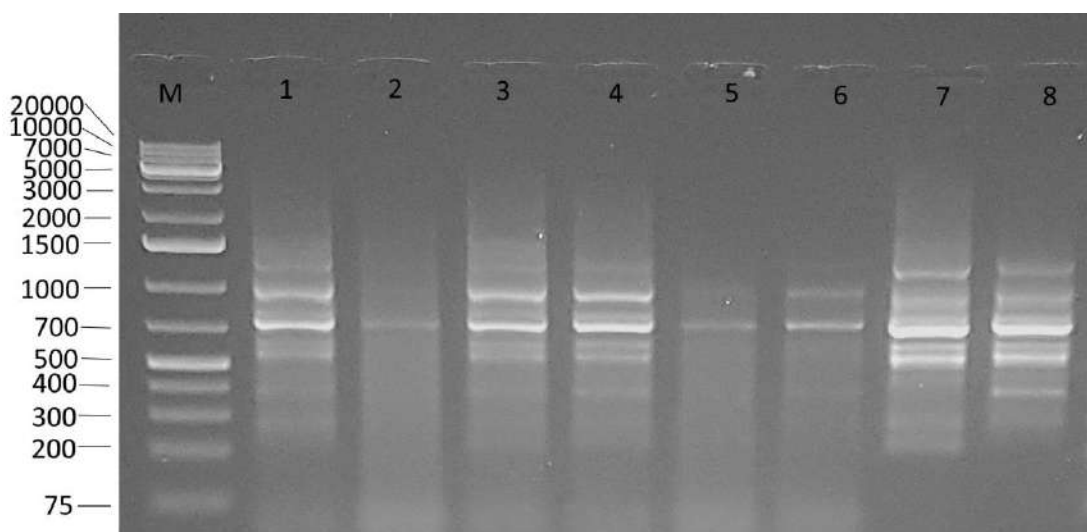


Рис. 5.12 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней породи коник польський за праймером $(ACC)_6G$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-8 продукти ампліфікації ДНК.

За праймерами $(GAG)_6C$ і $(CTC)_6C$ всі виділені фрагменти ДНК були консервативними (Рис. 5.12., Рис. 5.13).

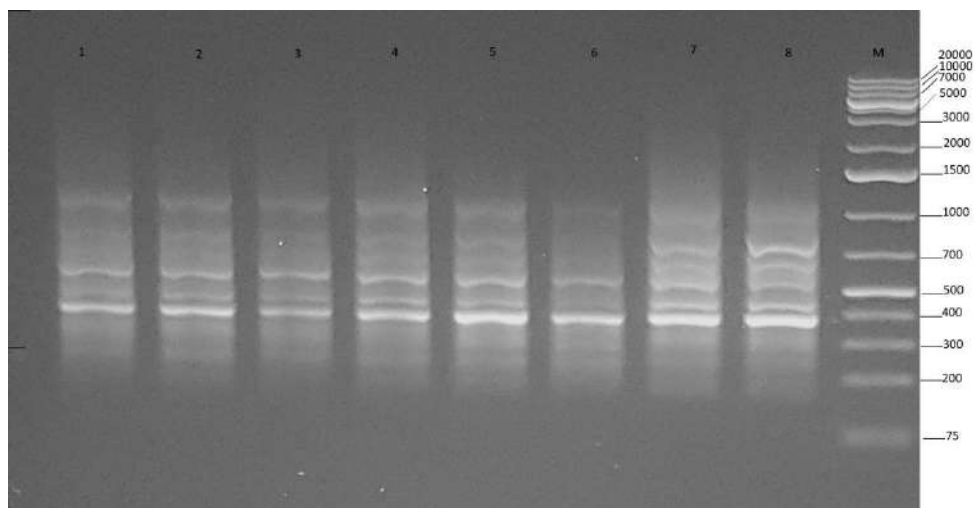


Рис. 5.13 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней породи коник польський за праймером $(GAG)_6C$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-8 продукти ампліфікації ДНК.

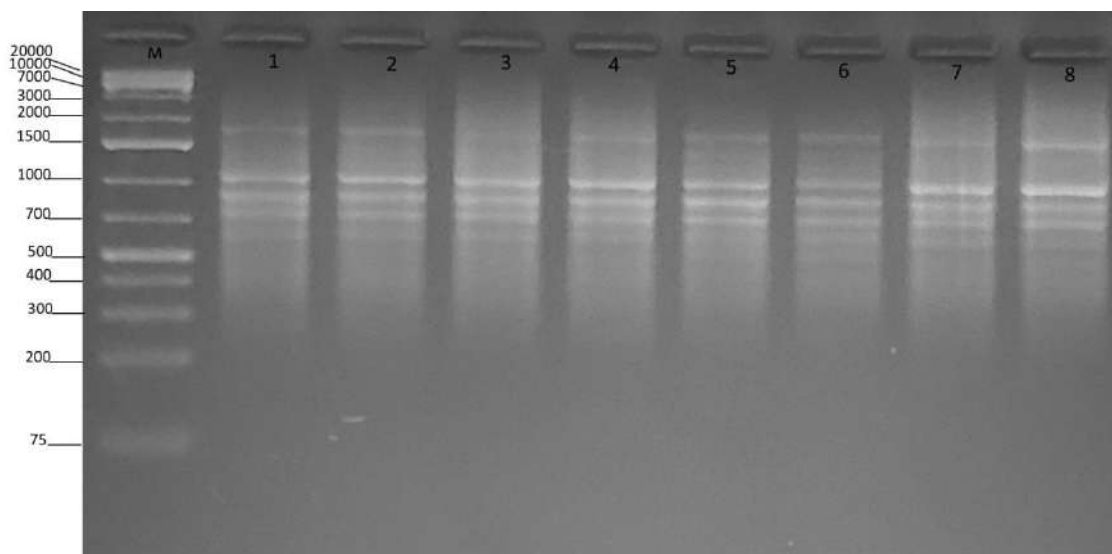


Рис. 5.14 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней породи коник польський за праймером $(CTC)_6C$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-8 продукти ампліфікації ДНК.

З одержаних даних робимо висновок, що у протестованих коней породи коник польський амплікони фрагментів ДНК довжиною 680-710 пн семи ISSR-праймерів є найбільш консервативними (за праймером (GA)₉C фрагмент ДНК – відсутній). Також достатньо консервативними фрагментами, що належали трьом і більше праймерам є амплікони в районі довжин 300-310, 380-400, 500-520, 600-630, 820-870 пар нуклеотидів.

Оцінка продуктів ампліфікації фрагментів ДНК за молекулярними масами (залежить від фіксованого інтервалу і визначеного кроку між виявленими фрагментами) показала, що більшість локусів (85 %) знаходяться в «легкій» та «середній» зонах відповідно до кількості пар нуклеотидів і лише 13 % - це «важкі» нуклеотиди. Інформація стосовно відносних молекулярних мас (розмірів) ампліконів дає можливість виявляти міжпородні відмінності.

Основні параметри спектрів ампліфікації 8-ми ISSR-маркерів, одержаних за результатами досліджень протестованих коней породи коник польський об'єднали і узагальнили у таблицю 5.5.

Таблиця 5. 5

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

Праймер	(GA) ₉ C	(AG) ₉ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ CG	(GA) ₆ CC	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(CTC) ₆ C	Σ
К-сть локусів	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
Поліморф-них локусів	1	4	1	0	1	7	0	0	14
РІС	0,08	0,21	0,07	0	0,04	0,36	0	0	0,09
Р, %	16,6	44,4	16,6	0	16,6	85,4	0	0	22,4

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. При застосуванні маркерів $(AG)_8CG$, $(GAG)_6C$, $(CTC)_6C$ спостерігалася повна відсутність поліморфізму продуктів ампліфікації. Найбільшу кількість поліморфних фрагментів (6 із 7) було знайдено при використанні $(ACC)_6G$ праймера ($PI=0,36$, $P=85,4\%$) та 4 поліморфних локуси з 9 при використанні $(AG)_9C$ праймера при $PI=0,21$, $P=44,4\%$. Ці локуси були помірно та низько інформативні (локуси зі значенням PI в межах 0,250-0,500 – помірно інформативні, при $PI < 0,25$ – низько інформативні). У спектрах праймерів $(GA)_9C$, $(AG)_8CA$, $(GA)_6CC$ знайдено лише по одному поліморфному локусу. Межі величин $PI=0,04-0,08$ 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 PI свідчить про високу ступінь генетичної консолідації коней породи коник польський та можливу репродуктивну ізоляцію популяції.

5.2.3 Поліморфізм фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими ди- і три нуклеотидними тандемними повторами, в геномі коней арабської породи

Для визначення генетичної своєрідності арабської породи коней було здійснено генотипування ПЛР-продуктів, одержаних методом ISSR-PCR з використанням 8 праймерів (табл. 5.6).

Таблиця 5.6

Аналіз поліморфізму фрагментів ДНК за ISSR-маркерами у популяції коней арабської породи

П.н.	(GA) ₉ C	(AG) ₉ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ CG	(GA) ₆ CC	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(CTC) ₆ C
1900-1800								К
1750-1700					К			
1550-1500					К			П
1350-1300					К			
1290-1240								
1050-1000			П			К	К	К
990-940								
930-880					К			К
870-820	К		П	К	К			
810-760					П		П	
750-720						К		
710-680			К	П				К
670-640	К			К	К	К	К	К
630-600								П
590-560		К	К		К		К	
550-530				К				
520-500	К		К	К	К	К		К
490-470		К						
460-440					К			
400-380	К	П	К			К	К	
370-360								
350-340				К	К		П	
330-320				К				
300-310		К						
290-280		П						
270-260								
250-240								
Локуси	4	5\2	6\2	7\1	11\1	5	6\2	8\2

При дослідженні полілокусних спектрів, виявлених за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймеру (GA)₉C (Рис.

5.14), в спектрах ампліконів виявлено 4 консервативні фрагменти. Межі довжин становили 380-870 пн.

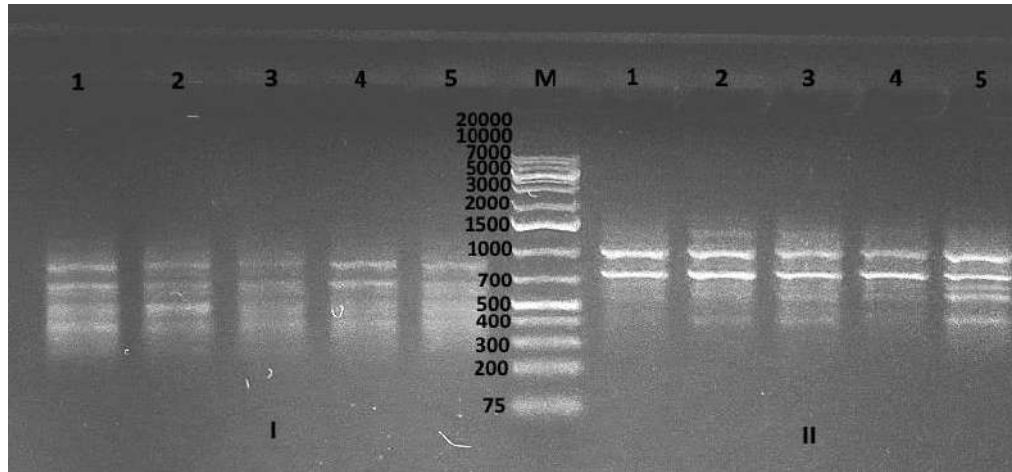


Рис. 5.14 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней арабської породи за праймером $(GA)_9C$ та $(ACC)_6G$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-5 продукти ампліфікації ДНК. Розміри отриманих продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркеру молекулярних мас [Thermo Scientific™ Gene Ruler 1 kb Plus DNALadder, ready-to-use-75-20000](#) бр. I- спектр фрагментів ампліфікації ДНК праймера $(GA)_9C$; II- спектр фрагментів ампліфікації ДНК праймера $(ACC)_6G$.

Із застосування праймера $(AG)_8CA$ (Рис. 5.15) виявлено 6 локусів (4 консервативних та 2 поліморфних) з межами довжин у 380-1050 пн. Поліморфними фрагментами ДНК є ділянки розміром 820-870 та 1000-1050 пн. Ці амплікони відносилися до помірноінформативних при $P=20\%$ та $PI=0,49$

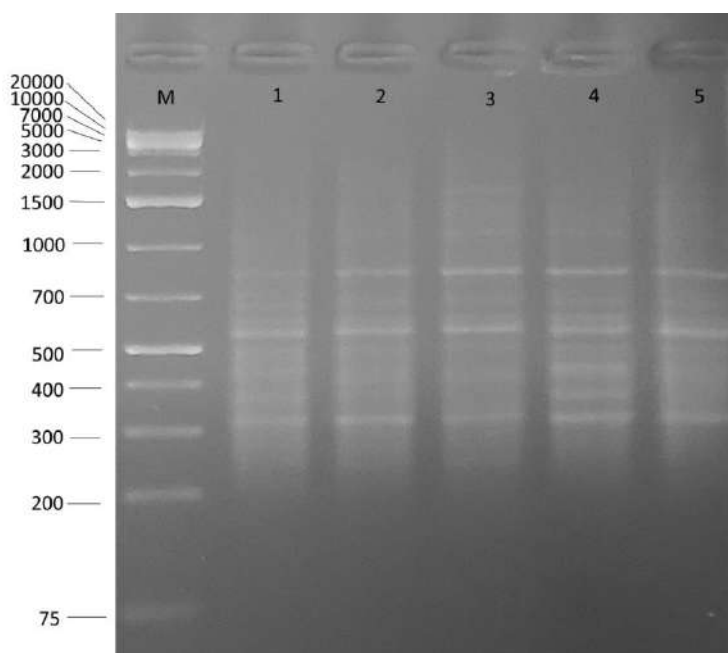


Рис. 5.15 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней арабської породи за праймером $(AG)_8CA$ Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-5 продукти ампліфікації ДНК.

У свою чергу, у спектрах праймера $(AG)_9C$ (Рис. 5.16) виявлено 5 локусів, 2 з яких є помірно поліморфними ($PIC=0,35$, $P=40\%$), а інші – консервативні. Межі довжин всіх знайдених ампліконів для цього праймера дорівнювали 280-590 пн.

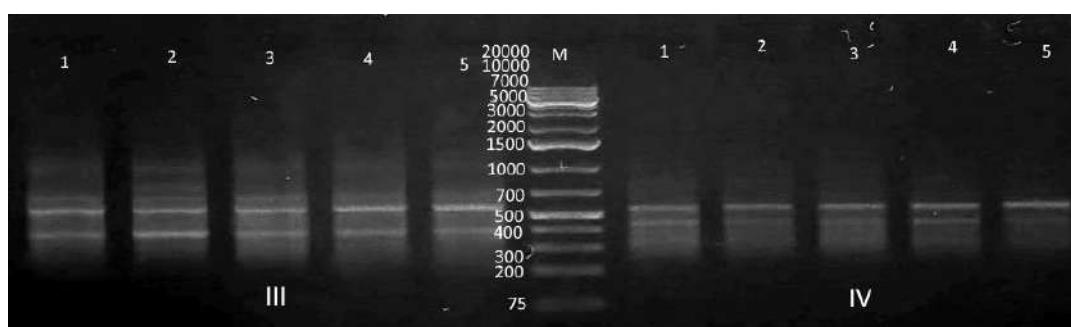


Рис.5.16 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней арабської породи за праймером $(GAG)_6C$ та $(AG)_9C$. Умовні позначення: М – маркер; 1-5 продукти ампліфікації ДНК. Розміри отриманих продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркеру молекулярних мас III- спектр фрагментів ампліфікації ДНК праймера $(GAG)_6C$; IV- спектр фрагментів ампліфікації ДНК праймера $(AG)_9C$.

Аналіз продуктів ампліфікації праймерів $(AG)_8CG$ (Рис. 5.17) і $(GA)_6CC$ (Рис. 5.18) виявив 7 та 11 ампліконів. Локус довжиною 680-710 п. н. праймера $(AG)_8CG$ та локус довжиною 760-810 п. н. праймера $(GA)_6CC$ були поліморфними. Всі інші знайдені амплікони цих праймерів – консервативні.

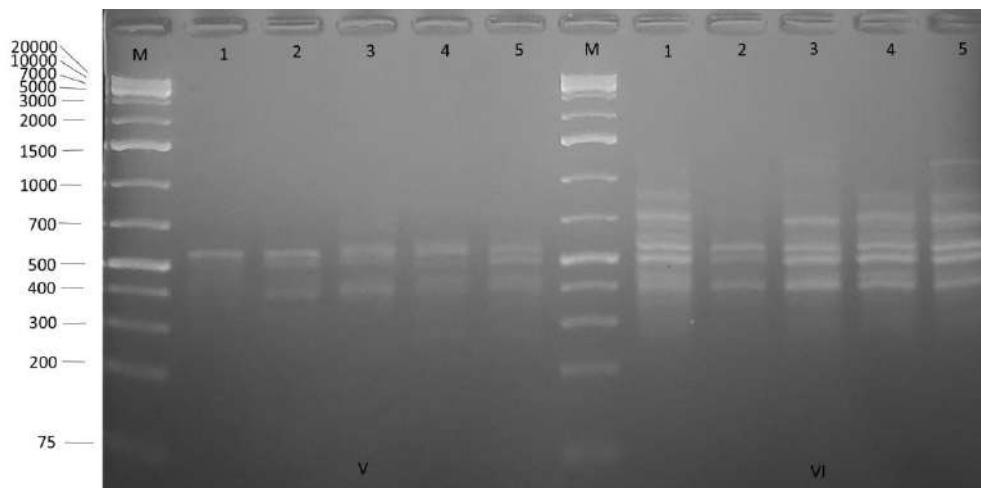


Рис.5.17 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней арабської породи за праймером $(CTC)_6C$ та $(AG)_8CG$. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-5 продукти ампліфікації ДНК. V- спектр фрагментів ампліфікації ДНК праймера $(CTC)_6C$; VI- спектр фрагментів ампліфікації ДНК праймера $(AG)_8CG$.

При використанні фрагментів тринуклеотидних мікросателітних повторів в якості праймеру $(ACC)_6G$ (Рис. 5.14) виявлено 5 локусів довжиною 380-1050 пн, всі з яких були консервативні.

За праймерами $(GAG)_6C$ (Рис.5.16) та $(CTC)_6C$ (5.17) отримано по 2 поліморфних локуси. Довжина поліморфних локусів праймера $(GAG)_6C$ становить 340-350 та 760-810 пн, а праймера $(CTC)_6C$ - 600-630 та 1500-1050 пн. Частки поліморфних локусів (P) і індексу PIC дорівнювали (P=60%, PIC=0,46 та P=40%, PIC=0,35 відповідно). Це помірно поліморфні локуси. Всі інші локуси – консервативні.

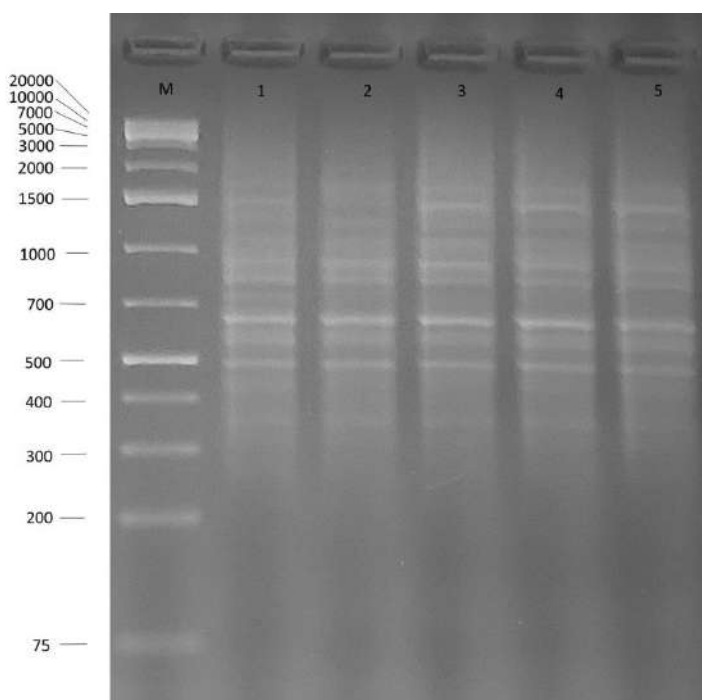


Рис.5.18 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК коней арабської породи за праймером (GA)₆CC. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-5 продукти ампліфікації ДНК.

Характеристика ампліфікованих фрагментів ДНК за використанням ISSR-маркерів показала, що найбільша кількість ампліконів знаходилася в межах довжин 340-1050 пн. Проте, при використанні в якості динуклеотидного праймера з послідовністю (GA)₆CC та тринуклеотидного праймера з послідовністю (CTC)₆C спостерігається тенденція до появи в спектрах «тяжких» ампліконів із молекулярною масою 1500-1900 пн.

У протестованих коней арабської породи амплікони розміром 380-400, 500-520, 560-590, 640-670, 820-870 та 1000-1050 пн. є найбільш консервативними, оскільки, зустрічаються не менш ніж за трьома різними праймерами.

Результати із використання ISSR-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму коней арабської породи подано у таблиці 5. 7

Таблиця 5.7

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

Праймер	(GA) ₉ C	(AG) ₉ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ CG	(GA) ₆ CC	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(CTC) ₆ C	Σ
К-сть локусів	4	5	6	7	12	5	6	8	53
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)₉C та тринуклеотидного (ACC)₆G праймерів у ISSR спектрах жодного поліморфного локусу не виявлено. У спектрах інших 6 праймерів (табл.5.7), що застосовувалися для оцінки 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.

5.2.4 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 – μ та частку рідкісних локусів – h_μ

Одержані результати основних показників 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), проміжна величина поліморфізму проявилася у коней породи коник польський (0,224) (табл. 5.8)

Таблиця 5.8

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

Порода	P	H_s	H'	μ	h_μ
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

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

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), проміжна величина поліморфізму проявилася у коней породи коник польський (0,224). Середнє на локус генне різноманіття (H_s), що визначає гетерозиготність за всіма локусами, 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).

Для аналізу генетичного різноманіття був застосований індекс різноманітності Шеннона. Найбільші показники алельного різноманіття (H') властиві коням гуцульської породи (0,311) і найменш виражена ця різноманітність (0,116) у коней арабської породи. Такі показники як відсоток поліморфних локусів (менше 30%), середнє на локус генне різноманіття за Неєм (менше 0,044), індекс інформації Шеннона (менше 0,063) можуть побічно свідчити про інбредну депресію в популяції або про її жорстку ізоляцію. [300]. 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 ($P=0,224$).

Внутрішньопопуляційне різноманіття досліджуваних коней було проаналізоване і за допомогою параметрів середнього числа поліморфних локусів μ і частки рідкісних локусів h_μ . (Животовский 1980). Середнє число поліморфних локусів μ оцінює ступінь різноманіття за поліморфною ознакою. Частка рідкісних локусів h_μ оцінює структуру різноманітності популяції. Найменший показник ступеня різноманітності μ (3,99) був характерний для коней арабської породи, а найбільший – μ (25,97) для гуцульської породи. Високі значення μ можуть свідчити про значну нерівномірність розподілу частот алелей [307, 309].

Для оцінки значимості відмінностей між цими популяціями коней визначали статистичну достовірність різниці середніх величин. Різниця середніх величин між популяціями коней гуцульської породи та коней породи коник польський за середнім числом поліморфних локусів при $t_d = 6,55$ була статистично достовірною $P > 0,999$, між кіньми гуцульської та арабської породи $t_d = 4,99$ із статистичною вірогідністю $P > 0,999$ і між кіньми породи коник польський та арабською породою $t_d = 3,90$ при $P > 0,999$.

Частка рідкісних локусів h_{μ} 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 $\square 0,20$. Проте, різниця середніх величин за часткою рідкісних локусів у популяціях коней гуцульської та арабської породи дорівнювала $t_d=1,50$ і була статистично невірогідною. За результатами оцінки стану генофондів досліджених коней встановлено, що найвище генетичне різноманіття притаманне коням гуцульської породи.

5.2.5 Генетичний моніторинг внутрішньопородної і міжпородної мінливості коней за ISSR-PCR маркерами

Для проведення генетичного моніторингу внутрішньопородної і міжпородної диференціації коней, що вивчалися, провели порівняльний аналіз полілокусних спектрів ISSR-PCR маркерів із використанням 8 праймерів (Рис. 5.5; 5,6). Для встановлення внутрішньопородної та міжпородної мінливості у досліджуваних коней знаходили генофондний профіль та породоспецифічний патерн. Під генофондним профілем розуміють сукупність всіх виявлених фрагментів ISSR-PCR маркерів і частоту з якою вони зустрічалися у породі. Для визначення породоспецифічного патерна до уваги приймалися фрагменти ДНК, які зустрічалися з найбільшою частотою (частота $>0,4$) [301]. На рисунках бенди чорного та сірого кольору формували генофондний профіль порід протестованих коней, а бенди чорного кольору - породоспецифічний патерн (рис. 5.19; 5.20).

Фрагменти	Довжина фрагментів, (п.н.)	(GA) ₉ C			(AG) ₉ C			(AG) ₈ CA			(AG) ₈ CG		
		Гуцульська порода	порода Коник польський	Арабська порода	Гуцульська порода	порода Коник польський	Арабська порода	Гуцульська порода	порода Коник польський	Арабська порода	Гуцульська порода	порода Коник польський	Арабська порода
A 7	1450-1400												
A 8	1350-1300								■				
A 9	1290-1240					■						■	
A 10	1230-1180							○					
A 11	1170-1120												
A 12	1110-1060												
A 13	1050-1000				■	■		○		■			
A 15	930-880	■											
A 16	870-820	○	■	■				○	■	■	■	■	■
A 17	810-760				■								
A 18	750-720												
A 19	710-680					■		○	■	■	■	■	■
A 20	670-640	■		■									■
A 21	630-600	■	■										
A 22	590-560					■	■		■	■		■	
A 23	550-530						■	■	■	■			■
A 24	520-500	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■
A 25	490-470	■					■						
A 26	460-440		■										
A 28	400-380	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	
A 29	370-360		■										
A 30	350-340										■	■	■
A 31	330-320												■
A 32	310-300					■	■	■			■	■	
A 33	290-280	■			■		■						
A 34	270-260					■		■					
A 35	250-240					■							

■ □ фрагмент ДНК, частота якого $\geq 0,4$; ○ □ фрагмент ДНК, частота якого $< 0,4$

Рис. 5. 19 Генофондовий профіль і породоспецифічний патерн, одержані за допомогою праймерів (GA)₉C, (AG)₉C, (AG)₈CA, (AG)₈CG у коней порід гуцульської, коника польського та арабської

Фрагменти	Довжина фрагмен- тів, (п.н.)	(GA) ₆ CC			(ACC) ₆ G			(GAG) ₆ C			(CTC) ₆ C		
		Гуцульська порода	порода Коник польський	Арабська порода	Гуцульська порода	порода Коник польський	Арабська порода	Гуцульська порода	порода Коник польський	Арабська порода	Гуцульська порода	порода Коник польський	Арабська порода
A 3	1900-1800												
A 4	1750-1700	▬		▬							▬	▬	
A 5	1650-1600												
A 6	1550-1500	▬	▬	▬							▬		▬
A 7	1450-1400										▬		
A 8	1350-1300			▬									
A 9	1290-1240					▬							
A 11	1110-1060			▬									
A 13	1050-1000	▬	▬		▬		▬		▬	▬		▬	▬
A 14	900-940					▬							
A 15	930-880			▬									▬
A 16	870-820	▬	▬	▬				▬			▬	▬	
A 17	810-760			▬				▬		▬			
A 18	750-720					▬	▬						
A 19	710-680	▬	▬		▬	▬			▬		▬	▬	▬
A 20	670-640			▬			▬		▬	▬			▬
A 21	630-600	▬	▬		▬	▬		▬			▬	▬	▬
A 22	590-560			▬						▬			
A 23	550-530				▬	▬			▬				
A 24	520-500	▬	▬	▬			▬	▬	▬	▬	▬		▬
A 25	490-470							▬					
A 26	460-440			▬									
A 28	400-380	▬			▬	▬	▬	▬	▬	▬			
A 29	370-360							▬	▬				
A 30	350-340			▬						▬			
A 32	310-300							▬	▬				
A 34	270-260							▬					
A 35	250-240								▬				

▬ □ фрагмент ДНК, частота якого $\geq 0,4$; ▬ □ фрагмент ДНК, частота якого $< 0,4$

Рис. 5.20 Генофондовий профіль і породоспецифічний патерн, одержані за допомогою праймерів $(GA)_6CC$, $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$, $(CTC)_6C$ у коней порід гуцульської, коника польського та арабської

Аналізуючи рис. 5.19 та рис. 5.20 бачимо, що генофондовий профіль порід коней характеризувався різною довжиною фрагментів ДНК та частотою з якою вони зустрічалися. Для встановлення породоспецифічного патерну досліджуваних порід коней підраховували кількість фрагментів ДНК, за якими одна порода відрізнялася від іншої (таблиця 5.9).

Таблиця 5.9

Породоспецифічний патерн коней порід гуцульської, коника польського та арабської, одержаного за допомогою праймерів (GA)₉C, (AG)₉C, (AG)₈CA, (AG)₈CG, (GA)₆CC, (ACC)₆G, (GAG)₆C та (CTC)₆C

Порода	(GA) ₉ C	(AG) ₉ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ C G	(GA) ₆ C C	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(CTC) ₆ C
Г	A15 A25 A33	A17 A22 A32	A22 A23 A32 A34		A28	A18	A13 A16 A20 A21 A25 A30	A7 A13
п локусів	3	3	4		1	1	6	2
К. п.	A20 A26 A29	A9 A19 A33 A34 A35	A8 A13	A9 A22 A24 A28	A4	A9 A13 A14	A17 A19 A23 A35	A6 A21
п локусів	3	5	2	4	1	3	4	2
А	A21	A13 A23 A24 A25		A20 A23 A31 A32	A8 A11 A13 A15 A19 A22 A21 A26 A30	A19 A20 A21 A23 A24	A22 A30 A32	A3 A4 A16 A20
п локусів	1	4		4	9	5	3	4

Примітки: А3-А35 – фрагменти ДНК, позначені на універсальній шкалі;

Г – гуцульська порода, К. п. – порода коник польський, А – арабська порода

Одержані результати показали, що кількість фрагментів ДНК, які за універсальною шкалою позначені як A1-A38 і за якими одна порода відрізняється від іншої знаходилася в межах від 1 до 9. Найбільша міжпородна відмінність спостерігалася між фрагментами за праймером (GA)₆CC. Так, коні арабської породи відрізнялися 9 фрагментами від коней порід гуцульської та коника польського, які різнилися між собою лише одним фрагментом (коник польський фрагментом A4, а гуцульські коні – фрагментом A28). У гуцульської породи коней за праймером (AG)₈C міжпородна відмінність з кінями порід коник польський та арабська не проявилася. Відсутність міжпородної відмінності за праймером (AG)₈CA спостерігалася і в арабської породи коней по відношенню до інших досліджуваних порід.

Генофондовий профіль і породоспецифічний патерн протестованих тварин, дав можливість встановити унікальні поліморфні ДНК – локуси, властиві тільки цим породам (Рис. 5.21, табл.5.10).



Рис. 5.21 Кількість унікальних поліморфних ДНК-фрагментів, виявлених у порід коней гуцульської, коника польського, арабської

Унікальні поліморфні ДНК-фрагменти у коней гуцульської, коника
польського та арабської порід

На діаграмі показано кількість унікальних ДНК-фрагментів, властивих

Порода коней	Праймер	Межі довжин (пн)
Гуцульська	(GA) ₉ C (AG) ₉ C (AG) ₈ CA (CTC) ₆ C (GAG) ₆ C	A-15 880-930 A-17 760-810 A-10 1180-1230 A-7 1400-1450 A-25 470-490; A-34 260-270
Коник польський	(GA) ₉ C (AG) ₉ C (AG) ₈ CG (ACC) ₆ G (GAG) ₆ C	A-29 360-370 A-26 440-460 A-35 240-250 A-8 1300-1350 A-9 1240-1290; A-14 900-940 A -35 240-250
Арабська	(GA) ₆ CC (GAG) ₆ C (CTC) ₆ C	A-8 1300-1350; A-11 1060-1110; A-22 560-590; A-26 440-460; A-30 340-350 A-26 440-460; A-30 340-350 A-3 1800-1900; A-15 880-930

для коней досліджених порід. Так, тільки для коней гуцульської породи було виявлено фрагменти праймерів (GA)₉C (A-15 880-930 п. н.), (AG)₉C (A-17 760-810 п. н.), (AG)₈CA (A-10 1180-1230 п. н.), (CTC)₆C (A-7 1400-1450 п. н.), (GAG)₆C (A-25 470-490 п. н.; A-34 260-270 п. н.) для коней породи коник польський - (GA)₉C (A-29 360-370 п. н. A-26 440-460 п. н.), (AG)₉C (A-35 240-250 п. н.), (AG)₈CG (A-8 1300-1350), (ACC)₆G (A-9 1240-1290, A-14 900-940), (GAG)₆C (A -35 240-250) і для арабської породи (GA)₆CC (A-8 1300-1350, A-11 1060-1110, A-22 560-590, A-26 440-460, A-30 340-350),

(GAG)₆C (A-26 440-460; A-30 340-350), (CTC)₆C (A-3 1800-1900; A-15 880-930) (табл. 5.10).

5.3 Оптимізація методу виділення ДНК з викопних решток кісток коней

Для розуміння процесів domestикації коня, окрім археологічних і палеонтологічних методів дослідження, необхідністю стає використання засобів інших методичних підходів таких як молекулярно-генетичний аналіз ДНК [4]. Використання ISSR-маркерів є одним із варіантів тест-систем для вивчення генетичного поліморфізму, які надають змогу проаналізувати ампліфіковані фрагменти ДНК і провести певні філогенетичні зв'язки у досліджених групах.

В лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН проведено дослідження в області палеогенетики, а саме – вивчення молекулярно-генетичної складової у викопних рештках древніх представників роду *Equus* за допомогою ISSR-маркерів. Визначним моментом в підборі методики дослідження було те, що міжмікросателітний поліморфізм використовується для дослідження міжвидової і внутрішньовидової генетичної мінливості. Вважається, що отримані при ISSR-аналізі фрагменти ДНК можуть бути видо- та породоспецифічними і цей метод широко застосовується дослідниками при вивченні породних груп [301-306].

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. 5.22 наведено фотографії отриманого палеонтологічного матеріалу.



Рис. 5.22 Палеонтологічні знахідки викопних решток коней: а—кістка п'ястку (os. Tarsicentral) плейстоценового коня; б—кістка плейстоценового коня, знайдена у Новгород-Сіверському; с—фаланга кінцівки справжнього тарпана; д—зуб дикого коня тарпана; е—зуб давнього свійського коня; ф—фрагмент хребця давнього свійського коня

Одна кістка знайдена в с. Буки Житомирської обл. під час будівельних робіт в кар'єрі. Розкопки здійснені у 1960 р. Інша кістка знайдена в Новгороді-Сіверському Чернігівської обл. Розкопки проводилися П. І. Борисовським у 1935 р. Для дослідження дикого коня тарпана (7480-7170 р. тис. р. до н. е.) було використано зуб та фалангу кінцівки, знайдений в

с. СкибницяТростянецького району Вінницької області. Розкопки проведені у 1959 році В. М. Даниленком. Для дослідження палеонтологічний матеріал був наданий Київським національним науково-природничим музеєм НАН України, відділ палеонтології.

Дослідження давнього свійського коня здійснювалися на слідуєчих палеонтологієних знахідках: зуб свійського коня (культура шнурової кераміки 3-2 тисячоліття до н. е. с. Семенів, Здовбунівський район Рівненська обл.).Розкопки проведені Львівським історичним музеєм, 1958 рік; фрагмент хребця коня, Скіфський період. 7-3 ст. до н. е. с. Сухостав, Гусятинський район,Тернопільська обл. (Львівський історичний музей 1952 р.).

Виділення ДНК з кісткової тканини є, як правило, тривала процедура, що 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 MgCl₂, 1 % Тритон Х-100, 0.01М тріс-НСІ (рН7.6)) і витримували при 4 °С протягом 30 хв. Після центрифугування, осад ресуспендували в 1,5 мл розчину солі ЕДТА (75 мМNaCl, 25 мМ ЕДТА (рН 8.0), додавали 10 мкл 10 мг/мл протеїназиК та20мкл 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 ТЕ, 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. Обережно, не торкаючись проміжної фази, 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 °C, висушували при кімнатній температурі і додавали 50-100 мкл дистильованої /деіонізованої води.

Після цього у кожену пробірку вносили в по 300 мкллізуючого розчину для відмивки «ДНК-сорб В» (АмпліСенс) прогрітого при 65°C до повного розчинення кристалів і вносили по 100 мкл проб.

Ефективність виділення ДНК в отриманому препараті визначали в агарозному гелі, шляхом порівняння яскравості полос фрагментів, які аналізуються і стандартного препарату ДНК (фрагменти фага λ).

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 [310-312]. Нуклеотидну структуру обраних праймерів та структура мотиву для кожного з них наведено у таблиці 5.11.

Таблиця 5.11

Нуклеотидна послідовність праймерів, які використовувалися у дослідженнях

Назва маркеру	Нуклеотидна послідовність	Мотив
GA-ISSR	5`-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3`	(GA) ₉ C
ACC-ISSR	5`-ACCACCACCACCACCG-3`	(ACC) ₆ G
GAG-ISSR	5`-GAGGAGGAGGAGGAGC-3`	(GAG) ₆ C
AG-ISSR	5`-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3`	(AG) ₉ C

Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 1 мкл буфера для Tag-полімерази, 1 мкл суміші трифосфатів («Амплісенс», Росія), 0,8 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази («Fermentas», Литва), вода для ПЛР 3 мкл. Геномна ДНК додавалась у кількості 4 мкл. Загальний об'єм ДНК-суміші становив 10 мкл. Ампліфікацію проводили на програмованому чотирьох-канальному термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Програма ампліфікації: 1 цикл – первинна денатурація (95°C, 2 хв); 30 циклів – денатурація (95°C, 30 с), відпал (56–64°C, 30 с) та елонгація (72°C, 1 хв); 1 цикл – фінальна елонгація (72°C, 5 хв).

Після проведення полімеразної ланцюгової реакції продукти ампліфікації розділяли у 2% агарозному гелі в 1×TBE-буфері при напрузі 90 В впродовж 2 год. Візуалізацію проводили із використання етидіуму броміду на транслюмінаторі в УФ-світлі при довжині хвилі 380 нм. Розміри продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркеру молекулярних мас [ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use](#)-75-20000 bp. Загалом, у результаті виконаної роботи ми отримали амплікони розміром від 300 до 2000 п. н.

На рис. 5.23. наведено фотографію електрофореграми за маркером молекулярних мас [ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use](#)-75-20000 bp фрагментів ампліфікації ДНК плейстоценового коня за праймером (GA)₉C.

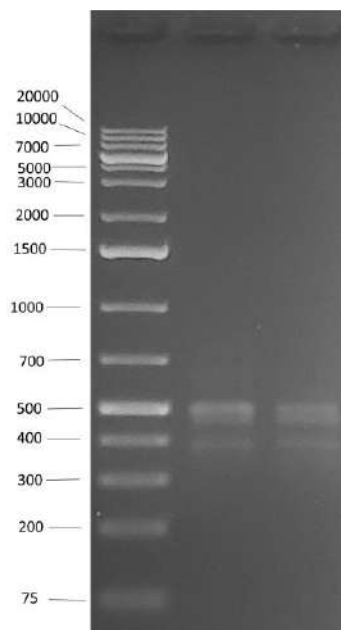


Рис.5.23 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК плейстоценового коня за праймером (GA)₉C. Умовні позначення: М – маркер молекулярних мас; 1-2 продукти ампліфікації.

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 електорофореграми продуктів ампліфікації.

На основі розробленої та адаптованої методики у подальшому використовували методичні підходи ISSR-PCR для дослідження генетичної мінливості у популяціях коней різних порід.

5.4 Генофондний профіль фрагментів ISSR-PCR маркерів, одержаних із викопних кісток плейстоценового коня, тарпана і давнього свійського коня

Для встановлення філогенії аборигенної гуцульської породи коней та коней породи коник польський, яка знаходиться під егідою ЮНЕСКО та занесена до Червоної книги був побудований «протогенофонд» -спектр

продуктів ампліфікації молекули ДНК найбільш древньої групи коней. Згідно принципу популяційних систем, генетичне різноманіття сучасних популяцій відповідає деякій предковій «прапопуляції», генофонд якої можна умовно назвати «протогенофондом» [302]. Спектр продуктів ампліфікації ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана і давнього свійського коня, одержаних за допомогою праймерів $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$, $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$ та $(CTC)_6C$, показано на рисунках 5.24, 5.25

Фрагменти	Довжина фрагмен- тів, (п.н.)	(GA) ₉ C			(AG) ₉ C			(AG) ₈ CA			(AG) ₈ CG		
		Плейстоцено- вий кінь	Справжній тарпан	Давній свійський кінь	Плейстоцено- вий кінь	Справжній тарпан	Давній свійський кінь	Плейстоцено- вий кінь	Справжній тарпан	Давній свійський кінь	Плейстоцено- вий кінь	Справжній тарпан	Давній свійський кінь
A 7	1450-1400												
A 8	1350-1300												
A 9	1290-1240												
A 10	1230-1180												
A 11	1170-1120												
A 12	1110-1060												
A 13	1050-1000		■■■■	■■■■						■■■■			
A 15	930-880												
A 16	870-820		■■■■	■■■■		■■■■	■■■■			■■■■			■■■■
A 17	810-760		■■■■	■■■■									
A 18	750-720												
A 19	710-680		■■■■	■■■■						■■■■			■■■■
A 20	670-640						■■■■						■■■■
A 21	630-600		■■■■	■■■■			■■■■						
A 22	590-560							■■■■	■■■■	■■■■			
A 23	550-530										■■■■	■■■■	■■■■
A 24	520-500	■■■■	■■■■	■■■■		■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■
A 25	490-470	■■■■	■■■■	■■■■									
A 26	460-440				■■■■			■■■■			■■■■		
A 27	430-410											■■■■	
A 28	400-380	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	
A 29	370-360				■■■■							■■■■	
A 30	350-340	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■					■■■■		■■■■
A 31	330-320											■■■■	■■■■
A 32	310-300				■■■■	■■■■	■■■■	■■■■			■■■■		
A 33	290-280												
A 34	270-260		■■■■	■■■■									
A 35	250-240											■■■■	

Рис. 5.24 Протогенофонд молекули ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана і давнього свійського коня, одержаних за допомогою праймерів (GA)₉C, (AG)₉C, (AG)₈CA, (AG)₈CG

Фрагменти	Довжина фрагмен- тів, (п.н.)	(GA) ₆ CC			(ACC) ₆ G			(GAG) ₆ C		
		Плейстоцено- вий кінь	Справжній тарпан	Давній свійський кінь	Плейстоцено- вий кінь	Справжній тарпан	Давній свійський кінь	Плейстоцено- вий кінь	Справжній тарпан	Давній свійський кінь
A 3	1900-1800									
A 4	1750-1700									
A 5	1650-1600									
A 6	1550-1500									
A 7	1450-1400									
A 8	1350-1300									
A 9	1290-1240		■■■■							
A 11	1110-1060									
A 13	1050-1000	■■■■	■■■■	■■■■		■■■■	■■■■			
A 14	900-940									
A 15	930-880		■■■■	■■■■						
A 16	870-820	■■■■	■■■■	■■■■						
A 17	810-760	■■■■		■■■■						
A 18	750-720								■■■■	■■■■
A 19	710-680		■■■■		■■■■				■■■■	■■■■
A 20	670-640	■■■■	■■■■	■■■■					■■■■	■■■■
A 21	630-600	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■		■■■■	■■■■
A 22	590-560									■■■■
A 23	550-530								■■■■	
A 24	520-500	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■			
A 25	490-470	■■■■	■■■■	■■■■						■■■■
A 26	460-440				■■■■				■■■■	
A 28	400-380		■■■■		■■■■	■■■■	■■■■		■■■■	■■■■
A 29	370-360	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■					■■■■
A 30	350-340								■■■■	
A 31	330-320				■■■■					
A 32	310-300				■■■■		■■■■			
A 34	270-260									

Рис. 5.25 Протогенофонд молекули ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана і давнього свійського коня, одержаних за допомогою праймерів (GA)₆CC, (ACC)₆G, (GAG)₆C

При дослідженні полілокусних спектрів ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана і давнього свійського коня, виявлених з використанням в якості праймерів динуклеотидних мікрсателітних повторів $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$ одержано такі результати: в спектрах ампліконів із праймером $(GA)_9C$ для плейстоценового коня знайдено 4 фрагменти, межі довжин яких становили 340-520 п. н. Однакові ДНК-фрагменти ($n=10$), виявлено із викопних кісток справжнього тарпана та давнього свійського коня, загальний діапазон яких складав 260-1050 п.н.

Продукти ампліфікації, отримані за використання праймера $(AG)_9C$ у палеонтологічних решток плейстоценового коня, проявилися у 5 фрагментах розміром 300-460 п.н., у справжнього тарпана – 5 фрагментів, у давнього свійського коня – 6 фрагментів, діапазон довжин яких становив 300-870 п.н.

Дослідження міжмікросателітних мультилокусних ділянок ДНК викопних решток коней, які розглядались за праймером $(AG)_8CA$, показало наявність від 4 до 6 фрагментів розміром 380-1050 п.н.

Спектр продуктів ампліфікації, за використання праймера $(AG)_8CG$, у викопних кістках плейстоценового коня дорівнював 5 фрагментам, межі довжин становили 300-550 п.н.; справжнього тарпана та давнього свійського коня – 7 фрагментам, розміром 240-550 та 320-870 п.н. відповідно.

Межі довжин виявлених локусів палеонтологічних решток коней при використанні праймера $(GA)_6CC$ становили 360-1050 п.н. у плейстоценового та давнього свійського коней і 360-1290 п.н. у справжнього тарпана. Найбільша кількість виявлених фрагментів ($n=11$) була характерна для викопних кісток справжнього тарпана. Для палеонтологічних знахідок плейстоценового та давнього свійського коня ампліфіковані ДНК-фрагменти були однаковими, виняток становив лише фрагмент 880-930 п.н., притаманний як давньому свійському коневі так і справжньому тарпану.

Найбільш інформативним праймером тринуклеотидних мікрсателітних повторів при дослідженні полілокусних спектрів ДНК

палеонтологічних викопних кісток коней виявився праймер $(GA)_6CC$. За цим праймером для молекули ДНК плейстоценового коня знайдено найбільшу кількість фрагментів ($n=8$) розміром 300-680 п.н., для справжнього тарпана – найменшу кількість ($n=4$), межі довжин яких становили 440-1050 п.н.і для давнього свійського коня – 5 фрагментів довжиною 300-1050 п.н. Послідовність праймера $(AG)_8CG$ виявилася неінформативною для ДНК плейстоценового коня, а спектру продуктів ампліфікації у випадку з палеонтологічними рештками коней за праймером $(GA)_6CC$ взагалі не виявлено.

5.5 Диференціація генофондів різних видів коней із використання ISSR-маркерів

Для розв'язання питання походження, видової та породної приналежності досліджуваних коней було проведене полілокусне генотипування із використанням оцінки довжин фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами нуклеотидних послідовностей. Дослідження проводились на молекулах ДНК, виділених із крові коней порід арабської, коника польського і гуцульської та ДНК, виділеної із викопних кісток плейстоценового коня, тарпана і давнього свійського коня. В дослідженнях розглядалися спектри продуктів ампліфікації, одержані за допомогою метода ISSR-PCR при використанні праймерів $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$, $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$ та $(CTC)_6C$. До уваги приймалися лише ті спектри продуктів ампліфікації, які проявлялися зі 100% зустрічальністю у досліджуваних тварин (рис. 5.26).

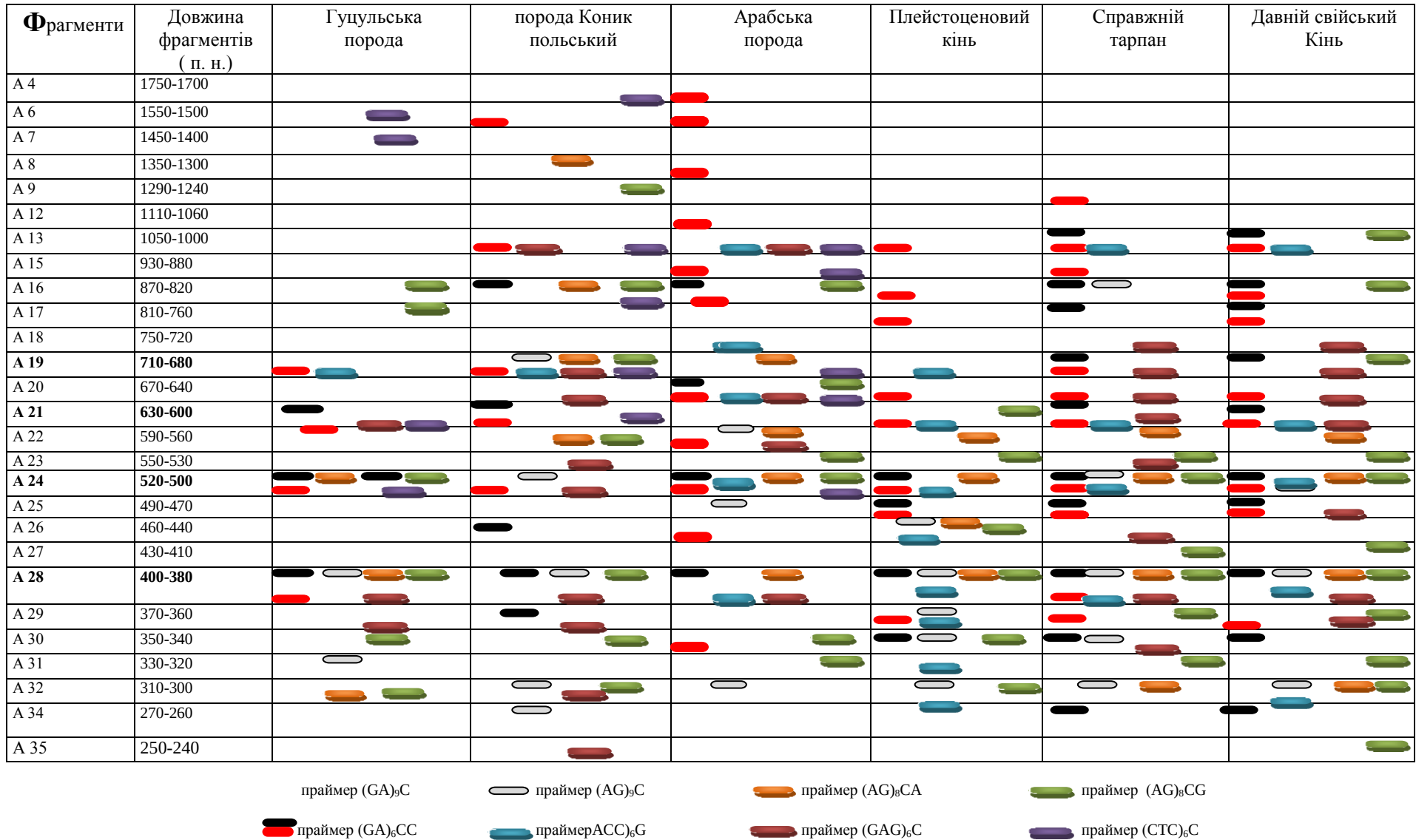


Рис 5.26 Міжвидові та міжпородні відмінності в спектрах ПЛР продуктів (частота =1,0), одержані методом ISSR-PCR

Одержані спектри продуктів ампліфікації ДНК порід коней гуцульської, коника польського, арабської та спектри продуктів ампліфікації ДНК із викопних решток плейстоценового коня, справжнього тарпана і давнього свійського коня на 97% за універсальною шкалою розмірності ISSR – фрагментів в п. н. (Сулімова) належали до «легких» (A-25 – A-35) та «середніх» (A-13 – A-25), що можна віднести до специфічної характеристики виду Кінь дикий (*E ferus*). Найменша кількість локусів ДНК (26), одержаних за допомогою 8 праймерів (GA)₉C, (AG)₉C, (AG)₈CA, (AG)₈CG, (GA)₆CC, (ACC)₆G, (GAG)₆C та (CTC)₆C, 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 викопних решток 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 викопних решток, 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*. А для коней арабської породи - це породоспецифічна особливість. Проте, амплікони розміром 640-670 пн були притаманні коням арабської породи за 6 праймерами на відміну наявності спектрів продуктів ампліфікації у інших протестованих коней, де їх кількість становила 1-2 фрагменти. 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.fergus*. А для коней арабської породи – це породоспецифічна особливість. Проте, амплікони розміром 640-670 пн були притаманні коням арабської породи за 6 праймерами на відміну наявності спектрів продуктів ампліфікації у інших протестованих коней, де їх кількість становила 1-2 фрагменти. У коней гуцульської породи локуси розміром 640-670 пн. були відсутні, що також можна вважати породоспецифічною особливістю.

Спектри продуктів ампліфікації розміром 680-710 п. н. за 7 праймерами (праймер (GA)₉C відсутній) були притаманні коням породи коник польський, що можна віднести до породоспецифічних фрагментів. Амплікони ДНК цих розмірів, одержані із викопних решток справжнього тарпана і давнього свійського коня проявилися за 3 праймерами, у плейстоценового коня – за 1 праймером, а в коней арабської та гуцульської порід за 2 праймерами. Отже, фрагменти розміром 680-710 пн є породоспецифічними для досліджених порід.

У результаті проведеної роботи встановлено, амплікони молекули ДНК розміром 340-350 п. н. праймера (GA)₉C та 470-490 п. н. праймерів (GA)₉C і (GA)₆CC визначено лише у викопних решток плейстоценового коня, справжнього тарпана і давнього свійського коня. На нашу думку, це свідчить про втрату алельної різноманітності у сучасних коней через їх одомашнення. Майже всі сучасні домашні породи коней мають однаковий або дуже схожий породний ISSR-профіль.

Для відображення генетичних зв'язків між дослідженими кінями та викопними рештками древніх еквід, розраховували попарні генетичні відстані (Nei, 1978) [323-326, 334-336], на основі наявності ампліконів ДНК відповідної довжини (пн) за (GA)₉C, (AG)₉C, (AG)₈CA, (AG)₈CG, (GA)₆CC та (ACC)₆G, одержаних методом ISSR-PCR (таблиці 5.12). Аналізували лише

ДНК-спектри міжмікросателітних повторів, частота яких дорівнювала 1,0. (рис. 5.26).

Таблиця 5.12

Генетичні відстані (Nei, 1978) між кінями порід гуцульської, арабської, коника польського та викопними рештками плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня на основі даних за $(GA)_9C$ -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 $(GA)_9C$ праймером виявлені між викопними кістками древніх коней – справжній тарпан та давній свійський кінь $D_N=0,0459$; кінями гуцульської породи та викопними рештками плейстоценового коня $D_N=0,0688$; кінями гуцульської та арабської порід $D_N=0,0955$. Найбільшу генетичну відстань за праймера $(GA)_9C$ встановлено між гуцульськими кінями та справжнім тарпаном $D_N=0,3256$; кінями гуцульської породи та давнім свійським конем $D_N=0,2730$.

З отриманих даних побудована дендрограма, яка відображає генетичні зв'язки протестованих коней та викопних решток древніх еквід на основі розподілу довжин фрагментів (пн), фланкованих інвертованими повторами (GA)₉C (рис. 5.27).

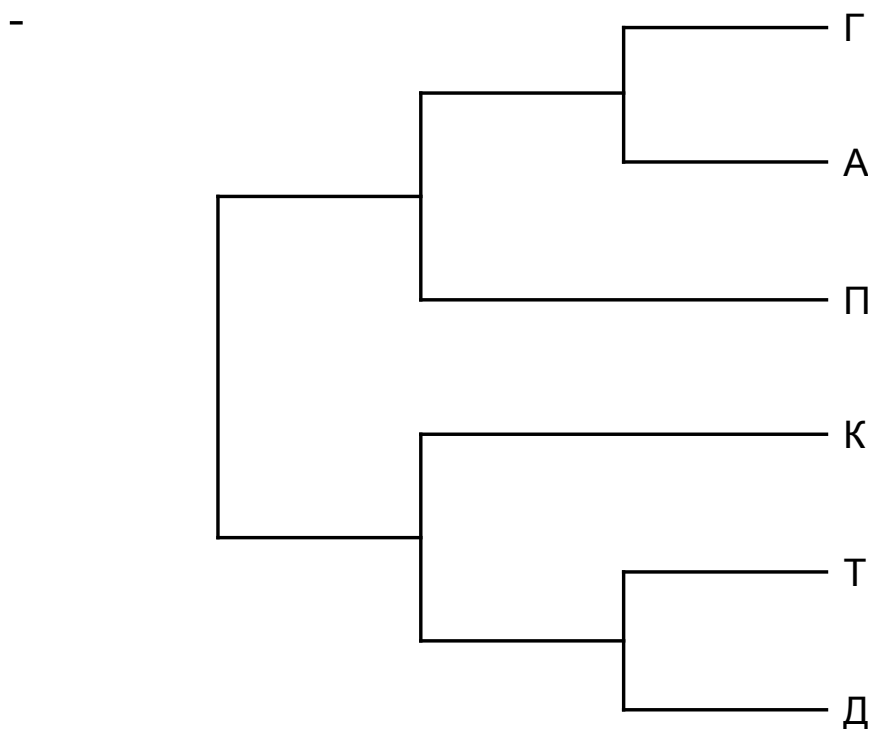


Рис. 5.27. Дендрограма філогенетичних зв'язків, на основі генетичних дистанцій протестованих коней та спектрів молекули ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня за праймером (GA)₉C. Г- гуцульські коні; П- плейстоценовий кінь; А – коні арабської породи; К– коні породи коник польський; Т – справжній тарпан; Д – давній свійський кінь

На дендрограмі (Рис. 5.27) виділилися два кластери. Перший кластер складався з двох підкластерів і відображав генетичний зв'язок між кінями гуцульської, арабської порід та викопними рештками плейстоценового коня. Другий кластер показав генетичні дистанції між ампліконами ДНК викопних

решток справжніх тарпанів, давнього свійського коня та коней породи коник польський.

В спектрах продуктів ампліфікації, фланкованих інвертованими повторами (AG)₉C, попарні генетичні відстані між кінями досліджуваних порід та викопними рештками плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня відображені в таблиці 5.13.

Таблиця 5.13

Генетична відстань (Nei, 1978) між кінями порід гуцульської, арабської, коника польського та викопними рештками плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня на основі даних за (AG)₉C-маркером

Вид / порода	Гуцульська	Коник польський	Арабська	Плейстоце новий кінь	Справжній тарпан	Давній св.кінь
Гуцульська	****					
Коник польський	0,2600	****				
Арабська	0,2600	0,0890	****			
Плейстоценовий кінь	0,2600	0,0563	0,0890	****		
Справжній тарпан	0,2600	0,0301	0,0890	0,0301	****	
Давній св. кінь	0,2600	0,0331	0,5603	0,0332	0,0332	****

Одержані результати показали, що найбільш близькі генетичні відстані за використанням (AG)₉C-ISSR аналізу спостерігалися у коней породи коник польський та викопними рештками справжнього тарпана $D_N=0,0301$; між древніми еквідами – плейстоценовий кінь і справжній тарпан $D_N=0,0301$.

Найбільш генетично віддалені коні гуцульської породи, порівняно з іншими дослідженими еквідами. Генетичні відстані становили $D_N=1,2600$.

Генетичні відстані за аналізом досліджуваних об'єктів, були візуалізовані на дендрограмі (Рис. 5.28), побудованій на основі розрахунку індивідуальних генетичних дистанцій та спектрів ДНК відповідної довжини (пн).

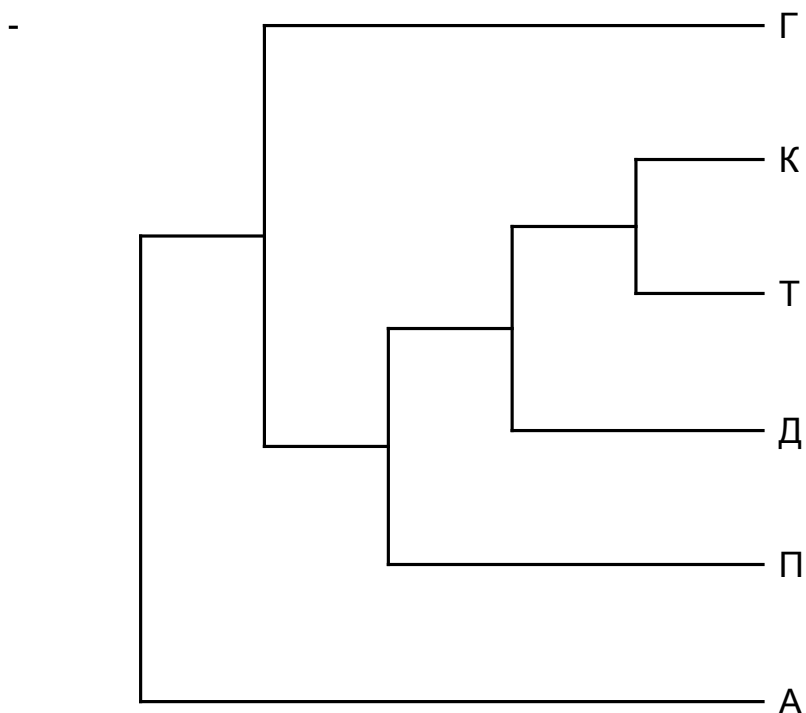


Рис. 5.28 Дендрограма генетичних зв'язків, на основі генетичних дистанцій протестованих коней та спектрів молекули ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня за праймером $(AG)_9C$. Г– гуцульські коні; П- плейстоценовий кінь; А – коні арабської породи; К – коні породи коник польський; Т – справжній тарпан; Д – давній свійський кінь.

На дендрограмі (рис.5.28) за даними ISSR аналізу, досліджені групи коней та викопні рештки древніх еквід розбилися на два кластери. До першого кластеру віднесли коні арабської породи. Другий кластер поділився ще на два підкластери: гуцульські коні та коник польський, тарпан,

давній свійський кінь і плейстоценовий кінь. Найближчу групу спорідненості ампліконів (AG)₉C праймера створили коні породи коник польський та викопні рештки справжнього тарпана.

Попарні генетичні відстані (Nei, 1978) між досліджуваними об'єктами на основі даних за (AG)₈CA маркером показано в таблиці 5.14.

Таблиця 5.14

Генетичні відстані між кіньми порід гуцульської, арабської, коника польського та викопними рештками плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня на основі даних за (AG)₈CA маркером

Вид / порода	Гуцульська	Коник польський	Арабська	Плейстоце новий кінь	Справжній тарпан	Давній св. кінь
Гуцульська	****					
Коник польський	0,2600	****				
Арабська	0,0332	0,0417	****			
Плейстоце новий кінь	0,0332	0,0891	0,0165	****		
Справжній тарпан	0,0873	0,0891	0,0165	0,0165	****	
Давній свійський кінь	0,0873	0,0891	0,0165	0,0165	00,0000	****

Проведені дослідження показали, що найменші генетичні відстані за ISSR аналізом спостерігалися у коней арабської породи та плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня $D_N = 0,0165$. Різниці в генетичних відстанях справжнього тарпана і давнього свійського коня не спостерігалось $D_N = 0,0000$. Найбільш віддалені за (AG)₈CA коні породи коник польський та гуцульська порода коней $D_N = 1,2600$. За допомогою програм Tree ViewX Version 0.5.0 та Phylip-3.698 була побудована дендрограма генетичної подібності (Рис. 5.29) досліджуваних об'єктів, на основі даних довжин ампліконів (пн) (AG)₈CA праймера.

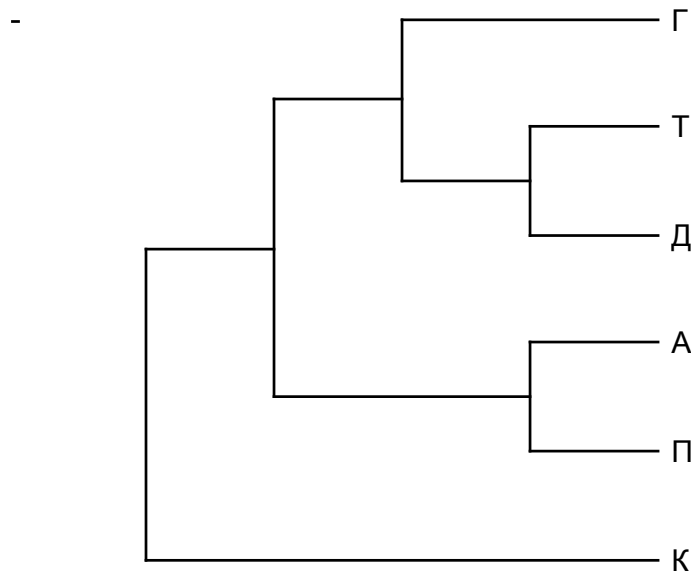


Рис. 5.29 Дендрограма генетичних зв'язків, на основі генетичних дистанцій протестованих коней та спектрів молекули ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня за праймером $(AG)_8CA$. Г– гуцульські коні; П- плейстоценовий кінь; А – коні арабської породи; К – коні породи коник польський; Т – справжній тарпан; Д – давній свійський кінь.

Побудована на основі порівняння ампліконів різної довжини (пн) в спектрах праймера $(AG)_8CA$ дендрограма (Рис. 5.29) розділилася на два кластери. Перший кластер об'єднував коней породи коник польський. Другий – поєднував три підкластери у які увійшли коні гуцульської породи, викопні кістки справжнього тарпана та давнього свійського коня, кістки плейстоценового коня та коні арабської породи. Найменша генетична відстань за довжиною ампліконів (пн) в спектрах продуктів ампліфікації праймера $(AG)_8CA$ відображена на цій схемі між древніми еквідами: справжній тарпан та давній свійський кінь; плейстоценовим конем та кіньми арабської породи.

На основі генетичних відстаней (пн) в спектрах ампліфікації (AG)₈CG-ISSR аналізу були встановлені генеалогічні зв'язки між досліджуваними породами коней та викопними рештками древніх еквід (Табл. 5.15).

Таблиця 5.15

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 (AG)₈CG-маркером

Вид / порода	Гуцульська	Коник польський	Арабська	Плейстоце новий кінь	Справжній тарпан	Давній св. кінь
Гуцульська	****					
Коник польський	0,0285	****				
Арабська	0,0416	0,0743	****			
Плейстоце новий кінь	0,0462	0,0468	0,0687	****		
Справжній тарпан	0,0687	0,1252	0,0416	0,0687	****	
Давній свійський кінь	0,0456	0,0493	0,0456	0,0456	0,0313	****

Проведені розрахунки показали, що найменша генетична відстань за розміром ампліконів ДНК, фланкованих інвертованими повторами (AG)₈CG, спостерігалася між породами коней гуцульська та коник польський $D_N=0,0285$. Найбільш віддалені генетичні відстані встановлено між кіньми породи коник польський та викопними рештками справжнього тарпана $D_N=0,1252$.

Дендрограма (Рис. 5.30), побудована на основі розрахунку індивідуальних генетичних відстаней за аналізом довжин ампліконів праймера (AG)₈CG.

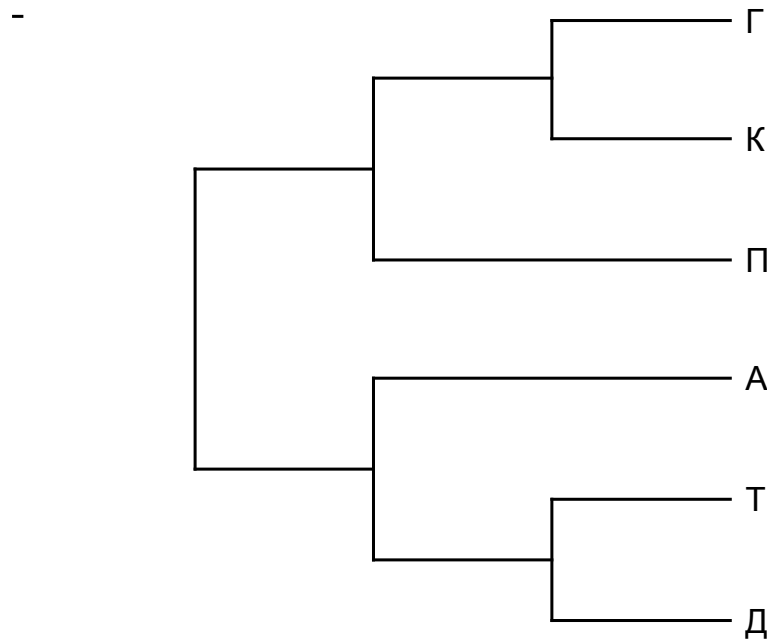


Рис. 5.30 Дендрограма генетичних зв'язків, побудована на основі генетичних дистанцій протестованих коней та спектрів молекули ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня за праймером $(AG)_8CG$. Г – гуцульські коні; П – плейстоценовий кінь; А – коні арабської породи; К – коні породи коник польський; Т – справжній тарпан; Д – давній свійський кінь.

На дендрограмі (Рис.5.30) показано два кластери, кожен з яких поділяється ще на два підкластери. До першого кластеру відносяться коні породи коник польський, гуцульські коні та викопні рештки плейстоценового коня. За генетичними відстанями (кількість пн) коні породи коник польський та гуцульські коні найближче розміщені між собою.

Другий кластер об'єднує викопні рештки кісток давнього свійського коня та справжнього тарпана, а також коней арабської породи. Спектри ампліконів молекули ДНК цього праймера за кількістю пн у другому кластері найближчі між древніми еквідами давнього свійського коня та справжнього тарпана.

На основі спектрів продуктів ампліфікації, одержаних при застосуванні в ПЛР в якості праймерів фрагменти мікросателітів $(GA)_6CC$

були визначені попарні генетичні відстані за кількістю (пн) у протестованих коней та давніх викопних рештках (Табл. 5.16).

Таблиця 5.16

Генетична відстань (пн) (Nei, 1978) між кіньми порід гуцульської, арабської, коника польського та викопними рештками плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня на основі даних (GA)₆CC-ISSR аналізу

Вид / порода	Гуцульська	Коник польський	Арабська	Плейстоце новий кінь	Справжній тарпан	Давній св. кінь
Гуцульська	****					
Коник польський	0,0236	****				
Арабська	0,1362	0,0890	****			
Плейстоце новий кінь	0,0687	0,0468	0,0725	****		
Справжній тарпан	0,0331	0,0375	0,0795	0,0236	****	
Давній свійський кінь	0,0687	0,0468	0,0725	0,0000	0,0236	****

Аналізуючи одержані результати, виявили, що найменша генетична відстань за величиною ампліконів (пн) в полімеразній ланцюговій реакції ділянок міжмікросателітних повторів з коровим мотивом (GA)₆CC була характерна для викопних кісток справжнього тарпана та давнього свійського коня; коней гуцульської породи та коника польського $D_N=0,0236$. Генетична відстань за спектрами ампліфікації ДНК за праймером (GA)₆CC у викопних решток плейстоценового коня та давнього свійського коня не проявилася $D_N=0,0000$. Найбільші генетичні дистанції спостерігалися між кіньми гуцульської та арабської породи $D_N=0,1362$. Візуалізація генетичних відстаней, побудованих на основі розрахунку довжин ампліконів показана на Рис. 5.31.

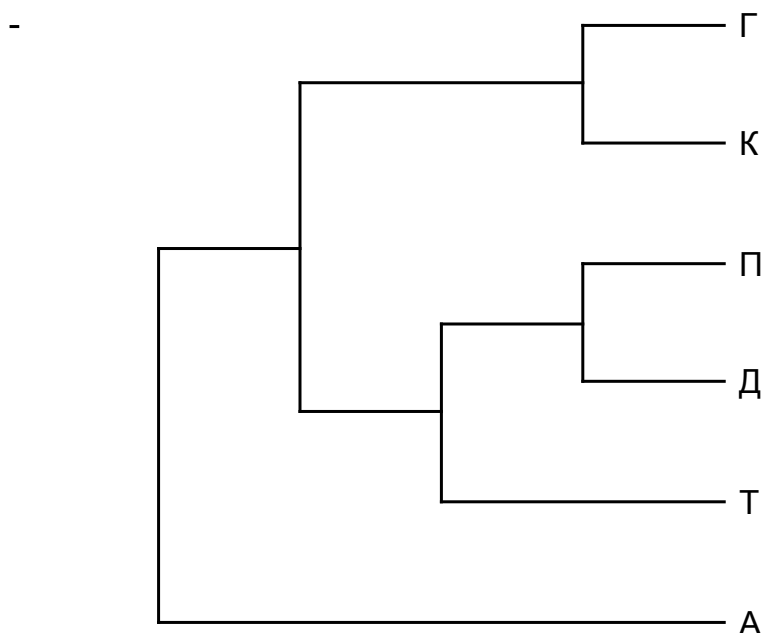


Рис. 5.31 Дендрограма генетичних зв'язків, побудована на основі генетичних дистанцій протестованих коней та спектрів ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня за праймером (GA)₆CC. Г – гуцульські коні; П – плейстоценовий кінь; А – коні арабської породи; К – коні породи коник польський; Т – справжній тарпан; Д – давній свійський кінь.

На дендрограмі (Рис.5.31) виявлено два кластери. Перший кластер становили найбільш генетично віддалені за спектром продуктів ампліфікації коні арабської породи. Другий кластер утворював два підкластери: 1 підкластер – коні порід гуцульської та коника польського; 2 підкластер – викопні рештки плейстоценового та давнього свійського коня, а також справжнього тарпана.

Генетичні відстані за (ACC)₆G маркером – ISSR аналізу, вираховані між досліджуваними породами коней та викопними рештками древніх еквід надано в таблиці 5.17.

Таблиця 5.17

Генетичні відстані (пн) (Nei, 1978) між кіньми порід гуцульської, арабської, коника польського та викопними рештками плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня на основі даних за (ACC)₆G маркером

Вид / порода	Гуцульська	Коник польський	Арабська	Плейстоце новий кінь	Справжній тарпан	Давній св. кінь
Гуцульська	***					
Коник польський	0,0000	***				
Арабська	0,2600	0,2600	***			
Плейстоце новий кінь	0,0976	0,0976	0,0743	***		
Справжній тарпан	0,2600	0,2600	0,0236	0,0416	***	
Давній свійський кінь	0,2600	0,2600	0,0301	0,0285	0,0066	***

За проведеними розрахунками встановлено, що при попарному порівнянні досліджуваних об'єктів, найбільш близькими за розміром ампліконів (пн) ДНК, фланкованих інвертованими повторами (ACC)₆G викопні рештки справжнього тарпана та давнього свійського коня $D_N=0,0066$; коні арабської породи та давні кістки справжнього тарпана $D_N=0,0236$. Генетичні відстані між кіньми гуцульської породи та кіньми коник польський за цим праймером дорівнювали $D_N=0,0000$. Найбільш віддалені за значенням генетичних дистанцій є коні гуцульської та коник польський порід із кіньми арабської породи та викопними рештками справжнього тарпана і давнього свійського коня $D_N=1,2600$. Одержані дані, схематично представлені на дендрограмі (Рис. 5.32).

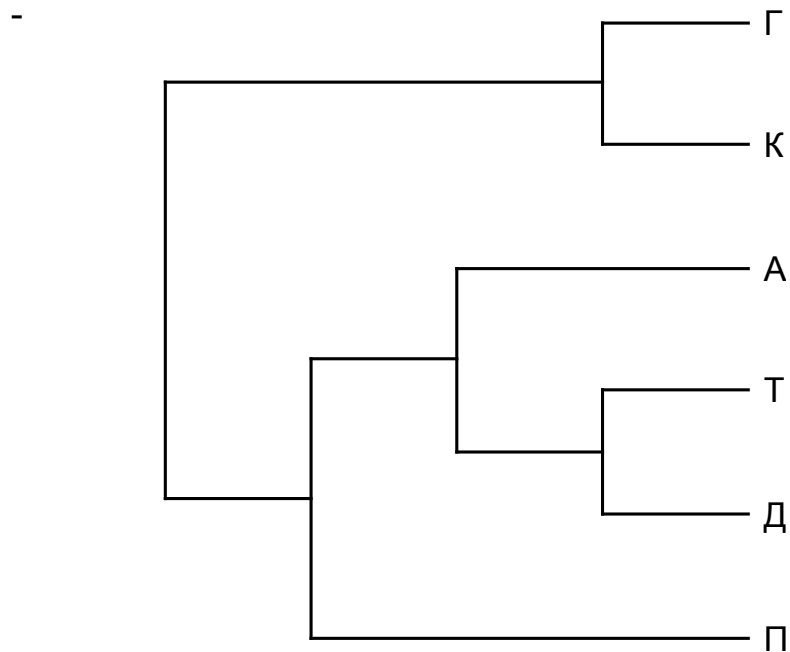


Рис. 5.32 Дендрограма генетичних зв'язків, побудована на основі генетичних дистанцій протестованих коней та спектрів ДНК викопних кісток плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня за праймером (ACC)₆G. Г – гуцульські коні; П – плейстоценовий кінь; А – коні арабської породи; К – коні породи коник польський; Т – справжній тарпан; Д – давній свійський кінь.

На одержаній дендрограмі виділялось два кластери. У перший кластер попали коні гуцульської породи та коника польського. Різниці між генетичними відстанями у цих двох порід коней не спостерігалось. Другий кластер складався з трьох підкластерів: 1 підкластер – коні арабської породи; 2 підкластер – викопні рештки тарпана і давнього свійського коня; 3 підкластер – викопні кістки плейстоценового коня.

За результатами проведених досліджень визначено усереднені відстані даних ISSR-PCR маркерів для різних дослідних об'єктів табл. 5.18.

Таблиця 5.18

Генетичні відстані (Nei, 1978) між кінями гуцульської, арабської, коника польського порід та викопними кістками плейстоценового коня, справжнього тарпана, давнього свійського коня за використанням

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	***			
Плейстоценовий 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	***

методу усереднених відстаней на основі даних ISSR-аналізу

За результатами розрахунків встановлено, що при попарному порівнянні генетичних відстаней протестованих коней та викопних решток древніх еквід найбільш близькими один до одного були викопні рештки справжнього тарпана та давнього свійського коня $D_N = 0,0234$, а також плейстоценового коня і давнього свійського коня $D_N = 0,0385$. При попарному порівнянні генетичних відстаней, найбільш віддаленими між собою виявилися коні гуцульської та арабської порід $D_N = 0,5334$; гуцульської породи та коника польського $D_N = 0,4477$; коней гуцульської породи та викопних решток справжнього тарпана $D_N = 0,5057$.

Оскільки, коні породи коник польський фенотипово собою нагадують диких коней тарпанів нами був окремо проведений аналіз полілокусного генотипування цих коней та викопних решток плейстоценового коня і справжнього тарпана із використанням маркерів $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$ та $(ACC)_6G$. (рис.5.29).

Результати досліджень, наведені на рис. 5.33.

Фрагменти	Довжина Фрагментів (пн)	Коник польський	Плейстоценовий кінь	Справжній тарпан
A 6	1550-1500			
A 8	1350-1300			
A 9	1290-1240			
A 12	1110-1060			
A 13	1050-1000			
A 15	930-880			
A 16	870-820			
A 17	810-760			
A 18	750-720			
A 19	710-680			
A 20	670-640			
A 21	630-600			
A 22	590-560			
A 23	550-530			
A 24	520-500			
A 25	490-470			
A 26	460-440			
A 27	430-410			
A 28	400-380			
A 29	370-360			
A 30	350-340			
A 31	330-320			
A 32	310-300			
A 34	270-260			

Рис. 5.33 Аналіз полілокусного генотипування коней породи коник та викопних решток плейстоценового коня і справжнього тарпана із використанням ISSR-PCR маркерів

Для дослідження філогенетичних зв'язків між кіньми породи коник польський та давніми еквідами (плейстоценовий кінь та справжній тарпан) був побудований «протогенофонд» □ спектр продуктів ампліфікації ДНК

найбільш древньої групи коней. Згідно принципу популяційних систем, внаслідок реципрокному балансу факторів еволюції в ряді поколінь зберігається генетична характеристика предкової популяції, тобто генетичне різноманіття сучасних популяцій відповідає деякій предковій «прапопуляції», генофонд якої можна умовно назвати «протогенофондом» [327-330] . Спектри продуктів ампліфікації молекули ДНК викопних кісток плейстоценового коня і справжнього тарпана, одержаних за допомогою праймерів $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$ та $(ACC)_6G$ відображено на рис. 5.34- 5.36.

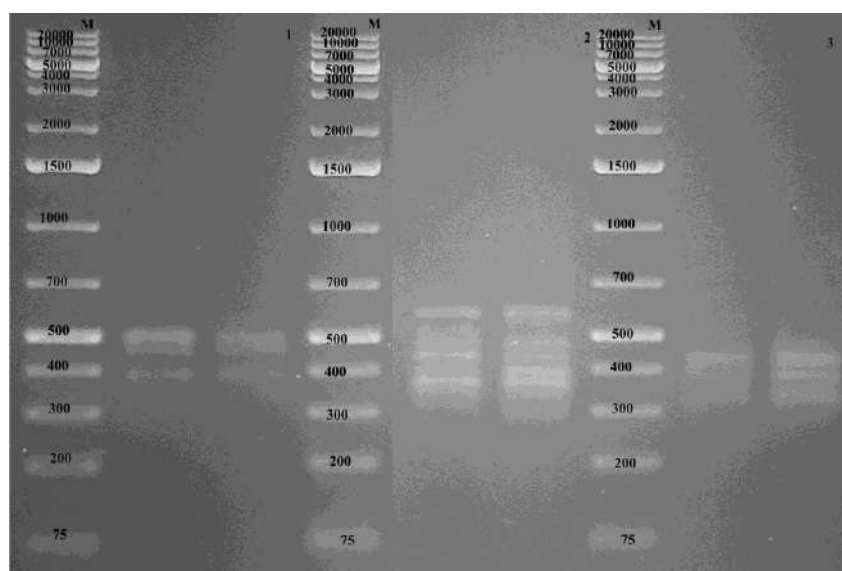


Рис. 5.34 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК викопних кісток плейстоценового коня з праймерами: 1- $(GA)_9C$; 2- $(GAG)_6C$; 3- $(AG)_9C$. Розміри отриманих продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркеру молекулярних мас .

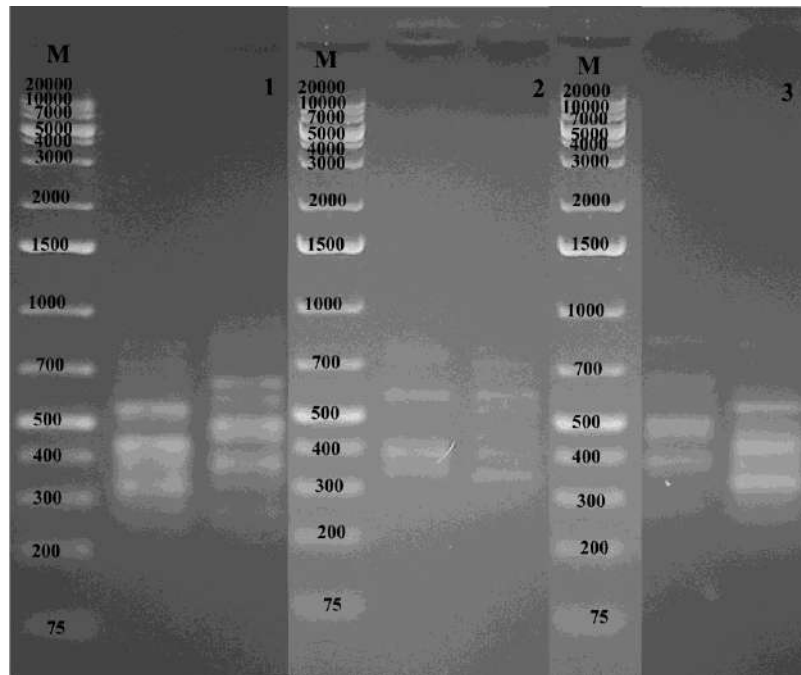


Рис.5.35 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК викопних кісток справжнього тарпана з праймерами: 1- $(GA)_9C$; 2 - $(GAG)_6C$; 3 - $(AG)_9C$.

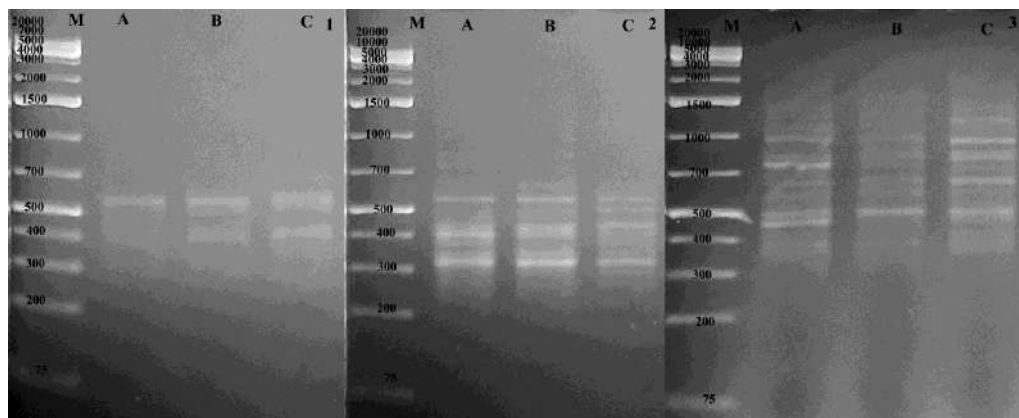


Рис. 5.36 Спектри фрагментів ампліфікації ДНК викопних кісток плейстоценового коня та справжнього тарпана з праймерами: 1 – $(AG)_8CA$; 2 – $(AG)_8CG$; 3 – $(GA)_6CC$. А, В – плейстоценовий кінь; С – справжній тарпан

На основі даних про наявність ампліконів ДНК відповідної довжини коней породи коник-польський та ДНК кісток плейстоценового коня та справжнього тарпана були визначені генетичні дистанції (табл.5.18) та побудована дендрограма (Рис.5.37).

Таблиця 5.18

Генетична відстань (Nei, 1978) між кіньми породи коник польський та викопними рештками плейстоценового коня і справжнього тарпана за використанням методу усереднених відстаней даних ISSR-PCR маркерів

Види	Коні породи коник польський	Справжній тарпан	Плейстоценовий кінь
Коні породи коник польський	****		
Справжній тарпан	0,0845±0,0220	****	
Плейстоценовий кінь	0,0881±0,0240	0,0554±0,0253	****

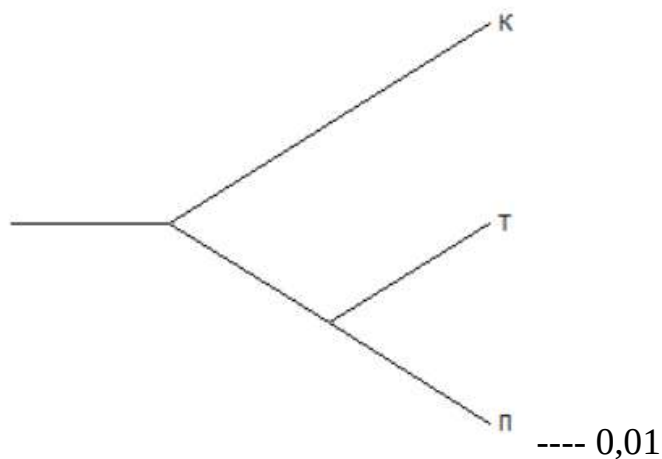


Рис. 5.37. Дендрограма генетичних відстаней на основі методу усереднених даних між кінськими породи коник польський та викопними рештками плейстоценового коня і справжнього тарпана за використанням (GA)₉C, (AG)₉C, (AG)₈CA, (AG)₈CG, (GA)₆CC та (ACC)₆G праймерів

Примітка: К- коні породи коник польський; Т – справжній тарпан; П – плейстоценовий кінь. Масштаб показує генетичну відстань (Nei, 1978).

Одержані результати показали, що генетична відстань (18) (Nei, 1978) за даними використаних ISSR-PCR маркерів між кіньми породи коник польський і викопними рештками плейстоценового коня становила $D_N = 0,0881$, а між рештками справжнього тарпана дорівнювала $D_N = 0,0845$. Різниця середніх величин була статистично недостовірною, що свідчить про наявність поліфілогенетичних зв'язків сучасних коней з древніми еквідами. За результатами досліджень найменша генетична відстань спостерігалася між справжнім тарпаном та плейстоценовим конем і становила $D_N = 0,0554$.

Загалом, міжвидові взаємовідносини, що були оцінені за розподілом довжин ампліконів в спектрах відповідають таксономічним взаємовідносинам між видами за морфологічними та палеонтологічними даними.

Таким чином, одержані дані, свідчать про те, що генофонди нині існуючих аборигенних порід *Ungulata* мають подібний генетичний профіль за ISSR-маркерами і чітко спостерігається тенденція щодо елімінації частини коротких міжлокусних фрагментів з їх геному у порівнянні з древніми формами під впливом еволюційних подій.

Висновки до розділу 5

1. Встановлено, що фрагменти розміром 380-400 пн та 500-520 пн, фланковані інвертованими повторами локусів $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$, $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$, $(CTC)_6C$ є характерними для виду *E. ferus*.

2. Виявлено найбільший поліморфізм локусів за використанням маркерів $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$, та $(ACC)_6G$ - у коней гуцульської породи ($P=0,494$), найменший ($P=0,172$) - у коней арабської породи та проміжну величину поліморфізму ($P=0,224$) - у коней породи коник польський.

3. Встановлено породоспецифічні патерні за маркерами $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$, $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$ та $(CTC)_6C$ для коней порід гуцульської, коника польського та арабської. Кількість унікальних ДНК-фрагментів для коней гуцульської породи становила 6, для коней породи коник польський – 7, для коней арабської породи – 9.

4. Для давніх еквід встановлено наявність унікальних ампліконів розміром 340-350 пн для маркеру $(GA)_9C$; 470-490 пн для маркеру $(GA)_9C$ та $(GA)_6CC$.

5. Визначено, що за використанням методу усереднених відстаней за результатами ISSR-аналізу найбільш близькими один до одного були викопні рештки справжнього тарпана та давнього свійського коня $D_N = 0,0234$; плейстоценового коня і давнього свійського коня $D_N = 0,0385$. Найбільш віддаленими між собою виявилися досліджені коні гуцульської та арабської порід $D_N = 0,5334$; гуцульської породи та коника польського $D_N = 0,4477$; коні гуцульської породи та викопні рештки справжнього тарпана $D_N = 0,5057$.

6. Встановлено, що генетичні відстані за сукупністю ISSR-маркерів для коней породи коник польський і викопними рештками плейстоценового коня становили $D_N = 0,0881$, а між рештками справжнього тарпана - $D_N = 0,0845$.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведені в таких публікаціях:

1. Мохначова Н., Стародуб Л., Добрянська М. Оптимізація методу виділення ДНК з викопних решток. *Розведення і генетика тварин*. Київ. 2020. Вип. 60. С. 110-115.

Методичні рекомендації.

2 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 отримано експериментальні дані та здійснено їх аналіз).

3. 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).

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У результаті проведеної роботи розкрито формування генофонду аборигенних порід великої рогатої худоби та коней під впливом паратипових та генотипових факторів на хромосомному рівні, поліморфізмі ДНК, історії походження та розвитку, еволюційних процесах.

У природних популяціях вектор добору спрямований на максимальну пристосованість тварин до умов середовища, а за розведення сільськогосподарських тварин селекціонери зорієнтовані на потреби ринку, які часто не враховують процесів, які відбуваються у природних популяціях.

У деяких країнах Європи та Близького Сходу (Чехії, Ізраїлі і т.д.) обходяться розведенням 2-3-х кращих порід світової селекції для кожного виду сільськогосподарських тварин. Проте така позиція загрожує катастрофічними наслідками. Україна займає великі території з багатьма агроекологічними зонами. На цих зонах необхідно розводити домашніх тварин, адаптованих до місцевих умов, здатних приносити в цих умовах якісну та унікальну продукцію. Отже, для України необхідні як вузькоспеціалізовані, так і багатофункціональні породи. Приоритетними об'єктами в агробіоценозах повинні стати локальні породи сільськогосподарських тварин і сорти культурних тварин.

Коли генофонд породи тривало розводиться у певній місцевості, він являє собою природний скарб, не менш цінний ніж запаси вугілля, нафти, золота і т.д. [166]. Створення ряду нових порід сільськогосподарських тварин в Україні супроводжується зменшенням поголів'я вітчизняних локальних порід, які характеризуються високою резистентністю, невибагливістю до корму та умов утримання, міцністю конституції, тривалістю продуктивного використання, оптимальною відтворювальною здатністю, якістю продукції.

Значний вклад у збереження генофонду місцевих сільськогосподарських тварин на початку минулого століття вніс М. Ф.

Іванов [339]. На його думку, збереження та розвиток місцевої худоби полягало не тільки в її удосконаленні на основі поліпшення методів годівлі та утримання, а й у її реконструкції, шляхом складного відтворного схрещування з більш продуктивними породами зарубіжної селекції. М. Ф. Івановим розроблено метод дослідження стад тварин та принципи районування порід. Вчений вважав, що в країні з різними умовами природного середовища не можна обмежуватися розведенням однієї універсальної породи. Для кожного району, з його кліматичними, ґрунтовими, кормовими та господарськими умовами необхідно створювати свої породи, найбільш пристосовані до даної місцевості. [339]. На думку Ф.Ф. Ейснера, селекційну роботу з локальними породами доцільно спрямовувати на збереження специфічних для кожної із них ознак та особливостей. Зниження адаптаційних можливостей тварин сільськогосподарських порід є розплатою за спрямованість селекційного добору тварин переважно за ознаками продуктивності. На думку Петухова В. Л., [337, 338, 341] після досягнення певного рівня продуктивності, селекційними ознаками у тварин будуть: резистентність до хвороб, стійкість до стресів та екологічно несприятливих факторів.

Добір генетичного матеріалу, призначеного задля зберігання, здійснюється за результатами селекційно-генетичного моніторингу. Моніторинг генофонду передбачає : проведення популяційного аналізу на основі зоотехнічної та ветеринарної інформації з визначенням потенціалу продуктивності, резистентності, адаптованості, вивченням параметрів онтогенезу, комплексним застосуванням генетичних тестів.

Для розведення і підтримки « в чистоті» аборигенних порід необхідні знання про структуру їх генофондів. Найбільш інформативними в усьому світі рахуються методи, засновані на аналізі поліморфізму ДНК. Найбільш пріоритетним, на сьогодні, є метод мікросателітного аналізу ДНК. Мікросателіти відносяться до диспергованих тандемно повторюючих ди. Три, та тетра-нуклеотидних повторів. Загальний розмір області, яка

повторюється складає не більше як 100 п.н. Ці маркери відомі під декількома назвами: мікросателіти, STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site), STR (short tandem repeat), SSR (simple sequence repeat). Використовуючи метод мікросателітного аналізу, можна визначити з 95 % -вою вірогідністю до якої породи відноситься кінь. Контроль родоходів коней, великої рогатої худоби, свиней і собак за панеллю локусів мікросателітних ДНК, стандартизовані порівняльними тестами при сприянні Міжнародної Співки Генетики Тварин (the International Society for Animal Genetics, ISAG) , ввійшов у загальноприйнятту практику у багатьох країнах.

Генетична специфічність на хромосомному рівні встановлюється шляхом каріотипування і цитогенетичного контролю, виявлення рецесивних генів на основі ДНК-технологій, аналізу родоходів, виявлення дефектів, генетичної обумовленості шляхів поширення.

Генетичним тестуванням передбачається здійснення контролю походження за генетичними маркерами, генетичного аналізу генофондових стад.

У якості об'єктів досліджень аборигенних порід великої рогатої худоби були обрані білоголова українська, бура карпатська, сіра українська та червона польська породи; аборигенні породи коней – гуцульська порода; малочисельні – коні породи коник польський. Оскільки, метою нашої роботи було теоретичне обґрунтування та розробка методичних підходів комплексного застосування молекулярно-генетичного і цитогенетичного методів у системі аналізу впливу різних факторів на формування генофондів аборигенних порід свійських тварин, нами були проведені дослідження мінливості каріотипу, враховуючи дію різних паратипових та генотипових факторів. Використання показників цитогенетичної мінливості дає можливість виявляти темпи соматичного мутагенезу і з'ясовувати наявність факторів мутагенного впливу на організм, адаптацію організму до певних умов середовища, виявляти тварин носіїв конститутивних цитогенетичних

аномалій, з підвищеним рівнем хромосомної нестабільності як групу ризику, пов'язану з порушенням систем репарації.

Формування білоголової української породи пов'язане з колонією Голендри Вінницької області, яку в 1871 р. створили переселенці з Голландії та Німеччини. Ними була завезена худоба гронінгенського відріддя голландської, остфризької, вільстермаршської та інших порід. Схрещування місцевої худоби з цими породами і створило білоголову українську породу. [37]. Ця порода є унікальною. Для тварин характерна наявність своєрідних ознак – пристосування до умов Полісся з бідною кормовою базою [3]. Білоголова українська порода великої рогатої худоби відноситься до малочисельних зникаючих порід [4].

Для з'ясування адаптації тварин білоголової української породи до умов Полісся та наявності існування факторів мутагенного впливу невизначеної природи нами були проведені цитогенетичні дослідження. Каріотиповий аналіз показав наявність кількісних та структурних порушень у досліджуваних тварин. Кількісні порушення були представлені у вигляді анеуплоїдії, кратне ж збільшення хромосом – не проявилось. У цитогенетично проаналізованих тварин цієї породи було виявлено асинхронне розходження центромірних районів хромосом. Із структурних порушень, у досліджуваних корів білоголової української породи, були виявлені лише хромосомні розриви. Отже, дослідження хромосомної мінливості корів білоголової української породи показали, що спектр хромосомного поліморфізму кількісних порушень знаходився в межах 6%-7% і не перевищував спонтанний рівень (1,5-8,3%) цієї мінливості, характерний для тварин порід молочного напрямку продуктивності. Хромосомні аберації (хромосомні розриви) знаходилися в межах 2%-2,3% і відповідали спонтанній цитогенетичній мінливості, характерній для виду [169].

У літературних джерелах вказується наявність синдрому хромосом ХХУ у тварин фризької породи (Англія), наявність транслокації 2;24 (Англія

) і транслокації 3;27 (Румунія), а також тварин носіїв (Rb 1;29) фризської породи з частотою 0,7% в Італії [34] Хромосомні аномалії, у досліджуваних корів білоголової української породи, порівняно з тваринами фризської породи Англії, Румунії та Італії, які описані в літературних джерелах, не спостерігалися.

Одна із аборигенних порід □ Бура карпатська порода, яку розводять на Закарпатті, сформувалася у результаті відтворювального схрещування місцевої бурої худоби «рижки» і «мокань» із завізними культурними породами альпійського походження: горноінською, монтафонською, швіцькою і частково альгауською. Зараз з бурою карпатською худобою споріднені такі породи: лебединська, алатауська, костромська, бура кавказька.

Впродовж 2018-2019 років в Україні здійснювалось виконання проєкту TCP/RER/3604 «Збереження та розвиток порід великої рогатої худоби подвійного напрямку продуктивності в країнах Східної Європи», люб'язно наданого Всесвітньою продовольчою та сільськогосподарською організацією. Проєкт охоплював буру кавказьку породу Вірменії та Грузії і буру карпатську України.

Завданням проєкту в Україні було виявлення тварин, які фенотипово найбільш відповідають стандарту бурої карпатської породи, відбір від них генетичного матеріалу та опитування фермерів, власників даних корів, за запитаннями анкети, сформованої міжнародними експертами для висвітлення гендерної політики, рівня господарювання та стану тваринництва на Закарпатті. Виконанням даного завдання опікувалися співробітники Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН України під керівництвом Міністерства аграрної політики України.

Було здійснено роботи відповідно до робочого плану, визначеного договором: досліджено 265 голів дорослих особин великої рогатої худоби, фенотипово віднесених до бурої карпатської породи, серед яких 6 бугаїв-плідників парувального віку (1,5-2 роки). Кожну тварину сфотографовано,

оцінено лінійно-описові ознаки екстер'єру, взято за допомогою відповідних інструментів необхідні проміри тіла, визначено живу масу та конституційні особливості, а також відібрано зразки для генетичного тестування.

Цитогенетичний аналіз бурих порід, проведений у різних країнах, виявив такі результати: у Румунії при каріотиповому тестуванні бурої швіцької худоби були виявлені кількісні порушення статевих хромосом (X/60, XX/60, XY) (Качура, 1982) у корів бурої породи (Румунія) □ транслокація 5;23 та 11;21 [154], у корів швіцької породи (Швейцарія, Німеччина), та у тварин американської бурої швіцької породи □ встановлені центричні злиття за Робертсонівським типом 1;29 (106, 108, 95, 97). Цитогенетичний аналіз проведений нами, у корів бурої карпатської породи с. Нижні ворота, Воловецького р-ну Закарпатської області показав, що для досліджених корів

характерні кількісні порушення хромосом, анеуплоїдія, розмах якої становив $1,6 \square 3,3$ %. Величина структурних порушень (хромосомні розриви) дорівнювала 0,76 %. Кількісних порушень статевих хромосом, структурних аберацій хромосом (транслокацій 5;23 та 11;21), а також центричного злиття за Робертсонівським типом 1;29 у протестованих корів бурої карпатської породи виявлено не було.

До самих древніх порід великої рогатої худоби на території України відносять тварин сірої української породи. Багато авторів (Скворцов 1870, Пахомов 1910, Кулешов 1897, Лискун 1928, Зорін 1956, Іванов 1964) показують досить широкі географічні межі поширення в Європі сірої степової худоби. У Європі порода розводилась від Карпатських до Уральських гір, захоплюючи Україну в сучасних кордонах, прибережну смугу Чорноморського узбережжя, Кавказу, Іспанію та Португалію.

При цитогенетичному контролі сірої української худоби, проведеному рядом вчених (Качура В.С., Мелешко О.А., 1983; Шельов А.В., 2008; Дзіцюк В.В., 2009), виявлено поліплоїдію в межах 5,1-8,3 %, анеуплоїдію □ 22,7-27,3 %, структурні порушення у вигляді розривів хромосом □ 3,1-4,5 % та

парні фрагменти $\square$ 5,0-9,9 %. Знайдені хроматидні розриви, поодинокі фрагменти та кільця не перевищували 3,9 %. Спектр прояву клітин із між хромосомними асоціаціями за типом Робертсонівських транслокацій 1;29 становив від 1 до 77 %.

Цитогенетичні дослідження, здійснені нами на сірій українській породі показали, що за останні 10-25 років у каріотипі цих тварин спостерігається зменшення прояву хромосомної мінливості. Так, кількісні порушення хромосом, анеуплоїдія, становили 1,2 - 7,2 %, що у 3 рази менше, порівняно з результатами минулих експериментальних досліджень. Рівень кратного збільшення хромосом, поліплоїдія, не перевищувала 0,9 %, що у 5-8 разів менше раніше виявленої цієї мінливості. Кількість клітин із проявом Робертсонівської транслокації, у досліджених нами тварин, становила 3,3% і проявилася у сірої української худоби лише в господарстві ДП «ДГ» «Поливанівка» ІЗК НААН. Таким чином, за останні 25 років утримання тварин сірої української породи, відсоток тварин-носіїв Робертсонівських транслокацій зменшився.

До аборигенних порід великої рогатої худоби, вивчених нами, відносяться і тварини червоної польської породи. Польська червона худоба походить від дрібної дикої брахіцерійної (короткорогої) великої рогатої худоби, яка мешкала у Східній Центральній Європі та Скандинавії і є однією з небагатьох корінних європейських порід червоної худоби. Тварини цієї породи добре пристосовані до умов проживання у зоні Полісся.

У Польщі у 80-х роках минулого століття цитогенетичний контроль 451 бугая червоної польської породи, які знаходилися на станції штучного осіменіння в Польщі, виявив химеризм хромосомного набору 60, XX / 60, XY та випадки транслокації Робертсона 1;29. Випадки прояву Робертсонівської транслокації спостерігалися і в приватних господарствах жителів Польщі. В Україні такий контроль маточного поголів'я та плідників червоної польської породи протягом минулого століття не здійснювався.

Результати цитогенетичного аналізу корів червоної польської породи, проведеного нами, у тварин господарства ПрАТ «Мшанецьке» Тербовлянського р-ну Тернопільської обл. не виявили химеризму хромосомного набору 60, XX / 60, XY та випадків транслокації Робертсона 1;29. Хромосомний поліморфізм проявився у вигляді анеуплоїдії (8,2 %) та хромосомних розривів (5,1 %). Також дослідженнями проведеними нами, встановлено вплив інфікованості збудником туберкульозу на цитогенетичні показники у корів червоної польської породи. Відсоток анеуплоїдних клітин у тварин, вражених збудником туберкульозу, суттєво перевищував (у 3 рази) рівень спонтанної хромосомної мінливості за цією ознакою. Оскільки, хромосомний апарат великої рогатої худоби є одним із перших індикаторів генотоксичного впливу на організм, то проведення комплексного моніторингу реакції геному на дію генотоксичних факторів є досить актуальним. [340- 349].

Володіння інформацією про геномну нестабільність племінних тварин у ранньому віці дає змогу вести селекцію для швидкого поліпшення конкретних економічно важливих якостей. Дослідження впливу віку на спонтанну мінливість каріотипу великої рогатої худоби аборигенних порід було проведене на різних вікових групах тварин сірої української породи. За результатами досліджень встановлено, що у телиць 9-16 міс. кількісні порушення хромосом, анеуплоїдія, в 1,5 раза вища за спонтанний рівень хромосомної мінливості, що не спостерігалось у повновікових корів. Різниця середніх величин за цією ознакою у телиць та корів виявилася статистично достовірною ($P > 0,999$). Підтвердженням залежності каріотипової мінливості від віку тварин, є проведений однофакторний дисперсійний аналіз який вказує що частка впливу віку тварин на мінливість їх каріотипу (анеуплоїдію, АРЦРХ, хромосомні розриви) є достовірною. Одержані нами результати, не мають розбіжностей із дослідженнями інших вчених. Низкою дослідників встановлений вплив віку на спонтанну частоту і структуру хромосомних аберацій у лімфоцитах периферійної крові людини. Обстеження провели у

680 особин різного віку і статі. Середня частота аберацій у 94,0 % обстежених людей становила від 0 до 3,0 %. Частота хромосомних змін залежить від віку обстежуваних. У новонароджених середня частота хромосомних аберацій складала $1,69 \pm 0,13$ %. Серед однорічних дітей частота структурних порушень у 2,2 рази нижча, порівняно з новонародженими (0,76 %). У вікових групах від 1 року до 20 років встановлюється рівновага між частотою хромосомних аберацій і віком обстежених особин (частота становить $\approx 0,69$ %). В подальшому (після 20 років) спостерігається вже постійне збільшення частоти хромосомних аберацій, і до виповнення 80–90-річного віку частота хромосомних змін сягає 3 % [370]. Н. П. Бочков із співавторами також спостерігав більш високу частоту хромосомних аберацій у 90 – 95-річних і у новонароджених, порівнянно з особами у віці від 10 до 70 років [351-354]. У експериментальних тварин за останні роки отримана така ж характеристика вікових змін частоти хромосомних аберацій чи аберантних клітин. Дослідження проводили на різних видах тварин. Аберації визначалися не тільки у лімфоцитах периферійної крові, але в клітинах різних органів: кістковому мозку, епітелію рогівки ока, і інших тканинах [355]. Всі ці факти дозволяють передбачати, що встановлені особливості вікових змін частоти хромосомних аберацій є загальнофізіологічною закономірністю в крайньому випадку для ссавців.

Важливим аспектом цитогенетики є використання її як складника комплексної генетичної оцінки племінних тварин, особливо під час породотворчого процесу та породовипробування. Підсумок літературних даних впродовж останніх 10-ти років свідчить про мінливість великої рогатої худоби в середині породи за частотою цитогенетичних аномалій у клітинах крові. Прикладом слугує наявність частоти Rb –транслокацій серед тварин різних груп порід, до яких входять і досліджені нами аборигенні породи. Так Rb-транслокація (хромосом) – 26;29 з частотою 7,8% проявилася у тварин сірої альпійської породи; Rb-транслокація 1;29 з

частотою 3,8 % виявлено у тварин угорської сірої породи; Rb-транслокація 1;29 з частотою 3,3 % виявлено нами у досліджених тварин сірої української породи. Носіїв Rb-транслокація 1;29 виявлено у порід румунської бурої з частотою 0,8 та носіїв Rb-транслокація 5;23 та 11;21 з частотою 0,35 виявлено у тварин бурих порід. Дослідження, проведені нами, на великій рогатій худобі бурої карпатської породи цієї хромосомної мінливості не виявили[360-367]. Доказом сили впливу (η^2_x) породи на мінливість каріотипу, досліджуваних тварин порід білоголової української, червоної польської, бурої карпатської, сірої української та двох комерційних – української чорно-рябої молочної та української червоно-рябої молочної слугує проведений однофакторний аналіз, що вказує на високу та достовірну частку впливу на прояв таких цитогенетичних показників як анеуплоїдію, поліплоїдію, хромосомні розриви та робертсонівську транслокацію.

Порівняно з хромосомним аналізом лімфоцитів підрахунок МЯ більш простіший, дешевший, має більше шансів на автоматизацію і за чутливістю не поступається метафазному аналізу, що є перевагою мікроядерного тесту і відкриває перспективи для проведення популяційних досліджень з його використанням Мікроядра (МЯ) утворюються із хромосомного матеріалу, який залишився на стадії метафази. У ході мітозу цей матеріал потрапляє лише в одну з дочірніх клітин. Він може бути включений в склад основного ядра, або сформувати одне чи декілька дрібних ядер, що називаються мікроядрами. Мікроядра складаються, в основному, з ацентричних фрагментів, що було продемонстровано за допомогою виміру вмісту ДНК [70]. Вони також можуть бути утворені і цільною хромосомою у результаті нерозходження, викликаного дефектами веретена поділу. Такі великі МЯ утворюються під впливом речовин, що діють на веретено поділу [71]. Такий методичний хід, як використання мічених флюорохромами антитіл до кінетохору, дозволяє віддиференціювати мікроядра, які включають у себе ацентричні фрагменти (результат хромосомних аберацій) і цілі хромосоми, що затрималися на екваторі клітини у анафазі (результат змін взаємодії

хромосом з веретеном поділу). Порівняно з хромосомним аналізом лімфоцитів підрахунок МЯ більш простіший, дешевший, має більше шансів на автоматизацію і за чутливістю не поступається метафазному аналізу, що є перевагою мікроядерного тесту і відкриває перспективи для проведення популяційних досліджень з його використанням

Аналіз лімфоцитів тварин досліджуваних порід великої рогатої худоби, який проводили для виявлення закономірностей поліморфізму цитогенетичних показників периферійної крові, пов'язаних з породною приналежністю, віком та впливом генотоксичних факторів регіону показав, що частота клітин з мікроядрами була в межах спонтанного рівня (лім 1,00-3,67‰), характерного для ссавців і становила 1,1-4,9 ‰. Найбільша кількість клітин з мікроядром у протестованих тварин спостерігалася у корів білоголової української породи (4,1‰). Частота клітин, які ділилися (МІ) у тварин досліджуваних порід, знаходилася в межах 2,5-4,8 ‰, а ДЯ – 1,5-7,8 ‰. Коливання частоти мітотичного індексу були вужчі, ніж коливання частоти двоядерних лімфоцитів, що свідчить про відсутність прямої генотоксичної дії на організм. [356-359, 368]. Підвищена частка (більше ніж у 2 рази) двоядерних лімфоцитів (7,8 ‰,) характерна лише для корів української червоно-рябої молочної породи, як можливий вплив сірководню у воді, яку використовують для потреб господарства. Тварини червоної польської породи цього ж господарства виявилися стійкішими до дії даного паратипового чинника.

Встановлено, що частка апоптозних клітин (8,2‰), у корів червоної польської породи, вражених збудником туберкульозу, у 4 рази більша за спонтанний рівень цитогенетичної мінливості, а кількість двоядерних лімфоцитів вища у 2 рази. За даними Ильинских такі зміни в організмі тварин відбуваються при інфекційних процесах [373- 378]. Клітинний гомеостаз організму підтримується процесами клітинної проліферації та запрограмованої клітинної загибелі. В 1972 році J. Kerr із співавторами

запропонували термін «апоптоз» для означення процесів непатологічної смерті клітин [375].

За апоптозу основні деструктивні зміни відбуваються саме із ядром клітини. Спостерігається фрагментація хроматину, вакуолізація, деструкція ядерної мембрани. Проте, зберігається цілісність цитоплазматичної мембрани, що запобігає некротичним явищам і розвитку запальних процесів.

Апоптозу піддаються клітини, білкові рецептори мембран яких сприймають певні сигнали. Внутрішньоклітинна частина рецептора зв'язана із клітинними ферментами. За наявності індуктора апоптозу в клітині відбуваються зміни білкових регуляторів, що призводять до зміни кількості і функціональної активності внутрішньоклітинних молекул РНК. Активність ферментів родини каспаз забезпечує порушення цитоскелету клітини та активацію ДНК-ази.

Здатність клітини до апоптозу визначається співвідношенням інгібіторів і стимуляторів його протікання. Апоптоз – це активна форма реалізації програми захисту клітини, шляхом її самоутилізації за рахунок активації ферментативних процесів. Не останню роль в цьому відіграє ген p 53, що регулює експресію генів-блокаторів клітинного циклу [99].

Апоптозна елімінація клітин слугує важливим механізмом підтримки генетичної стабільності клітинних популяцій після впливу факторів різної природи [156].

Отже, наявність виражених цитогенетичних породоспецифічних відмінностей у великої рогатої худоби свідчить про те, що на їх прояв мають вплив генотоксичні фактори, а також особливості метаболізму ферментів та особливості їх генотипу, за яким і різняться породи [370- 372].

Дослідження генофонду автохтонних та малочисельних порід коней за цитогенетичними маркерами дало можливість встановити особливості поліморфізму їх генетичної структури. Відсутність чи низький рівень структурних порушень хромосом (1,1%) у протестованих коней аборигенної гуцульської породи та коней породи коник польський вказує на низький

рівень соматичного мутагенезу і свідчить про те, що проаналізовані тварини мають природну породоспецифічну високу антиоксидантну активність ферментів. Наші дані підтверджують результати досліджень інших вчених, щодо стабільності геному локальних порід [379-381].

Дослідження геномних порушень хромосом – анеуплоїдії та поліплоїдії, у коней гуцульської та коника польського порід також підтверджує наявність породоспецифічних особливостей. Так, середня величина анеуплоїдних клітин у коней гуцульської породи дорівнювала 10,8 %, а поліплоїдних – 1,4 %; у коней породи коник польський анеуплоїдні клітини становили 9,3 %, поліплоїдних клітин виявлено не було. В процесі каріотипування коней (Джус П., Стародуб Л., Куриленко Ю., Костенко С., 2013) порід української верхової, вагзової, російської рисистої, голштинської встановлено, що найвищий відсоток анеуплоїдних клітин (6,3 %) був характерний для коней української верхової породи порівняно з кінями Новоолександрівської вагзової породи (1,2 %). Таку думку підтверджують і дослідження проведені Дзіцюк В. В. на конях української верхової та вагзової порід (Дзіцюк, 2009). У коней гуцульської породи розмах асинхронного розходження центромірних районів хромосом, яке вважається передумовою втрат хромосом, становив (2,0% – 6,0%) при середньому значенні – 3,9%, що відповідає спонтанному рівню для коней в цілому. За літературними джерелами при дослідженні цієї мінливості у коней різних порід самим низьким рівнем клітин із АРЦРХ був рівень 0,25 % у рисистих коней, самий високий рівень – 7,36 % у протестованих коней Новоолександрівської вагзової породи. Проведені дослідження підтверджують наявність породоспецифічності прояву асинхронного розходження центромірних районів хромосом.

Частка лімфоцитів із мікроядром у периферійній крові коней гуцульської породи становила 4,0–4,2‰, двоядерних лімфоцитів – 6,2‰ та рівень клітин, що діляться (МІ) дорівнював 4,3‰. Одержані результати співпадають із дослідженнями проведеними Андрушкевич Г.С. та ін., 1994;

Костенко С.О. та ін., 2001 р. про те, що досліджувані тварини знаходилися в екологічно чистих умовах відносно рівня радіонуклідного забруднення і характеризувалися стабільністю каріотипу [382-384].

У дисертаційній роботі здійснено дослідження елементів впливу історії походження та розвитку на формування генофонду аборигенних порід під впливом природного та штучного добору, а також дослідження питань розведення та збереження гуцульських коней на українських землях протягом ХІХ-ХХІ ст. Гуцульські коні- це найстаріша українська порода, які отримали назву від українських горян. Гуцульських коней було виведено на території Східних або Лісистих Карпат в районі Гуцульщини і Буковини в верхній течії Черемоша, Прута, Путили і Молдави. До кінця не встановлено, яким є походження цієї породи. На думку багатьох вчених вони виникли як від примітивних коней таких як тарпан і кінь Пржевальського так і від благородних арабських, польських, турецьких, норицьких коней і загартаваних гірською природою дали існуючого гуцульського коня. Основний ареал поширення гуцульського коня це була територія українських Карпат. Отже, порода гуцульських коней формувалася у сім'ях українських гуцулів, а вже потім була вдосконалена австрійськими, польськими, румунськими конярами. Доказом цього є будівництво Державної Стаднини огирів (жеребців) у Судовій Вишні (містечко Мостиського району Львівської обл.) в 1907р. З кінця ХІХ- до початку ХХ ст. жеребців із Судової Вишні перевозили до пунктів розмноження. Тоді в Австрії їх називали «Кінські підстанції» в Коломиї, Львові, Косові, Станіславі Перемишлі, де розміщувалася австрійська кіннота, та підрозділи, де були коні для офіцерів у піхотних, артилерійських та саперних частинах.

До другої світової війни Державна Стаднина жеребців обслуговувала військові частини та приватних власників коней у воєводствах Львова, Тернополя, Станіслава. Відомо, що в районі Судової Вишні було близько 150 чистопородних коней різних порід у багатих землевласників і навіть фермерів. У цих власників був укладений договір згідно з яким жеребці з

Державної Стаднини криють кобил цих власників, власники чистокровних коней, якщо потрібно . віддають в оренду жеребців.

Австрійський уряд тримав у Галицькій Гуцульщині дві стайні гуцульських огирів: у Косові, засновану 1891 року, і в Жабйому (від 1895 року). Але найбільший осередок гуцульського конярства був на полонині Лучині, в Південній Буковині. Тут австрійський уряд влаштував у 1877 році станцію конярства расових гуцульських коней. Треба зацікавити горян до розведення чистокровних гуцульських коней. Тут доцільно відновити виставки коней на зразок тих, які проводилися на початку двадцятого сторіччя. Районна ветслужба збирає дані про коней, які є на утриманні у селян, розробляються рекомендації їх утримання та ведення відповідної племінної справи.

За даними Верховинської ветлікарні, протягом двох останніх років було видано 22 довідки на продаж коней у Польщу. Відновлення природи гуцульського коня стало досить актуальним , який зможе не просто служити

гуцулам, а допоможе підняти економіку гірських сіл. Виставки гуцульських коней, на яких часто присутні директор окружної спілки конярів у Кракові, Владислав Мроз – член польського об'єднання селекції коней «Новий сонц» у Польщі, Марек Гібала – директор окружної спілки селекціонерів коней у Жешуві, дають змогу оцінити коней, яких утримують місцеві жителі Івано-Франківської області. Їхній вислів: «Це не просто кінь-це сльоза сльози» є доказом цього.

Актуальною, також, залишається проблема формування транскордонних природоохоронних територій, зокрема транскордонних біосферних резерватів ЮНЕСКО. Так, першим резерватом нового типу в Україні, став міжнародний українсько-польський біосферний резерват ЮНЕСКО «Розточчя». З метою відновлення особливо цінних видів тварин, у Яворівському національному природному парку (частина Міжнародного біосферного резервату «Розточчя») з Розточанського парку народового були

завезені нащадки диких коней - тарпанів, які занесені до Червоної книги і населяли колись територію України.

Процес формування свійського коня *Eguus caballus* L. відбувався одночасно із витісненням та зменшенням чисельності диких коней. Одомашнення коней почалося на межі Східної Європи і Центральної Азії приблизно 5-6 тисяч років назад. Пояснюється це просто — дикі коні були харчовими конкурентами домашніх, тому там, де їхні шляхи перетиналися, люди безжально знищували тарпанів. Століття за століттям ареал диких коней скорочувався, а їх кормові угіддя діставалися худобі. В результаті такого витіснення дикий кінь вже до XVI сторіччя майже зник з лиця Землі. Історичні дані про існування дикого коня того часу збереглися лише з однієї частини Європи - району «Великої пустині». «Велика пустиня» -це площа лісів і боліт без втручання людини, розміщена на території колишньої Східної Прусії та частково сусідніх Польщі і Литви. Дикий кінь, скоріш за все, існував там з кінця 13-го до початку XVI століття (Mager 1960). Опис диких коней, проживаючих там, їх зовнішній вигляд (розмір тіла, колір шерсті), їх характер, ставлення людини до них (спроба приручення, створення і розміщення їх в звіринцях з метою врятування виду) можуть слугувати переконливими аргументами існування останньої популяції диких коней Центральної Європи.

В кінці XVI століття надходження інформації про існування дикого коня в дикій природі раптово припиняється. З того часу згадки про дикого коня були пов'язані з Яном Замойським (впливовим польським графом) і його сім'єю. В кінці XVIII століття Ян Замойський заснував великий і престижний звіринець і парк дикої природи недалеко від містечка Звежинець в Польщі. Відомості і опис диких коней з цього зоопарку надійшли з кінця XVIII століття [16].

У XIX ст. польські фермери відловлювали вимираючих диких тарпанів і схрещували їх зі своїми робочими кінями. В результаті вільного схрещування з домашніми кобилами було отримано так званого польського коника —

схожого на тарпана, сірого окрасу з темним ремнем на спині та темними ногами, який довгий час був традиційним робочим конем польських селян.

У 1936 році в Біловезькій пуші (польск. Puszcza Białowieska) за ініціативою професора Тадеуша Ветулані, з метою відновлення первісного типу дикого коня, організовується резерват. Відтворення велось із використанням гібридів тарпана, які залишилися, з домашнім конем, у яких найбільш збереглися ознаки дикого коня.

Роботи по відтворенню унікального дикого коня ведуться і зараз. Відновленням породи займаються не тільки вчені Польщі, а й Башкирії, Німеччини. Під час експериментів зі схрещування жеребців коня Пржевальського з кобилами коника вдалося отримати тварину, яка за виглядом майже не відрізняється від справжнього тарпана. Шляхом ретельного відбору вчені добились того, щоб надати їй максимально тарпаноподібного вигляду: мишасту масть, чорну гриву, хвіст і ноги, від гриви до основи хвоста по спині проходить чорний ремінь. Польські коники можуть змінювати відтінок масті в залежності від сезону: влітку вони темніші і більш коричневі, а до зими світлішають. Така мінливість не характерна для домашніх коней, зате часто зустрічається в диких тварин, яким сезонний диморфізм допомагає залишатися непомітними на будь-якому тлі. Проте, є і фенотипові відмінності. По-перше, у польських коників грива не стояча, в той час як очевидці описували тарпанів, як коней зі стоячою, жорсткою і трохи кучерявою гривою. По-друге, характер польських коників дуже врівноважений, чого не скажеш про їх неприборканих диких предків. Нарешті, в окремих коней на ногах можуть бути білі відмітини, що також розглядається як незаперечна ознака прирученості.

Відновлений тарпан – це фактично своєрідна порода домашніх коней, яка призначена для того, щоб демонструвати її у зоопарках, як «живого нащадка» дикого коня. Але Всесвітній фонд дикої природи (World Wide Fundfor Nature, WWF) приступив до програми повернення польського коника у природу. Тому тарпановидні коні були завезені у Білоруську частину

Біловезької пущі та на південний захід Латвії [11]. У 2009 році за згодою Мінприроди України та Міністерства охорони природи Польщі на територію Яворівського НПП з Розточанського парку народного завезено коней нащадків дикого коня-тарпана.

Питання походження свійського коня на даний час залишається на рівні гіпотез і догадок. Рання domestикація коня надійно задокументована тільки в Україні (Деріївка). Більшість дослідників вважають, що вперше приручений дикий кінь міг бути приблизно 5,5 тис. років тому трипільцями біля Деріївки (Кіровоградська обл.), але від якого саме таксону думки вчених розходяться. Одні вважають що це міг бути Тарпан. Але великий за розмірами кінь із Деріївки не міг походити від малорослого тарпана не міг походити і від коня Пржевальського. Тому перевага була надана думці про походження свійського коня від давнього плейстоценового коня (Мізин над Десною).

Розробка концепції збереження і управління генофондами domestикованих видів тварин потребує якісно нових, геномних методів їх моніторингу. Метод оцінки консолідації і чистопородності сільськогосподарських тварин, що заснований на поліморфізмі ISSR-маркерів можна застосовувати в генофондних і племінних господарствах. Вченими Г.Е. Сулімовою, М.Н. Рузіною, В.Н. Воронковою, Ю.А. Столповським на прикладі великої рогатої худоби та овець показаний алгоритм дії для аналізу між та внутрішньопопуляційної генетичної мінливості на геномному рівні, який дозволяє визначити: прапопуляцію породи, що важливо при збереженні початкової генетичної структури породи, приналежність популяції, до тої чи іншої породи чи виду.

Вивчення генетичного поліморфізму аборигенних порід коней здійснюють за допомогою ДНК-технологій, що базуються на використанні різних типів ДНК-маркерів. Приорітетними, на сьогодні, є метод мікросателітного аналізу ДНК. Мікросателіти відносяться до диспергованих тандемно повторюючих ди, три і тетра-нуклеотидних послідовностей. Загальний розмір складає не більше 100 п.н. Ці маркери відомі під

декількома назвами: мікросателіти, STMS (Sequene Tagged Microsattelite Site), STR (short tandem repeat), SSR (simple sequence repeat). Використовуючи метод мікросателітного аналізу, можна визначити з 95 %-вою вірогідністю до якої породи відносяться коні. Контроль родоводів коней, великої рогатої худоби, свиней та собак за панелями локусів мікросателітних ДНК, стандартизованими порівняльними тестами при сприянні Міжнародної Співки Генетики Тварин (the International Society for Animal Genetics, ISAG) увійшов у загальноприйняту практику в багатьох країнах. Проте для інших видів сільськогосподарських тварин такі стандартизовані панелі мікросателітів не розроблені. Не дивлячись на велику популярність, мікросателіти мають деякі недоліки. Нерівномірність швидкості мутування різних мікросателітів створює певні складності для популяційно-генетичного аналізу. Існують і технічні проблеми, такі як артефакти при проведенні ПЛР, а також можливість використання мікросателітів для дослідження аборигенних порід не достатньо вивчена. Це один із самих дорогих методів дослідження, що є передосторогою в широкому його застосуванню. До маркерів з високим рівнем роздільної здатності відносяться ДНК-маркери, які мають множинну локалізацію в геномі і тестують одночасно від 20 до 35-40 локусів. Це досягається при використанні одного короткого праймера з довільною послідовністю (RAPD – Randomly amplified polymorphic DNA і її аналогів), праймер з штучно добавленими послідовностями (адаптерами) (AFLP – Amplified fragment length polimorphism) чи праймерів, комплементарних до елементів геному, що повторюються (ISSR – Inter-simple-sequence-repeats).

Однією з різновидностей дослідження генетичного поліморфізму є ISSR-PCR – ампліфікація міжмікросателітних фрагментів ДНК, що знаходяться між двома інвертованими повторами генома. ISSR-PCR маркування результативно використовується для оцінки внутрішньовидової і міжвидової генетичної варіабельності, проведення генетичного моніторингу

в породах з метою збереження алелофонду небагаточисельних порід [277, 278, 279, 280].

Для дослідження внутрішньовидового генетичного поліморфізму коней нами були вибрані популяції: гуцульської породи коней, як аборигенної породи, що характеризується унікальними адаптивними властивостями; коні породи коник польський, як тварини, які занесені до Червоної книги і знаходяться під егідою ЮНЕСКО; арабської породи коней – як однієї з найдавніших порід.

Генотипування досліджених об'єктів здійснювали за допомогою 8 ISSR-праймерів – $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$, $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$ та $(CTC)_6C$. Для більш точного визначення молекулярної маси виявлених фрагментів ДНК, нами була використана універсальна шкала, розроблена науковцями Інституту загальної генетики ім. М.І.Вавилова. На шкалі застосована визначена градація молекулярної ваги. В залежності від зони використовувався певний крок від 10 до 100 пар нуклеотидів. Таким чином, враховували 37 зон з фіксованим інтервалом, який дозволяє досить точно визначати молекулярну вагу для 37 ПЛР-продуктів. Використання єдиної універсальної шкали дозволяє виявити закономірності в розподілі фрагментів і провести порівняльне дослідження породних та міжвидових відмінностей. За результатами проведених досліджень встановлено: аналіз поліморфізму фрагментів ДНК за вказаними праймерами, частку поліморфних локусів, середнє на локус генне різноманіття, інформаційний індекс Шеннона, показник внутрішньопопуляційного різноманіття, частку рідкісних локусів.

Аналіз популяційної структури генофондів досліджених порід коней з використанням ISSR-фінгерпринтинга дав можливість оцінити консолідованість вивчених популяцій [385–390].

Найбільший поліморфізм локусів за використанням маркерів $(GA)_9C$, $(AG)_9C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$, $(GA)_6CC$, $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$ та $(CTC)_6C$ виявлено у коней гуцульської породи ($P=0,494$), найменший ($P=0,172$) – у

коней арабської породи, проміжна величина поліморфізму ($P=0,224$) знаходилась у коней породи коник польський. Середнє на локус генне різноманіття для гуцульської породи коней було найвище, коні породи коник польський характеризувалися найнижчою гетерозиготністю і проміжне місце за цією ознакою займали коні арабської породи. Найбільші показники алельного різноманіття були властиві коням гуцульської породи (0,311), і найменш виражена ця різноманітність (0,116) проявилася у коней арабської породи. Найменший показник середнього числа поліморфних локусів μ (3,99) був характерний для коней арабської породи, а найбільший – μ (25,97) для гуцульської породи [391–397].

Для встановлення внутрішньопородної та міжпородної мінливості у досліджуваних коней був визначений генофондний профіль та породоспецифічний патерн. За допомогою породоспецифічного патерну встановлено, що кількість фрагментів ДНК, за якими одна порода відрізнялася від іншої знаходилася в межах від 1 до 9. За генофондним профілем і породоспецифічним патерном встановлені унікальні поліморфні ДНК – локуси, властиві тільки тваринам досліджених порід. Кількість унікальних поліморфних ДНК-фрагментів, знайдених у популяціях коней гуцульської породи дорівнювала 6, коней породи коник польський – 7 і у коней арабської породи – 9 [398–417].

Для розуміння процесів формування генофонду популяцій аборигенних порід коней на території України та розуміння питань domestикації коня був проведений ретроспективний аналіз літературних даних та створена карта поширення плейстоцен–голоценових коней на території України. На сьогодні палеонтологам та археологам надзвичайно тяжко визначити, коли в степах Євразії вперше відбувався процес domestикації коней. Такий процес пояснюється подібністю кісток диких та домашніх коней. Палеотологи 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. Проте, 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. Для розв'язання цих питань необхідні дані молекулярно-генетичних досліджень кінської ДНК. У Інституті розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН був здійснений молекулярно-генетичний аналіз зразків ДНК, виділених із викопних кісток древніх еквід, що перебували на цій території. Проведення такої роботи вимагало відпрацювання нової методики виділення ДНК із викопних решток (кісток) давніх коней.

Оптимізація методу виділення ДНК з викопних решток кісток коней полягала в наступному: підготовка проб (кістку подрібнювали у керамічній ступці до стану кісткового борошна) ; декальцифікація матеріалу (наважки подрібнювали у скляному гомогенізаторі за температурою 4°C, поступово додаючи лізуючий буфер (0,32М сахарози, 5 мМ MgCl₂, 1% Тритон X-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; процедуру очищення ДНК (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 °C, 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).

За результатами ISSR-аналізу, використовуючи метод усереднених відстаней, було знайдено генетичні відстані між сучасними кіньми (коні гуцульської породи, коні породи коник польський та коні арабської породи) та давніми (плейстоценовим, давнім свійським конем, справжнім тарпаном). Встановлено, що найбільш близькими один до одного були коні справжнього тарпана та давнього свійського коня $D_N = 0,0234$; плейстоценового коня і давнього свійського коня $D_N = 0,0385$. Найбільш віддаленими між собою виявилися досліджені коні гуцульської та арабської порід $D_N = 0,5334$; гуцульської породи та коника польського $D_N = 0,4477$; коні гуцульської породи та викопні рештки справжнього тарпана $D_N = 0,5057$. [418–430].

Отже, при нагромадженні даних ISSR-фінгерпринтингу генофондів сільськогосподарських видів, можна одержати надійні математичні критерії для оцінки консолідації порід за багатьма десятками локусів. Дослідження великої кількості видів і порід буде сприяти створенню банку даних їх генофондних характеристик. Це дасть можливість сформувати уявлення про прагенофони, сучасні генофони, виявляти зникнення і генетичну мінливість порід, визначати тактику і стратегію управління і збереження порід та видів сільськогосподарських тварин. [431–450].

ВИСНОВКИ

1. Науково обгрунтовано концепцію методичних підходів комплексного застосування молекулярно-генетичних і цитогенетичних методів у системі аналізу впливу генотипових та паратипових факторів на формування генетичної структури популяцій аборигенних порід свійських тварин. Комплексне застосування цитогенетичних та ДНК-маркерів ґрунтується на виявленні тварин із стабільними цитогенетичними показниками соматичного мутагенезу, носіїв унікальних генних комплексів, що обумовлюють адаптогенні властивості, призначене для розробки науково обгрунтованих програм збереження сільськогосподарських тварин аборигенних і малочисельних порід, вибору оптимальної тактики їх розведення і селекції, проведенні популяційно-генетичних досліджень, встановленні філогенетичних зв'язків з їх давніми предками.
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 $\square 0,76$ % (бура карпатська) $\square 5,1$ % (червона польська), частота тварин-носіїв робертсонівської транслокацій 1;29 $\square 3,3$ % (сіра українська), частка клітин з мікроядрами коливалася в межах $\square 1,1$ ‰ (сіра українська) $\square 5,0$ ‰ (білоголова українська), частка двоядерних лімфоцитів 1,5 ‰ (сіра українська) $\square 6,4$ ‰ (білоголова українська) та швидкість поділу клітин становила 2,5 ‰ (червона польська) $\square 4,8$ ‰ (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 цього 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 μ (25,97) – у коней гуцульської породи, найменші H' (0,116) та μ (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, з 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.

СИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Буркат В. П., Подоба Б. Є., Гузев І. В. Генофонд тварин. *Енциклопедія сучасної України*. Київ, 2006. Т. 5. С. 467–470.
2. Столповский Ю. А. Сохранение генетических ресурсов крупного рогатого скота. *Генетические ресурсы крупного рогатого скота : редкие и исчезающие породы*. Москва : Наука, 1993. С. 5–19.
3. Столповский Ю. А. Сохранение культурного биоразнообразия. *Биоразнообразие и сохранение генофонда флоры, фауны и народонаселения Центрально-Азиатского региона*. 2003. С. 90–94.
4. Гузев І. В. Методологія збереження біорізноманіття генетичних ресурсів тваринництва України : дис. ... д-ра с.-г. наук : 06.02.01. Чубинське, 2012. 627 с.
5. Зубець М. В., Буркат В. П., Гузев І. В. Система збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні. *Наукові розробки Інституту розведення і генетики тварин для впровадження*. Київ : Аграрна наука, 2011. С. 29.
6. Глобальный План Действий в области Генетических Ресурсов Животных и Интерлакенская Декларация о Генетических Ресурсах Животных : материалы Междунар. техн. конф. по вопросам Генетических Ресурсов Животных для Производства Продовольствия и Ведения Сельского Хозяйства (Интерлакен, Швейцария, 3-7 сент. 2007 г.) / Комиссия по генетическим ресурсам в сфере продовольствия и сел. хоз-ва. Рим : ФАО, 2008. 37 с.
7. Донт Ю., Тимарова А., Комарова Л., Боронникова С. Генетический полиморфизм трех пород лошади домашней. *Вестник Пермского университета*. Серия : Биология. 2018. Вып. 1. С. 50–56. DOI: 10.17072/1994-9952-20181-50-56.
8. Курзенков М. Походження та domestикація коня у дослідженнях з молекулярної біології. *Історичні і політологічні дослідження*. 2018. № 2 (63). С. 11–30.

9. Методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин / М. В. Зубець та ін. ; наук. ред. І. В. Гузева. Київ : Аграрна наука, 2007. 119 с.
10. Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration: proceedings of the International Technical Conference of Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, Interlaken, Switzerland, 3-7 September 2007 / Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome : FAO, 2007. № 6. 37 p.
11. Гладій М. В., Полупан Ю. П., Басовський Д. М., Вишневський Л. В., Ковтун С. І., Сидоренко О. В. Програма збереження генофонду локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин в Україні на 2017-2025 роки. Суми : Сум. нац. аграр ун-т, 2018. 54 с.
12. Браунер А. А. История животноводства в степной Украине. *Животноводство*. Одесса : Всеукр. Госиздат, 1922. 341 с.
13. Скворцов С. А. Частное скотоводство. *Основания сельского хозяйства*. Москва, 1870.
14. Пахомов П. А. Очерки по русскому скотоводству. *Ежегодник Главного управления землеустройства и земледелия по Департаменту земледелия*. Москва, 1909. С. 3–24.
15. Зорин И. Г. Серый украинский скот. *Государственная племенная книга крупного рогатого скота серой украинской породы*. Киев : Сельхозгиз УССР, 1950. Т. 4. С. 4–33.
16. Леопольдов А. В. Крупный рогатый скот на Всесоюзной сельскохозяйственной выставке 1923 года. Москва : Новая деревня, 1924. 170 с.
17. Скальковский А. А. Опыт статистического описания Новороссийского края. Скотоводство. Рогатый скот. Одесса, 1853. 552 с.
18. Шадрын В. А. Серый украинский скот в Екатеринославской губернии. Екатеринослав, 1917. 22 с.

19. Об улучшении романьолами южнорусского серого степного скота. *Иванов М. Ф. Полное собрание сочинений* : в 7 т. Москва, 1964. Т. 5. С. 597–615.
20. Чиркова О. П., Кругляк А. П., Харчук И. Т., Подоба Б. Е. Состояние и перспективы сохранения генофонда серой украинской и белоголовой украинской пород. *Быки–производители локальных серой украинской и белоголовой украинской пород : каталог*. Киев : Урожай, 1987. С. 13–25.
21. Дзіцюк В. В. Хромосомний поліморфізм окремих видів і порід сільськогосподарських тварин : автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук : 03.00.15. Чубинське, 2009. 30 с.
22. Шельов А. В. Цитогенетична оцінка племінних ресурсів сільськогосподарських тварин : автореф. дис. ... канд. с.-г. наук : 03.00.15. Чубинське, 2008. 20 с.
23. Сіра українська худоба: минуле, сучасне, майбутнє : монографія / під ред В. С. Козиря. Дніпропетровськ, 2008. 241 с.
24. Породи корів. *Agromega* : вебсайт. URL: <https://agromega.in.ua/korovu/porody-koriv/chervona-polska-3459.html> (дата звернення: 20.12.2020).
25. Скотарство-молочне, червона польська порода. *AgroUa* : вебсайт. URL: <http://agroua.net/animals/catalog/ag-1/a-2/ab-83/> (дата звернення: 20.12.2020).
26. Słota E., Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Danielak-Czech B. Aberracje chromosomowe u bydła. *Biuletyn Informacyjny* / IZ. Kraków, 1997. R. 35. N. 4. P. 17–27.
27. Di Berardino D., Iannuzzi L., Lror M. B. The high resolution RBA-banding pattern in bovine chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1985. Vol. 39. P. 136–139.

28. Di Berardino D., Hayes H., Fries A., Long S. International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1990. Vol. 53. P. 65–79.
29. Gustavsson I. Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. *Hereditas (Lund)*. 1969. Vol. 63. P. 68–169.
30. Popescu C. P. Sister chromatid exchanges (S.C.E) in normal and abnormal bovine (*Bos taurus* L.) karyotypes. *Cytologia (Tokyo)*. 1978. Vol. 43. P. 33–40.
31. Заброварний О. М., Король В. І., Недава В. Ю. Бура карпатська порода. Ужгород : Карпати, 1971. 154 с.
32. Бура карпатська. *Kurkul* : вебсайт. URL: <https://kurkul.com/porody/24-bura-karpatska> (дата звернення: 20.12.2020).
33. Фахівці ФАО допомогли зберегти буру карпатську породу корів на Закарпатті. *Milkua.info* : вебсайт. URL: <http://milkua.info/uk/post/fahivci-fao-dopomogli-zberegiti-buru-karpatsku-porodu-koriv-na-zakarpatti> (дата звернення: 20.12.20)
34. Костенко С. О., Джус П. П., Коновал О. В., Сидоренко О. В., Стародуб Л. Ф., Драгулян М. В. Видові особливості поліморфізму та геномної нестабільності свині свійської (*Sus scrofa*) і великої рогатої худоби (*Bos Taurus*) за цито- та ДНК маркерами. Київ : Компринт, 2017. 243 с.
35. Blazak W. F, Eldridge F. E. A Robertsonian Translocation and its Effect Upon Fertility in Brown Swiss Cattle. *Dairy Science*. 1977. Vol. 60, No. 7. P. 1133–1142.
36. Голландська порода великої рогатої худоби. [Українська радянська енциклопедія](#) / гол. ред. [М. П. Бажан](#). 2-ге вид. Київ, 1979. Т. 3. С. 82.
37. Филиповський О. К., Устьянцев В. П., Бик З. М., Бломквіст Б. Л. Матеріали обслідування білоголової колонійської раси великої рогатої худоби. Київ, 1929. Вип. 31. 358 с.

38. Войтенко С. Л., Вишневський Л. В. Ризики втрати місцевих вітчизняних порід свиней та великої рогатої худоби. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів та природокористування України*. Київ, 2014. Вип. 202. С. 186–191.
39. Качура В. С. Хромосомные нарушения у крупного рогатого скота (BOSTAURUSL.). *Цитология и генетика*. 1982. № 4. С. 60–70.
40. Аудиторський звіт за результатами державного фінансового аудиту діяльності державного підприємства «Конярство України» за період з 01.01.2015 по 30.09.2017 / Державна аудиторська служба України. Київ, 2017. 48 с.
41. Відновлення популяції та використання гуцульської породи коней як важливий аспект соціально-економічного розвитку гірських територій Карпатського регіону України : матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. з нагоди XXIII Міжнар. гуцульського фестивалю та відзначення 45-річчя Програми ЮНЕСКО «Людина і Біосфера», м. Рахів, 2–4 верес. 2016 р. / відп. ред. Ф. Д. Гамор. Хмельницький : ФОП Петришин, 2016. 338 с.
42. Головач М. Й., Головач М. М. Державна книга племінних коней гуцульської породи. Ужгород : Карпати, 2013. Т. 2. 256 с.
43. Сеньків І. Гуцульська спадщина. Верховина : Гуцульщина, 2014. 510 с.
44. Попадюк С. С. Дослідження генетичного потенціалу та природної резистентності гуцульської породи коней : автореф. дис. ... канд. с.-г. наук : 06.02.01 / Львів. держ. акад. вет. медицини ім. С. З. Гжицького. Львів, 2002. 22 с.
45. Польський коник : вебсайт. URL: <http://good-know.com/polskiy-konik/> (дата звернення 15.01.2021).
46. Марков К. К. Четвертичный период (ледниковый период-антропогеновый период). Москва, 1965–1967. Т. 1–3.

47. Походження та одомашнення коней. *Навчально інформаційний портал НУБіП України* : вебсайт. URL: <https://elearn.nubip.edu.ua/> (дата звернення 16.06. 2021).

48. Чернова О. Ф., Перфилова Т. В., Спасская Н. Н., Киладзе А. Б., Ибраев М. В. Атлас микроструктуры волос лошадей. Москва : КМК, 2011. 123 с.

48. Кінь свійський : вебсайт. URL: <https://uk.wikipedia.org › wiki> (дата звернення 15.01.2021).

49. Арциховский А. В. Основы археологии. Москва : Госполитиздат, 1954. 280 с.

50. Bökönyi Sándor. Late Chalcolithic horses in Anatolia : Equids in the Ancient World. *Beihefte zum Tübinger Atlas des Vorderen Orients*. Reihe A (Naturwissenschaften). 1991. P. 123–131.

51. Барминцев Ю. Н. Эволюция конских пород в Казахстане. Алма-Ата : Казгосиздат, 1958. 281 с.

52. Громова В. И. История лошадей (рода *Equus*) в Старом Свете. *Труды палеонтологического института АН СССР*. Москва, 1949. Т. 17, вып. 1-2. С. 34–43.

53. Косинцев П. А., Пластеева Н. А., Васильев С. К. Дикие лошади ((*EquusEquus*) S. L.) Западной Сибири в голоцене. *Зоологический журнал*. 2013. № 9. С. 1107. DOI: 10.7868/50044513090092.

54. Нурушев М. Ж. Об эволюции аборигенных популяций лошадей, или где впервые одомашнена лошадь. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН : электронный журнал*. 2018. № 1. DOI: 10.24411/2304-9081-2018-11004.

55. Румянцев В. Ф., Войтятский Б. П. Лошади Монголии. *Труды Монгольской комиссии «Домашние животные Монголии»*. 1936. № 22.

56. Лазарев П. А. Антропогеновые лошади Якутии. Москва : Наука, 1980. 190 с.

57. Габышев М. Ф. Якутская лошадь. Якутск : Якут. кн. изд-во, 1957. 239 с.
58. Outram A. K., Stear N. A., Bendrey R., Kasparov A., Zaibert V., Thope N., Evershed R. P. The Earliest Horse Harnessing and milking. *Science*. 2009. Vol. 323(5919). P. 1332–1335.
59. Olsen Sandra L. The exploitation of horses at Botai, Kazakhstan. *Prehistoric Steppe Adaptation and the Horse*. Cambridge : McDonald Institute, 2003. P. 83–104.
60. Зайберт В. Ф. Ботайская культура. Алмата : ҚазАқпарат, 2009. 576 с.
61. Зайберт В. Ф. Ботай. У истоков степной цивилизации : книга-альбом. Алмата : Балауса, 2011. 480 с.
62. Anthony David W., Brown Dorcas. Eneolithic horse exploitation in the Eurasian steppes: diet, ritual and riding. *Antiquity*. 2000. Vol. 74. P. 75–86.
63. Levine M. A. The Origins of Horse Husbandry on the Eurasian Steppe. *Late Prehistoric Exploitation of the Eurasian Steppe*. Cambridge : McDonald Institute Monographs, 1999. P. 5–58.
64. French Ch., Kousoulakou M. Geomorphological and micromorphological investigations of paleosols, valley sediments, and a sunken-floored dwelling at Botai, Kazakstan. *Prehistoric Steppe Adaptation and the Horse*. Cambridge : Mc Donald Institute, 2003. P. 105–114.
65. Olsen S. L. Geochemical evidence of possible horse domestication at the Copper Age Botai settlement of Krasnyi Yar, Kazakhstan. *Geological Society of America Annual Meeting*. 2006. P. 10–23.
66. Ермолова Н. М. Останки млекопитающих из поселения Ботай. *Проблемы реконструкции хозяйства и технологий по данным археологии* / Петропавловск. отд. археологии Сев. Казахстана НАН РК. 1993. С. 87–89.
67. Витт В. О. Лошади Пазырыкских курганов. *Советская археология*. 1952. № 16. С. 187–188.

68. Бибикова В. И. К изучению древнейших домашних лошадей Восточной Европы. *Бюллетень МОИП. Отд. биол.* 1970. Т. 75. Вып. 5. С. 12–24.
69. Michael C., Pruvost M., Benecke N., Hofreiter M., Morales A., Reissmann M., Ludwig A. Origin and History of Mitochondrial DNA Lineages in Domestic Horses. *PLoS ONE*. 2010. Vol. 5. Iss. 12. P. 1–13.
70. Hellborg L. Ellegren H. Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes. *Molecular Biology and Evolution*. 2004. Vol. 21. P. 158–163.
71. Lau A. N, Peng L, Goto H., Chemnick L, Ryder O. A., Makova K. D. Horse Domestication and Conservation Genetics of Przewalski's Horse Inferred from Sex Chromosomal and Autosomal Sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 2009. Vol. 26. № 1. P. 199–208.
72. Anthony D. W. Horse, wagon and chariot: Indo-European languages and archaeology. *Antiquity*. 1995. Iss. 69. P. 554–565.
73. Cañón J., García D., García-Atance M. A., Obexer-Ruff G., Lenstra J. A. Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East. *Anim. Genetics*. 2006. Vol. 37. P. 327–334.
74. [Курзенков М. С.](#) Походження та domestикація коня у дослідженнях з молекулярної біології. [Історичні і політологічні дослідження](#). 2018. № 2. С. 11–30.
75. Fang M. Contrasting mode of evolution at a coat color locus in wild and domestic pigs. *PLoS Genet*. 2009. Vol. 5. e 1000341.
76. Goldstein D. B. Genealogical and evolutionary inference with the human Y chromosome. *Science*. 2001. Vol. 291. P. 1738–1742.
77. Oakenfull E. A., Lim. H. N., Ryder O. A. *Conserv. Genet.* 2000. Vol. 1. P. 341–355.
78. Jansen Thomas, Forster Peter, Levine Marsha A., Oelke Hardy, Matthew Hurles, Colin Renfrew, Jëurgen Weber, and Klaus Olek. Mitochondrial

DNA and the origins of the domestic horse. *PNAS. Molecular Biology and Evolution*. 2002. Vol. 99. № 16. P. 10905–10910.

79. Hellborg L. Ellegren H. Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes. *Molecular Biology and Evolution*. 2004. Vol. 21. P. 158–163.

80. Lopes M. S., Mendonça D., Cymbron T., Valera M. J. da Costa-Ferreira and A. da Camara Machado. The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation. *Animal Genetics*. 2005. Vol. 36. P. 196–202.

81. Royo J., Alvarez I., Beja-pereira A., Molina A., Fernandez I., Jordana J., Gomez E., Gutierrez J. P. and Goyache F. The Origins of Iberian Horses Assessed via Mitochondrial DNA. *Journal of Heredity*. 2005. Vol. 96 (6). P. 835–842.

82. Ho S. Y. W., Larson G. Molecular clocks: when times are a-changin. *Trends in Genetics*. 2006. Vol. 22. P. 79–83.

83. Lippold Sebastian, Kuznetsova T., Leonard J. A., Norbert Benecke, Ludwig A., Cooper A., Weinstock J., Willerslev E., Beth Shapiro Michael Hofreiter. Discovery of lost diversity of paternal horse lineages using ancient DNA. *Nature Communications*. 2011. Vol. 2. Iss. 450. P. 1–6.

84. Outram Alan K., Stear Natalie A., Robin Bendrey, Sandra Olsen, Alexei Kasparov, Victor Zaibert, Nick Thorpe, Richard P. Evershed. The Earliest Horse Harnessing and Milking. *Science*. 2009. Vol. 323. P. 1332–1335.

85. Pruvost M., Rebecca Bellonec, Norbert Benecke, Edson Sandoval Castellanos, Michael Cieslaka, Tatyana Kuznetsova, Arturo Morales-Muciz, Terry O'Connell, Monika Reissmann, Michael Hofreiter and Arne Ludwig. Genotypes of predomestic horses match phenotypes painted in Paleolithic works of cave art. *PNAS*. 2011. Vol. 108. Iss. 46. P. 18626–18630.

86. Aberle H. Hamann, Dr. E. G. Müller C. And Distl O. Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and

wild horses by means of microsatellite DNA markers. *Animal Genetics*. 2004. Vol. 35. P. 270–277.

87. Lira Jaime, Anna Linderholm, Carmen Olaria, Mikael Brandström Durling, M. Thomas, P. Gilbert, Hans Ellegren, Eske Willerslev, Kerstin Lidren, Juan Luis Arsuaga Andanders Gëotherström. Ancient DNA reveals traces of Iberian Neolithic and Bronze Age lineages in modern Iberian horses. *Molecular Ecology*. 2010. Vol. 19. P. 64–78.

88. Marsha A. Levine. Botai and the Origins of Horse Domestication. *Journal of Anthropological Archaeology*. 1999. Vol. 18. P. 29–78.

89. Meadows J. R. S., Hawken R. J., Kijas J. W. Nucleotide diversity on the ovine Y chromosome. *Anim Genet*. 2012. Vol. 35. P. 379–385.

90. Столповский Ю. А. Новые организационные система и принципы сохранения генофондов domesticiрованных видов животных. *Вестник Российской академии сельскохозяйственной науки*. 2009. № 6. С. 56–71.

91. Глазко В. И., Гладырь Е. А., Феофилов А. В., Бардуков Н. В., Глазко Т. Т. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геномах сельскохозяйственных видов млекопитающих. *Сельскохозяйственная биология*. 2013. № 2. С. 71–76.

92. Глазко В. И., Феофилов А. В., Бардуков Н. В., Глазко Т. Т. Видоспецифические ISSR-PCR маркеры и пути их формирования. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2012. Вып 1. С. 118–125.

93. Caetano-Anoll é sG., Gresshoff P. M. Generation of sequence signatures from DNA amplification fingerprints with mini-hairpin and microsatellite primers. *Biotechniques*. 1996. Vol. 20. № 6. P. 1044–1048.

94. Феофилов А. В., Бардуков Н. В., Глазко В. И. Дифференциация генофондов алтайской и рысистой пород лошадей по ISSR-PCR маркерам. *Генетика*. 2011. Т. 37, № 9. С. 1230–1235.

95. Глазко В. И., Глазко Т. Т. ДНК-технологии в генетике и селекции : монография. Краснодар : Просвещение-Юг, 2006. 399 с.

96. Glazko V. I. Glazko T. T., Erkenov T. A. Genetic Structure of Karachai Horses on ISSR-PCR Markers. *Biogeosystem Technique*. 2016. Vol. 9. Iss. 3. P. 195–204.
97. Kol N.V., Lazebny O.E. Polymorphism of ISSR-PCR markers in Tuvinian population of reindeer Rangifer tarandus L. *Genetika*. 2006. Vol. 42. P. 1731-1734.
98. Дубина Е. В., Мухина Ж. М. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 2011. № 66. С. 1–11.
99. Tellam R.I., Worley K.C. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*. 2009. Vol. 324. P. 522-528.
100. Erkenov T. A., Glazko V. I., Knyaseva E. F., Glazko T. T. Generation of Molecular Genetic Markers in Studies of Genetic Structures of Horses. *International Journal of Environmental Problems*. 2017. Vol. 3. Iss 1. P. 36–46.
101. Донт Ю. У., Тимарова А. В., Комарова Л. В., Боронникова С. В. Генетический полиморфизм трех пород лошадей. *Вестник Пермского университета*. Серия : Биология. 2018. Вып. 1. С. 50–55.
102. Al Abri M.A., Holl H.M., Kalla S.E., Sutter N.B., Brooks S.A. Whole genome detection of sequence and structural polymorphism in six diverse horses. *PLoS One*. 2020. V. 15(4). P. 230-250. doi: 1371/journal.pone.0230899.
103. Бардуков Н. В., Феофилов А. В., Глазко Т. Т., Глазко В. И. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геноме домашней лошади Equuscaballus. *Сельскохозяйственная биология*. 2014. № 4. С. 42–57.
104. FAO, 2015. The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Re-courses for Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2015. 565 p.
105. Храброва Л. А. Теоретические и практические аспекты генетического мониторинга в коневодстве : автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. Дивово, 2011. 26 с.

106. Эркенов Т. А., Елькина М. А., Юлдашбаев Ю. А., Глазко В. И. Полиморфизм мобильных генетических элементов в геномах домашней лошади. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2015. Вып. 3. С. 75–86.
107. Ольховская Л. В., Криворучко С. В., Целовальникова М. И. Выявление степени генетического родства карачаевской, тувинской и арабской пород лошадей. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2011. № 1. С. 19.
108. Голик Т., Эркенов Т., Глазко Т., Глазко В. Спектры ISSR-PCR маркеров в оценках популяционно-генетической дифференциации карачаевской лошади в хозяйствах карачаево-черкесской республики. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2018. Вып. 3. С. 61–77. DOI :10.26897/0021-342X-2018-3-61-77.
109. Супрун І. О., Куриленко Ю. Ф. Моніторинг генетичного поліморфізму популяцій коней за використання ISSR маркерів. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. Серія : Тваринництво. Суми, 2014. Вип. 2/1 (24). С. 181–186.
110. Феофилов А. В., Бардуков Н. В., Глазко В. И. Дифференциация генофондов алтайской и рысистых пород лошадей по ISSR-PCR маркерам. *Генетика животных*. 2011. Т. 47. № 9. С. 1230–1235.
111. Бардуков Н. В., Коновалова Г. К., Глазко В. И. Профили ДНК-маркеров (ISSR-PCR) у лошадей рысистых пород. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2010. Вып. 6. С. 152–157.
113. Budowle B., Garofano P., Hellman A., Ketchum, M., Kanthaswamy S., Parson W., van Haeringen W., Fain S., Broad T. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *Int. J. Legal Med.* 2005. V. 119(5). P. 295-302. doi: 10.1007/s00414-005-0545-9
114. Воронкова В. Н., Цэндсүрэн Цэдэв, Сулимова Г. Е. Сравнительный анализ информативности ISSR-маркеров для оценки

генетического разнообразия пород лошадей. *Генетика*. 2011. Т. 47. № 8. С. 1131–1134.

115. Храброва Л. А. Использование ДНК-технологий в коневодстве. *Эффективное животноводство*. 2015. № 6 (115). С. 13–17. Дубляж 102

116. Нефедова Л. Н. DROSOPHILA MELANOGASTER как модель генетики развития: современные подходы и перспективы. *Онтогенез*. 2020. Т. 51. № 4. С. 243–253.

117. Тоцький В. М. Генетика : підруч. для студ. біол. спец. ун-тів. Одеса : Астропринт, 2008. 710 с.

118. Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. A. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2000. Vol. 287. P. 2185–2195.

119. Myers E. W., Sutton G. G., Delcher A. T. A wholegenome assembly of *Drosophila*. *Science*. 2000. Vol. 287. P. 2196–2204.

120. Rubin M. G., Yandell M. D., Wortman J. R. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*. 2000. Vol. 287. P. 2204–2215.

121. Білоконь С. В. Життєздатність DROSOPHILA MELANOGASTER за вживання біологічно-активних речовин препаратів «Вин-Віта» та «Комбуча». *Природничий альманах*. Серія : Біологічні науки. Херсон, 2014. Вип. 20. С. 47–54.

122. Медична біологія : підручник / за ред. : В. П. Пішака, Ю. І. Бажори. Вінниця : НОВА КНИГА, 2004. 656 с.

123. Дурнев А. Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания. *Генетика*. 1997. Т. 33. С. 165–176.

124. Медведєв Н. Н. Практическая генетика. Москва : Наука, 1966. 238 с.

125. Захаров И. А. Очерки по истории генетики. Генетика в XX веке. Москва : Наука, 2003. 368 с.

126. Вайсман Н. Я. Сигнальные пути клеток в онтогенезе животных на примере Notch каскада у *Drosophila melanogaster*. *Журнал общей биологии*. 2004. Т. 65. № 4. С. 322–333.

127. Фандо Р. А., Музрукова Е. Б. Взаимопроникновение медицинских и биологических воззрений в проблему наследственности человека: историко-научный анализ. *Информационный вестник ВОГиС*. 2008. Вып. 12. № 3. С. 474–482.

128. «Дом без ключей». URL: http://www.dom-bezkluchey.ru/slime_scales_and_chitin/drosophila-melanogaster.html (дата звернення : 01.12.2020)

129. Сворик О. Таємниці аромату, який робить харчові продукти смачнішими. *Хлібопекарська і кондитерська промисловість України*. 2010. № 6. С. 43–44.

130. Харчові та біологічно активні добавки. Ароматизатори. *StudFiles* : вебсайт. URL : <http://www.studfiles.ru/preview/5258274/page:7> (дата звернення : 01.12.2020).

131. Боднар І. В., Зубко О. С., Щербакова О. В. та ін. Виявлення змін на хромосомному рівні в еукаріотичних організмів за дії синтетичних ароматизаторів продуктів харчування та корегування їх за допомогою вітамінних хіміопревентерів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Київ, 2016. Т. 18. С. 67–71.

132. Прохорова И. М., Фомичева П. Н., Ковалева М. И. Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды : метод. указания. Ярославль : ЯрГУ, 2003. 26 с.

133. Боднар І., Горбулінська С., Боднар Л. Доцільність використання вітамінних хіміопрепаратів для корегування індукції хромосомних аберацій синтетичним харчовим ароматизатором «Карамель». *Вісник Львівського національного університету імені Івана Франка*. Серія : Біологія. Львів, 2017. Вип. 76. С. 54–60.

134. Кудлюк О. В. Харчові добавки: за і проти. *Хімія*. 2008. № 11/12. С. 58–60.

135. Урбан В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. Москва : Медицина, 1975. 295 с.

136. Недосєкова Н. С. Проблеми використання харчових добавок: продовольча безпека. *Безпека життєдіяльності*. 2009. № 7. С. 2–3.
137. Усик С., Богданович Л. Харчові добавки у продуктах, або смертельна їжа. *Безпека життєдіяльності*. 2016. № 9. С. 37.
137. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Стародуб Л. Ф., Безденежних Н. О. Мезенхімальні стовбурові клітини пупкового канатика лошат на ранніх пасажах культивування *in vitro*. *Тваринництво України*. 2014. № 12. С. 36–40.
138. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Стародуб Л. Ф., Безденежних Н. О. Імунофенотипова характеристика та цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатику лошат на ранніх пасажах культивування *in vitro*. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України*. Київ, 2014. Вип. 179. С. 50–53.
139. 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 *in vitro*. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України*. Київ, 2014. Вип. 201, ч. 1. С. 100–107.
140. 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.
141. Mazurkevych A., Malyuk M., Bezdeniezhnykh 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.

142. Шельов А. В., Дзіцюк В. В. Методика приготування метафазних хромосом лімфоцитів периферійної крові тварин. *Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві* : наук. зб. Київ : Аграрна наука, 2005. С. 210–213.

143. Графодатский А. С., Раджабли С. И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих : атлас. Новосибирск : Наука, 1988. 128 с.

144. Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных / пер. с англ. В. М. Гиндилиса, Ю. Б. Юрова ; под ред. Н. Н. Воронцова. Москва : Мир, 1986. 272 с.

145. Інструкція з проведення цитогенетичного контролю племінних тварин. *Нормативні документи з проведення генетичної експертизи племінних тварин*. Київ : ППНВ, 2006. С. 24–36.

146. Подоба Б. Є., Качура В. С., Дідик М. В. Генетична експертиза у скотарстві. Київ : Урожай, 1991. 176 с.

147. Chen J., Uboh C.E., Soma L.R., Li X., Guan F., You Y., Liu Y. Identification of racehorse and sample contamination by novel 24-plex STR system. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2010. V. 4(3). P. 158-67.

148. Бездробная Л. К., Цыганок Т. В., Курило Л. В., Бухал А. В., Романова Е. П., Дрозд И. П. Частота мутаций и aberrаций хромосом в лимфоцитах крови жителей 30-километровой зоны отчуждения ЧАЭС. *Проблемы радиационной генетики на рубеже веков* : тез. докл. междунар. конф. Ереван, 2000. С. 233.

149. Heddle J. A., Carrano A. V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutation Research.* 1977. Vol. 44. P. 63–69.

150. Yamamoto K. I., Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei

induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Research*. 1980. Vol. 71. P. 27–31.

151. Горовая А. И., Климкина И. И. Использование цитогенетического тестирования для оценки экологической ситуации и эффективности оздоровления детей и взрослых природными адаптогенами. *Цитология и генетика*. 2002. Т. 36, № 5. С. 21–25.

152. Афанасьева Е. С., Безруков В. Ф., Шепета Ю. Б. Изменчивость и динамика частоты микроядер участников трансатлантического перехода VII Украинской антарктической экспедиции. *Цитология и генетика*. 2004. Т. 38, № 4. С. 37–43.

153. Pau P. W., van Buul, Tuinenburg-Bolraap A., Searle A. G., Natarajan A. T. A search for radiosensitive mouse mutants by use of the micronucleus technique. *Mutation Research*. 1987. Vol. 191. P. 163–169.

154. Cekic C., Battey N., Wilkinson M. The potential of ISSR-PCR primer pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001. Vol. 103. P. 540–546.

155. Fontanesi L. A., Scotti E., Cisarova P., Battista S., Dallolio D., Fornasini A. Frabetti Missense Mutation in the Rabbit Melanocortin 4 Receptor (MC4R) Gene is Associated with Finishing Weight in a Meat Rabbit Line. *Animal biotechnology*. 2013. Vol. 24 (4). P. 26

156. Демидов С.В., Безруков В.Ф., Сиволоб А.В. Загальна та молекулярна генетика : практикум. Київ, 2005. С.5-44.

157. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск, 2006. С. 236-350.

158. Прохорова И. М. Система тестов для оценки генотоксической активности факторов среды. Ярославль, 2001.

159. Спосіб визначення активності біологічно активної речовини : пат. 78836 Україна. № 201004098 ; заявл. 20.08.2010 ; опубл.10.04.2013, Бюл. № 16.
160. Плохинский Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников. Москва : Колос, 1969. 255 с.
161. Меркурьева Е. К., Шангин-Березовский Г. Н. Генетика с основами биометрии. Москва : Колос, 1983. 400 с.
162. Животовский Л. А. Показатель внутривидового разнообразия. *Журнал общей биологии*. 1980. Т. 18. № 6. С. 828–831.
163. TotalLab : вебсайт. URL: [http:// www.totallab.com](http://www.totallab.com) (дата звернення : 01.12.2020).
164. Gel Quest : вебсайт. URL: <http://www.sequentix.de/gelquest> (дата звернення : 01.12.2020).
165. Розенберг Г. С. Информационный индекс и разнообразие: Больцман, Котельников Ю Шеннон, Уивер *Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии*. Тольятти, 2010. Т. 19. № 2. С. 4–25.
166. Гузев І. В. Методологія збереження біорізноманіття генетичних ресурсів тваринництва України : автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук : 06.02.01. Чубинське, 2012. 39 с.
167. Козир В. С. Сіра українська порода: національне надбання на межі зникнення. *Агробізнес сьогодні*. 2015. № 22 (317). С. 3.
168. Стародуб Л. Ф. Цитогенетичний контроль у м'ясному і молочному скотарстві : автореф. дис. ... канд. с.- г. наук : 03.00.15. Чубинське, 2011. 20 с.
169. Бащенко М. І., Копилов К. В., Добрянська М. Л., Стародуб Л. Ф., Подоба Ю. В., Копилова К. В. Визначення генетичних аномалій у великої рогатої худоби : метод. рек. Чубинське, 2011. 36 с.

170. Чеботарев А. Н. Закономерности хромосомной изменчивости соматических клеток человека. *Вестник Российской академии наук*. 2001. Т. 37, № 10. С. 64–69.
171. Глазко Т. Т. Мікроядерний тест у великої рогатої худоби. *Вісник аграрної науки*. 2001. № 9. С. 45–48.
172. Джус П. П. Видоспецифічність дестабілізації каріотипів сільськогосподарських тварин за радіаційного та інфекційного впливу : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.15. Київ, 2012. 20 с.
173. Migliore L., Colognato R., Naccarati A. e.a. Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study. *Mutagenesis*. 2006. Vol. 2. Iss. 21. P. 149–152.
174. Ковалева О. А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих. *Цитология и генетика*. 2008. № 1. С. 58–72.
175. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ / Совместное издание Программы ООН по окружающей среде, Международной организации труда и Всемирной организации здравоохранения. Женева : Всемирная организация здравоохранения, 1989. 51 с.
176. Porto-Neto LR, Reverter A, Prayaga KC, Chan EKF, Johnston DJ. (2014). The Genetic Architecture of Climatic Adaptation of Tropical Cattle. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. Iss. 11. : e113284. doi: 10.1371/journal.pone.0113284
177. Кузнецов А. И., Кружалов А. И., Илющенко В. Г. Возрастно-половая зависимость спонтанной частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови человека. *Генетика*. 1980. № 7. С. 1279–1293.
178. Зубець М. В., Буркат В. П., Гузєв І. В. та ін. Система збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні. *Наукові*

розробки Інституту розведення і генетики тварин для впровадження. Київ : Аграрна наука, 2011. С. 29.

179. Xiao R., Kim J., Choi H., Park K., Lee H., and Park C. Characterization of the Bovine Endogenous Retrovirus $\beta 3$. *Genome, Mol. Cells*. 2008. Vol. 25, Iss.1. P. 142–147.

180. Wilkins A. S., Wrangham R. W., Fitch W. T. The “Domestication Syndrome” in Mammals: A Unified Explanation Based on Neural Crest Cell Behavior and Genetics. *Genetics*. 2014. Vol. 197. P. 795–808.

181. Iannuzzi L., Berardino D. D. Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animal cytogenetics *J. Appl. Genet*. 2008. № 49 (4). P. 357–366.

182. Семенов А. С. Цитогенетический скрининг в различных популяциях голштинизированного скота : автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук : 06.02.07. Новосибирск, 2010. 16 с.

183. Ильинских Н. Н., Ильинских И. Н., Некрасов В. Н. Использование микроядерного теста в скрининге и мониторинге мутагенов. *Цитология и генетика*. 1988. № 1. С. 67–72.

184. Ящук Т., Стравський Я. Адаптаційна здатність і природна резистентність помісних корів червоної польської породи. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2012. Вип. 46. С. 119–122.

185. Ящук Т., Тихонова Т. Перспективи використання у селекційному процесі наявного масиву худоби червоної польської породи : тези конференції (20-21 жовтня 2011 р.). Секція 1 : Сільськогосподарські науки. URL: http://conftiapv.at.ua/publ/konf2021shovtnja_2011r/sekcija1silskogospodarski_nauki/perspektivi_vikoristannj (дата звернення: 10.02.2013).

186. Войтенко С., Вишневський Л. Білоголова українська порода в історичному аспекті. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. Серія : Тваринництво. 2016. № 7 (30). С. 51–57.
187. Недава В. Ю., Єфіменко М. Я. Чорно-ряба худоба. Київ : Урожай, 1987. 141 с.
188. Чиркова О. П., Кругляк А. П., Харчук И. Т., Подоба Б. Е. Состояние и перспективы сохранения генофонда серой украинской и белоголовой украинской пород. *Быки–производители локальных серой украинской и белоголовой украинской пород* : каталог. Киев : Урожай, 1987. С. 13–25.
189. Steiner F. E. Infection and co-infection rates of *Anaplasma phagocytophilum* variants, *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi*, and the rickettsial endosymbiont in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) from sites in Indiana, Maine, Pennsylvania, and Wisconsin . *J. Med. Entomol.* 2008.Vol. 45 (2). P. 289–297.
190. Дзіцюк В. В. Хромосомний поліморфізм локальних порід сільськогосподарських тварин України. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України*. Київ, 2011. Вип. 160. С. 300–303.
191. Migliore L., Colognato R., Naccarati A. e.a. Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: fsndings from a biomonitoring studu. *Mutagenesis*. 2006. Vol. 21. Iss. 2. P. 149-152.
192. Ковалева О. А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих. *Цитология и генетика*. 2008. № 1. С. 58–72.
193. Kovaks G. B., Sadah, Hoene E. Binucleate cellsin a human renal cell carcinoma with 34 chromosomes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1988. Vol. 31. P. 211-216.
194. Коновалов В. С. Эколого-генетический бумеранг 50 лет спустя (история, состояние и возможные генно-протеомные диагностики). *"Зелена"*

економіка: перспективи впровадження в Україні : матеріали Міжнар. конф., 24-25 квітня 2012 р. Київ, 2012. С. 384–388.

195. Сафонова Н., Глазко Т. Меж- и внутривидовая цитогенетическая нестабильность у крупного рогатого скота. *Збірник наукових праць інституту агроєкології та біотехнології УААН*. Київ, 2000. № 4. С. 198–209.

196. Дьоміна Е. А., Бариляк І. Р., Пілінська М. А. Глосарій з радіаційної цитогенетики. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2009. Т. 7. № 1. С. 125–163.

197. Держинський М. Е., Скрипник Н. В., Гарматіна С. М., Островська Г. В., Варенюк І. М., Пустовалов А. С., Вороніна О. К., Пазюк Л. М., Бузинська Н. О. Загальна цитологія та гістологія : навч. посіб. Ч. 1 : Загальна цитологія. Київ : ВПЦ «Київський університет», 2006. 275 с.

198. Джус П, Стародуб Л, Куриленко Ю, Костенко С. Изменчивость цитогенетических показателей соматического мутагенеза разных пород лошадей. *Аграрні науки / Аграрен университет Пловдив*. 2013. № 14. С. 31-35.

199. Вахтин Ю. Б. Генетика соматических клеток. Ленинград : Наука, 1974. 255 с.

200. Проценко Н. Е. Генетика с основами биометрии : учеб. пособ. Киев : УСХА, 1991. 128 с.

201. Спосіб визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster* : пат. 78836 Україна. № 201204917 ; заявл. 19.04.2012 ; опубл. 10.04.2013, Бюл. № 7. 4 с.

202. Стародуб Л. Ф., Остаповець Л. І. Міжпородна диференціація корів порід абердин-ангус і українська чорно-ряба молочна за рівнем соматичного мутагенезу. *Біологія тварин*. Львів, 2012. Т. 14. № 1-2. С. 491–497.

203. Стародуб Л. Ф. Порівняльна оцінка рівня генетичного вантажу в геномі великої рогатої худоби окремих племгосподарств України. *Таврійський науковий вісник*. Херсон, 2012. Вип. 78, ч. 2 (1). С. 184–189.

204. Стародуб Л. Ф. Цитогенетичні дослідження в скотарстві України: досягнення і перспективи. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2012. Вип. 46. С. 257–260.

205. Стародуб Л. Ф. Цитогенетичний контроль великої рогатої худоби червоної польської породи. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2013. № 5 (41). URL: [http://nbuv.gov.ua/j-pdf / Nd._2013_5_9.pdf](http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd._2013_5_9.pdf).

206. Стародуб Л. Ф. Вплив екзогенних факторів на стабільність каріотипу великої рогатої худоби. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2015. Вип. 50. С. 167–173.

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

208. Стародуб Л. Ф. Стабільність каріотипу корів червоної польської породи до дії паратипових чинників. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2017. Вип. 54. С. 140–146.

209. Стародуб Л., Фурса Н. Вікова мінливість каріотипу корів сірої української породи. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2018. Вип. 55. С. 243–246.

210. Копылов К., Стародуб Л., Мохначева Н., Супрович Н. Особенности изменчивости генома крупного рогатого скота серой украинской породы по цито- и ДНК- маркерам. *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства*. Горки : БГСХА, 2019. Вып. 22 (1). С. 60–69.

211. Стародуб Л. Ф. Особливості каріотипу корів білоголової української породи. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. Харків, 2020. № 134. С. 177–185.
212. Стародуб Л. Ф., Рєзнікова Н. Л., Височанський Й. С. Каріотипова мінливість корів бурої карпатської породи. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2021. Вип. 61. С. 226–231.
213. Boettcher P., Gandini G., Martin J. F., Joshi B. K., Oldenbroek K., Sponenberg P. FAO Guidelines for the Vivo Conservation of Animal Genetic Resources (Draft). Roma : FAO, 2011. 127 p.
214. Gibala M. Koni guczulskoyi porody. Istoriya porody. URL: [http: / huculu-hjlska-ukraina/eu/uk/hucul_ hist _uk.html](http://huculu-hjlska-ukraina/eu/uk/hucul_hist_uk.html).
215. Korbel Tadeusz. Ogiery reprodukcyjne. Państwowych Zakładów Chowu Koni. Wydawnictwo Ministerstwa Rolnictwa i Reform Rolnych. 1933.
216. Pocztówka, wysłana ze Sądowej Wiszni do Wiednia 1908 roku. Na ten czas, wszystko już było zbudowano i ogrodzono : [zdjęciu: 1].
217. Pocztówka z około 1909 roku. Brama Główna i Kantyna, oraz kryta ujeżdżalnia: [zdjęciu: 2].
218. Romanenko G. V. Istorychni aspekty` rozvedennya ta zberezheniya porody` guczulskyykh konej na ukrayinskykh zemlyakh u skladі Polshhi v mizhvoyennyj period. *Naukovo-teorety`chnyj almanax «Grani»*, 2018. URL : [https: //grani.org.ua / index.php / journal / article / download](https://grani.org.ua/index.php/journal/article/download).DOI: 10/15421/171818
219. Эрнст Л. К., Жигачев А. И. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупномасштабной селекции. Москва, 2006. 383 с.
220. Джус П. П., Костенко С. О., Супрун І. О. Міжпородна диференціація коней за цитогенетичними параматрами. *Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С. З. Гжицького*. Серія : Біологічні науки. 2011. Т. 13. № 4 (2).С. 58–62.

221. Костенко С. О., Стародуб Л. Ф. Цитогенетичне тестування російської рисистої породи коней. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2009. Вип. 43. С. 187–192.
222. Rischowsky B., Pilling D. FAO The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome : FAO, 2007. 511 p.
223. Adhoc Task Force on Transboundary Biosphere Reserves. *Proc. Seville +5 Int. Meeting of Experts* (23-27 Oct. 2000, Pamplona, Spain) : MAB Report Series. P. 55.
224. Дідух Я. П., Черінько П. М. Концепція формування системи транскордонних біосферних резерватів (ТБР) в контексті забезпечення умов для переходу на збалансований розвиток України. *Національна екологічна політика в контексті європейської інтеграції України* : матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. (27 жовт. 2010, Київ). Київ : Центр екологічної освіти та інформації, 2010. С. 25–30.
225. Загородній А. Г., Черінько П. М., Полторацька Т. В. Національна мережа біосферних резерватів ЮНЕСКО в Україні (до 40-річчя Національного комітету України з програми ЮНЕСКО «Людина і біосфера»). *Вісник Національної академії наук України*. 2014. № 2. С. 55–66.
226. Дригант Д. М. Таксономія та еволюція плейстоцен-голоценових коней на Передкарпатті і Волино-Поділлі. *Наукові записки Державного природознавчого музею*. Львів, 2016. Вип. 32. С. 171–194.
227. Дригант Д. М. Еквіди (рід *Equus* L., 1758) плейстоцену Передкарпаття. *Наукові записки НТШ. Геол.зб.* Львів, 2012. Вип. 30. С. 69–89.
228. Кузьмина И. Е. Лошади Северной Евразии от плиоцена до современности. *Труды зоологического института Российской академии наук*. Москва, 1977. Т. 273. С. 223.

229. Громова В. И. История лошадей (рода Equus) в Старом Свете. *Труды Палеонтологического института АН СССР*. Москва, 1949. Т. 17, вып. 1, ч. 1. С. 373.
230. Radulesco C., Samson P. Quelques observations sur Equus scythicus. *Zoologischer Anzeiger*. 1962. Vol. 169. P. 347–356.
231. Белан Н. Г. Широкопалая лошадь в позднем плейстоцене на Украине. *Вестник зоологии*. 1986. № 1. С. 50–63.
232. Skorkowski E. Krytyczne uwagi o „Tarpanie leśnym”. *Kosmos. Ser. A. Rozprawy*. 1934. T. 59, № 2. P. 39–47.
233. Program ochrony zasobów genetycznych koni rasy konik polski : Załącznik nr 2 do rozporządzenia nr 14/17 z dnia 3 kwietnia 2017 r.
234. Дідух Я. П., Черінько П. М. Концепція формування системи транскордонних біосферних резерватів (ТБР) в контексті забезпечення умов для переходу на збалансований розвиток України. *Національна екологічна політика в контексті європейської інтеграції України* : матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. (27 жовт. 2010, Київ). Київ : Центр екологічної освіти та інформації, 2010. С. 25–30.
235. Проект Створення центру розведення та збереження нащадків диких коней тарпанів / М-во екології та природних ресурсів України. Яворівський національний природний парк. Львів, 2015.
236. Tjitze van Vuure Van kaikant ot konik feitenen beeld vorming rondhet Europes e wilde paard end e Poolse konik : Academisch Proefs chriffter verkrijgingvande graad Doctora and eVrije Universiteit Amsterdam / door Tjitzevan Vuure. - vande Faculteit der Aard- en Levens weten schappen opvri, 2014.
237. Чемыртан Г. Д. Остатки домашней лошади энеолита на территории Молдавии. *Четвертичные и неогеновые фауны и флоры Молдавской ССР*. Кишинев : Штиинца, 1980. С. 49–55.

238.Дзіцюк В. В. Використання цитогенетичних методів у селекції плідників. Київ : Аграрна наука, 2009. 60 с.

239. El-Zein R. A., Schabath M. B., Etzel C. J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk. *Cancer. Res.* 2006. Vol. 66, № 12. P. 6449–6456.

240. 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. Т. 21. № 1. С. 65-72.

241. 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.

242. Starodub L. Features of the karyotype of the Ukrainian aboriginal Hutsul breed of horses. *Весці 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.

243. 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 : матеріали міжнар. наук.-практ. конф. (50-річчю з часу створення Західного наукового центру присвячується)* 11 трав. 2021 р. Львів. Львів : СПОЛОМ, 2021. С. 62–64.

244. Громова В., Дуброво И. А. Семейство Equidae Gray, 1821. *Плейстоцен Тирасполя.* Кишинев : Штиинца, 1971. С. 108–124.

245. Підоплічко І. Г. Новгородсіверська верхньочетвертинна фауна. *Матеріали до вивчення минулих фаун УРСР.* 1938. Вип. 1. С. 3–95.

246. Підоплічко І. Г. Огляд палеонтологічних знахідок за 1917-1937 рр. Ч. 1. *Матеріали до вивчення минулих фаун УРСР.* 1938. Вип. 1. С. 97–176.

247. Татаринів К. А. Позднекайнозойские позвоночные запада України. Луцьк : Надстир'я, 2000. 254 с.
248. Кузьмина И. Е. Лошади Северной Евразии от плиоцена до современности. *Труды Зоологического института РАН*. 1977. Т. 273. 223 с.
249. Цалкин В. И. Древнейшие домашние животные Восточной Европы : монография. Москва : Наука, 1970. 280 с. (Материалы и исследования по археологии СССР № 161).
250. Журавльов О. П., Охріменко Г. В. Палеозоологічні дані з пам'яток КЛСК Волині. *Археологічні пам'ятки та історія стародавнього населення України*. Луцьк, 1994. Вип. 1. С. 160.
251. Биби́кова В. И., Белан Н. Г. Раннеголоценовый тарпан на территории северо-западного Причерноморья. *Вестник зоологии*. 1981. № 3. С. 21–26.
252. Mashkour M. Equids in Time and Space: papers in honour of Véra Eisenmann 6 Proceedings of the 9th conference of the International Council for Archaeozoology, (Durham 2002). Oxford; Oxbow Books. *Environmental Archaeology: The Journal of Human Palaeoecology*, 2006. Vol. 13. P. 97–99.
253. Белан Н. Г. Широкопалая лошадь в позднем плейстоцене на Украине. *Вестник зоологии*. 1986. № 1. С. 50–63.
254. Биби́кова В. И. Остатки субфосильного тарпана на Украине. Основные проблемы териологии: *Эволюция, зоогеография, экология и морфология млекопитающих и происхождение домашних животных*. М., 1962. № 6. С. 97–114.
255. Даниленко В. Н. Енеоліт України. Київ, 1974. С. 174.
256. Журавльов О. П., Котова Н. С. Тваринництво неолітичного населення України. *Археологія*. 1996. № 2. С. 3–17.

257. Журавльов О. П. Животноводство и охота у племен эпохи бронзы на территории Северного Причерноморья и Приазовья. *Древнейшие общности земледельцев и скотоводов Северного Причерноморья (V тыс. до н. э.-V в. н. э.)*. Киев, 1991. С. 137–138.

258. Телігін Д. Я. Дніпро-донецька культура. *Археологія*. 1996. № 2. С. 210.

259. Бибикова В. И. Из истории голоценовой фауны позвоночных в Восточной Европе. *Природная обстановка и фауна прошлого*. Киев, 1963. Т. 1. С. 132–133.

260. Musil R. Die Equiden aus dem Trawertin von Ehringsdorf. Abh. zentr. geol. Inst. Berlin, 1975. Vol. 23. P. 265–336.

261. Musil R. Die Equiden-Reste aus dem Pleistozän von Senborn bei Weimar. Paläontologische Abhandlungen. Abt. A. Paläozoologie. 1969. 3, Hf. 3/4.

262. Vetulani T. Dalsze badania nad konikiem polskim. *Bull. Intern. de l'Académie Polonaise des Sci. et des Lett. Cl. sci. mat. et natur. Ser. B: sci. nat.* Cracovie, (1927). 1928. № 7 B. P. 835–949.

263. Браунер А. Четвертичная лошадь (*Equus Khomenkoi* nov. sp.) из торфяника с. Троицкого нар. Ю. Буг. *Ежегодник Русского Палеонтологического общества*. 1925. Т. 5, ч. 1. С. 39–48.

264. Верещагин Н. К., Лазарев П. А. Описание частей трупа и скелетных остатков североамериканской лошади. *Фауна и флора антропогена Северо-Востока Сибири*. Ленинград : Наука, 1977. С. 85–185.

265. Підоплічко І. Г. Матеріали до вивчення минулих фаун УРСР. Вип. 2 / АН УРСР, Ін-т зоології. Київ, 1956. 235 с.

266. Eisenmann V. Quaternary horses: possible candidates to domestication. Intern. Union of Prehistoric and Protohistoric sciences. *Proc. of the XII Congress*.

Vol. 6. T. 1. Workshop 3. The horse: its domestication, diffusion and role in past communities. 1996. P. 27–36.

267. Eisenmann V. La domestication du cheval: nouvelles dcouvertes, nouvelles approches. Institut du cheval, 1997. P. 79–86

269. Eisenmann V., Cregut E., Moigne A.-M. *Equus mosbachensis* et les grand Chavaux de la Caune de l'Arago et de Lunel-Viel: crâniologie comparée. *Bull. Mus. nat. Hist. nat.* 1985. 4 ser. 7 (2), section C. P. 157-173.

269. Eisenmann V., Cregut E., Moigne A.-M. *Equus mosbachensis* et les grand Chavaux de la Caune de l'Arago et de Lunel-Viel: crniologie compare. *Bull. Mus. nat. Hist. nat.* 1985. 4 ser. Vol. 7 (2), section C. P. 157–173.

270. Forsten A., Dimitrijevi V. Pleistocene horses (genus *Equus*) in the central Balkans. *Annales Gologiques de la Pninsule Balkanique*. 2004. Vol. 65. P. 55–75.

271. Moigne A.-M., Palombo M. R., Belda V. et all. Les faunes de grand mammifres de la Caune de l'Arago (Tautavel) dans le cadre biochronologique des faunes du Plistocne moyen italien. *L'antropologie*. 2006. Vol. 110. P. 788-831.

272. Bellai D. Le cheval du gisement plistocne moyen de la Caune de l'Arago (Tautavel, Pyrnes Orientales, France). *Quaternaire*. 1998. Vol. 9 (4). P. 325-335.

273. Bennett D., Hoffmann R. S. *Equus caballus*. *Mammalian Species*. 1999. Iss. 628. P. 1–14.

274. Boulbes N. Le cheval de Romain-la-Roche, *Equus achenheimensis* (Mammalia, Perissodactyla). Contribution la biochronologie des quids caballins au Plistocne moyen. *Revue de Palobiologie*. Genve, 2010. Vol. 29 (2). P. 747–770.

275. Cardoso J. L., Eisenmann V. *Equus caballus antunesi*, nouvelle sous-espece Quaternaire du Portugal. *Palaeovertebrata*. Montpellier, 1989. Vol. 19 (2). P. 47–72.

276. Clot A. Faune Magdalnienne de la Grotte de Labastide. (Hautes-Pyrnes, France). *Munibe (Antropologia-Arkeologia)*. 1988. Vol. 40. P. 21-44.

277. Mc Givney B.A., Campana M.G., Gu J., Andersson L.S., Barrett E., Davis C.R., Mikko S., Stock F., Voronkova V., Bradley D.G., Fahey A.G., Lindgren G., Machugh D.E., Sulimova G., Hill E.W. The genetic origin and history of speed in the Thoroughbred racehorse. *Nature Communications*. 2012. №3. P. 186-195/
doi:10.1038/ncomms1644.

278. Потокина Е. К., Александрова Т. Г. Методы классификации внутривидового разнообразия по результатам молекулярного маркирования. *Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века : материалы Всерос. конф. Петрозаводск, 2008. Ч. 3. С. 62–65.*

279. Gitzendanner M.A., Soltis P.S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am. J. Bot.* 2000. Vol. 87. P. 783–792.

280. Boronnikova S. V. Molekuljarno-genetičeskij analiz genofondov redkich i isčezajuščich vidov rastenij Permskogo kraja : avtoref. diss. ... d-ra boil. nauk. Ufa, 2009. 44 p.

281. Epplen C., Melmer G., Siedlaczek I. On the essence of ‘meaningless’ simple repetitive DNA in eukaryote genomes. *DNA Fingerprintin: State of the Science*. Birkhauser Verlag, Basel Switzirland, 1993. P. 29–45.

282. You-Chun Li, Abraham B. Korol, Tzion Fahima, Avigdor Beiles and Eviatar Nevo. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 2002. Vol. 11 (12). P. 2453–2465.

283. Chang D. K., Metzgar D., Wills C., Boland C. R. Microsatellites in the eukaryotic DNA mismatch repair genes as modulators of evolutionary mutation rate. *Gen. Research*. 2001. Vol. 11. P. 1145–1146.

284. Catasti P., Chen X., Mariappan S. V., Bradbury E. M., Gupta G. DNA repeats in the human genome. *Genetica*. 1999. Vol. 106. P. 15–36.

285. Gihan M. Hashem, Jin-Der Wen, Quynh Doand Donald M. Gray. Evidence from CD spectra and melting temperatures for stable Hoogsteen-paired oligomer duplexes derived from DNA and hybrid triplexes. *Nucleus Acidis Research*. 1999. Vol. 27 (16). P. 3371–3379.

286. Peelman L. J., Mortiaux F., Van Zeveren A., Dansercoer A. Evaluation of the genetic variability bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Anim. Genet*. 1998. Vol. 29 (3). P. 161–168.

287. Asher C. Patterns of genetic diversity in populations of two bat species (*Sturnira ludovici* and *Artibeus toltecus*) in Cusuco National Park, Honduras. *Bioscience Horizons*. 2009. Vol. 2. № 2. P. 147–154.

288. Peelman L. J., Mortiaux F., Van Zeveren A., Dansercoer A. Evaluation of the genetic variability bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Anim. Genet*. 1998. Vol. 29(3). P. 161–167.

289. Yeh F. C., Young R. C., Mao J. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Department of Renewable Resources, Univ. of Alberta, Edmonton. Alta, 1999. 283 p.

290. Chu M.X., Jiao C.L., He Y.Q., Wang J.Y., Liu Z.H., Chen G.H. Association between PCR-SSCP of bone morphogenetic protein 15 gene and prolificacy in Jining Grey goats. *Animal Biotechnology*. 2007. № 18. P. 263-274

291. Williams J. G. K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 1990. Vol. 18. P. 6531–6535.

292. Гавриличева И. С. Идентификация и паспортизация генотипов лошадей по микросателлитам ДНК. *Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии* : сб. тез. докл. Всерос. молодеж. науч. конф. Москва, 2017. С. 24–27.

293. Нестерук Л. В. Генетический полиморфизм романовской породы овец : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.07. Москва, 2016. 22 с.

294. Abbot P. Individual variation in invertebrates revealed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science*. 2001. V.1. №8. P. 1-3

295. Hendrickson S. L. A genome wide study of genetic adaptation to high altitude in feral Andean horses of the paramo. *BMC Evolutionary Biology*. 2013. Vol. 13. P. 273. Doi: 10.1186/1471-2148-13-273.

296. Изюмов Ю. Г., Литвинова Е. М., Шварцман П. Я. Реализация повреждений, индуцированных этиленамином на разных стадиях сперматогенеза, при хранении спермы в семяприемниках интактных самок. *Химический мутагенез* : сб. науч. трудов. Ленинград : Изд-во ЛГПИ им. А. И. Герцена, 1976. С. 64–70.

297. Столповский Ю.А., Лазебный О.Е., Столповский К.Ю., Сулимова Г.Е. Применение межмикросателлитного анализа ДНК для оценки популяционной структуры, идентификации и сходства генофондов пород и видов domesticированных животных. *Генетика*. 2010 б. Т. 46. № 6. С. 825-833.

298. Календарь Р. Н., Боронникова С. В. Анализ молекулярно-генетического полиморфизма природных популяций редких видов растений Урала с помощью ретротранспозонов. *Биотехнология состояние и*

перспективы развития : материалы четвертого Моск. междунар. конгресса. Москва, 2007. Ч. 2. С. 121.

299.Лядова Н. С., Полковникова В. И. Эффективность использования лошадей разной типологии в досуговом коневодстве Пермского края. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2013. № 4 (42). С. 128–132.

300. Нестерук Л. В., Макарова Н. Н., Свищева Г. Р., Столповский Ю. А. Оценка генетического разнообразия романовской породы овец с помощью коэффициента генетической оригинальности на основе данных ISSR-фингерпринтинга. *Генетика*. 2015. Т. 51, № 7. С. 847–852.

301. Потокина Е. К., Александрова Т. Г. Методы классификации внутривидового разнообразия по результатам молекулярного маркирования. *Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века* : материалы Всерос. конф. Петрозаводск, 2008. Ч. 3. С. 62–65.

302. Keyser C. и др. Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people. *Hum. Genet.* 2009. P. 95–120.

303.Эркенов Т. А. Генетическая структура и внутривидовая дифференциация карачаевской лошади : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Москва, 2015. 23 с.

304. Эрнст Л. К., Зиновьева Н. А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. Москва : РАСХН, 2008. 501 с.

305. Erkenov T. A. Generation of Molecular Genetic Markers in Studies of Genetic Structures of Horses. *International Journal of Environmental Problems*. 2017. Vol. 3, Iss 1. P. 36–46.

306.Glazko V. I. Genetic Structure of Karachai Horses on ISSR-PCR Markers. *Biogeosystem Technique*. 2016. Vol. 9, Iss 3. P. 195–204.

307. Kimura M., Crow J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics (US)*. 1964. Vol. 49. P. 725–738.
308. Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York : Columbia University Press, 1987. 512 p.
309. Ling Y. Identification of y chromosome genetic variations in Chinese Indigenous horse breeds. *J. Hered.* 2010. P. 325–338.
310. Yeh F. C., Young R. C., Mao J. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. Department of Renewable Resources, Univ. of Alberta, Edmonton. Alta, 1999. 283 p.
311. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994. Vol. 20. P. 176–183.
312. Williams J. G. K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 1990. Vol. 18. P. 6531–6535.
313. Молекулярная генетика : учеб.-метод. пособие / под ред С. В. Боронниковой. Пермь : Перм. ун-т, 2007. 150 с.
314. Светлакова Т. Н., Бобошина И. В., Нечаева Ю. С. Генетическая дифференциация популяций *Populus tremula* L. в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-маркеров. *Аграрный Вестник Урала*. 2012. № 3 (95). С. 11–13.
315. Brunner A. M, Busov V. B., Strauss S. H, Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends in Plant Science*. 2004. Vol. 9, Iss 1. P. 49–56.

316. Chen Ke, Peng Youhong. AFLP analysis of genetic diversity in *Populus Cathayana* Rehd originating from southeastern Qinghai-tibetan plateau of China. *Pakistan Journal of Botany*.2010. Vol. 42. No. 1. Pp.117–.

317. Gao J., Zhang S., Qi L., Zhang Y. Application of ISSR-Markers to Fingerprinting of Elite Cultivars (Varieties/Clones) From Different Sections of the Genus *Populus*L. *Silvae Genetica*. 2006. Vol. 55, Iss 1. P. 1–6.

318. Jansson, Stefan; Bhalerao, Rishikesh; Groover, Andrew. Genetics and Genomics of *Populus*. Series : Plant Genetics and Genomics. Crops and Models, 2010. Vol. 8.

319. Karron J. D. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evol. Ecol*. 1987. Vol. 1. P. 47–58.

320. Kimura M., Crow J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. (US). 1964. Vol. 49. P. 725–738.

321. Lexer C, Fay M. F., Joseph J. A. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. *Molecular Ecology*. 2005. Iss. 14. P. 1045–1057.

322. Li shifeng, Zhangbo, Chen yin. Analysis of Genetic Diversity of *Populus deltoides* gemplasm by SSRs. *International poplar symposium*. Nanjing, 2006. China.

323. Nei M. Genetic distance between populations. *Naturalist*. 1972. Vol. 106. P. 283–292.

324. Nei M. Molecular evolutionary genetics. N. Y. : Columbia Univ. press, 1987. 512 p.

325. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, 1975. 278 p.
326. Nei M, Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction en-donucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987. Vol. 76. P. 5269–5273.
327. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. Москва : Наука, 1989. 328 с.
328. Алтухов Ю. П., Рычков Ю. Г. Популяционные системы и их структурные компоненты. Генетическая стабильность и изменчивость. *Журнал общей биологии*. 1970. Т. 31, № 5. С. 507–525.
329. Алтухов Ю. П. Генетика природных популяций и ресурсы биосферы. *Вестник академии наук СССР*. 1975. № 10. С. 37–45.
330. Алтухов Ю. П. Молекулярная эволюция популяций. *Молекулярные механизмы генетических процессов*. Москва : Наука, 1985. С. 100–131.
331. Мохначова Н., Стародуб Л., Добрянська М. Оптимізація методу виділення ДНК з викопних решток. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2020. Вип. 60. С. 110–115.
332. Копилов К. В., Дзіцюк В. В., Стародуб Л. Ф., Мохначова Н. Б. Методика з проведення молекулярно-генетичних досліджень аборигенних та малочисельних порід сільськогосподарських тварин : метод. рек. Чубинське, 2017. 32 с.
333. 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 : метод. рек. Чубинське, 2020. 35 с.

334. Kusliy M. A. Genotyping and coat colour detection of ancient horses from Altai and Buryatia: comparison with modern populations //Abstracts at the conference «Symbiosis-Russia 2015» (October 5-9, 2015, NSU, Novosibirsk, Russia)

335. Rogers S. O, Bendich A. J., Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*. 1985. Vol. 5. P. 69–76.

336. Wang J., Wu Y., Ren G, Guo Q, Liu J. Genetic Differentiation and Delimitation between Ecologically Diverged *Populus euphratica* and *P. pruinosa*. *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6(10). P. e26530. doi:10.1371 / journal. pone.0026530.

337. Петухов В. Л., Жигачов А. И., Назарова Г. А. Ветеринарная генетика. 2-е изд., перераб. и доп. Москва : Колос, 1996. 384 с.

338. Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства / ФАО, ВИЖ РАСХН. Москва, 2007. С. 67.

339. Иванов К. М. Методические рекомендации по разведению крупного рогатого скота в малочисельной популяции. Ленинград, 1977. 57 с.

340. Пестерова Е. Л., Сидорова О. Г. Состояние и перспективы развития инвазивной пренатальной цитогенетической диагностики в Республике Саха (Якутия). *Якутский медицинский журнал*. 2008. № 4. С. 40–43.

341. Положення про порядок проведення генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин. *Нормативні документи з проведення генетичної експертизи племінних тварин*. Київ : ППНВ, 2006. С. 3–11.

342. Цитогенетические последствия инвазии *Opisthorchis felinus* у людей живущих в зоне влияния радиационных производств Сибирского

химического комбината / Н. Н. Ильинских, Е. Н. Ильинских, Е. В. Ямковая, Н. Н. Ильинских. Режим доступа : <http://ant.mi.ru/6ant/itom.pdf>.

343. Берестяна А. М., Гродзинський Д. М. Роль мутагенних факторів в процесі старіння живих організмів. *Науковий вісник Ужгородського університету*. Серія : Біологія. 2011. Вип. 30. С. 118–127.

344. Глазко Т. Т. Дестабілізація хромосомного апарату в різних таксонах тварин як показник екологічних змін : автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук : 03.00.16. Київ, 2001. 32 с.

345. Горова А. І. Методологічні аспекти оцінки генетичних наслідків техногенезу. *Екологія і природокористування*. Дніпропетровськ, 2001. Вип. 3. С. 143–151.

346. Уханов С., Столповский Ю., Банникова Л., Зубарева Л., Иванова З., Вердиев З. Генетические ресурсы крупного рогатого скота: редкие и исчезающие отечественные породы. Москва : Наука, 1993. 170 с.

347. Kusliy M. A., Vorobieva N. V., Druzhkova A. S., Tishkin A. A., Iderkhangai T. O., Makunin A. I., Popova K. O., Trifonov V. A., Graphodatsky A. S. Genotyping of ancient horses of arzhan-mayemir and hunny time Mongolian archaeological sites. *Genetica*. 2020. Vol. 5. P. 27–35.

348. Дмитриев Н. Г. Породы скота по странам мира. Ленинград, 1978. 353 с.

349. Буркат В. П. Розведення тварин і збереження їхнього генофонду. *Вісник аграрної науки*. 2006. № 3-4. С. 100–105.

350. Кочнева М. Л., Петухов В. Л. Межвидовая изменчивость цитогенетических параметров крови животных : материалы междунар. науч. конф., посвящ. 100-лет. со дня рождения основателя института, заслуж. деятеля науки РСФСР, проф. М. М. Лебедева, 9-11 июня 2009 г. 2009. Ч. 2. С. 133–137.

351. Кузнецов А. И., Кружалов А. И. Возрастно–половая зависимость спонтанной частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови человека. *Генетика*. 1980. № 7. С. 1279–1293.

352. Родькина Л. И. Возрастные изменения митотической активности и спонтанных хромосомных aberrаций в клетках различных тканей животных : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1970. 19 с.

353. Лежава Т. А. Морфо-функциональная характеристика хромосом в старческом возрасте : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Ленинград, 1983. 33 с.

354. Jarwik L. F., Jan, F. S. Fu, Natsuyama S. Chromosomes in old age: a six year longitudinal study. *Hum. Genet.* 1976. Vol. 33. Iss. 1. P. 17–22.

355. Yen F., Matsuyama S. S., Jarvik L. F. Survival of octogenarians: six year after initial chromosome examination. *Exp. Aging Res.* 1976. Vol. 2. Iss. 1. P. 17–26.

356. Горовая А. И., Климкина И. И. Использование цитогенетического тестирования для оценки экологической ситуации и эффективности оздоровления детей и взрослых природными адаптогенами. *Цитология и генетика*. 2002. Т. 36, № 5. С. 21–25.

357. Migliore L., Colognato R., Naccarati A. Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study. *Mutagenesis*. 2006. Vol. 21 (2). P. 149–152.

358. Pellicer J. A., Pertusa J., Alcober V. Binuclear cells in the Ehrlich ascites tumor. Action of 5-fluorouracil. *Biol. Cell*. 1987. Vol. 60. P. 255–258.

359. Kusliy M. A. Molecular genetic analysis of ancient horse bone samples from the Botai circle site of Novoilinka-III (Kulunda Steppe) // Abstracts at the international conference «Botai culture and other Eneolithic monuments of Central Asia » (April 4-6, 2019, Almaty, Kazakhstan).

360. Holeckova B., Sutiakova J., Pijakova N. Nalez Robertsonovej translokacie v chove hovadzich dobytku. *Vet. med.* 1995. Vol. 40, Iss. 2. P. 33–34.
361. Eldridge F. E. High frequency of a Robertsonian translocation in a herd of British White cattle. *Vet. Rec.* 1975. Vol. 97, Iss. 4. P. 71–73.
362. Hanada H., Takeda K., Onishi A., Geshi M. Semen characteristics of Japanese Black bulls carrying the 7/21 robertsonian translocation. *Nihon chikusan gakk aiho. Anim. Sci. and Technol.* 1997. Vol. 68, Iss. 9. P. 827–831.
363. Lui J. F., Brule A. O., de Queiroz S. A., Garcia M. C. C. Effect of 1:29 translocation on the productive performances of pitanguias heifers. *Ars. vet.* 1997. Vol. 14, Iss. 2. P. 126–134.
364. Lucas J. N., Deng W. Views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH. *Radiat. Protect. Dosimetry.* 2000. Vol. 88, Iss. 1. P. 77–86.
365. Darroudi F. Use of FISH translocation analysis for retrospective biological dosimetry: how stable are stable chromosome aberrations. *Radiat. Protect. Dosimetry.* 2000. Vol. 88, Iss. 1. P. 101–109.
366. Press S., Romm H., Ganguly B. B., Stephan G. Experience with FISH-detected translocations as an indicator in retrospective dose reconstruction. *Radiat. Protect. Dosimetry.* 2000. Vol. 88, Iss. 1. P. 45–49.
367. Воробцова И. Е., Такер ДЖ. Д., Тимофеева Н. М. Влияние возраста и облучения на частоту транслокаций и дицентриком, определяемых методом FISH в лимфоцитах человека. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2000. Т. 40, № 2. С. 142–148.
368. Костенко С. О. Методологія використання цитогенетичних маркерів у селекції продуктивних тварин. *Методологія наукових досліджень з питань селекції, генетики та біотехнології у тваринництві.* Київ : Аграрна наука, 2010. С. 73–74.

369. Болтіна І. В. Вікові особливості співвідношення рівня ситуативної тривожності та значень цитогенетичних показників у лімфоцитах периферичної крові. *Проблемы старения и долголетия*. 2009. Т. 18, № 3. С. 328–333.

370. Ковалева О., Бурдо Е., Кобозева Н., Глазко Т. Разнообразие меж- и внутривидовых мутационных спектров у некоторых видов мышевидных грызунов. *Фауна в антропогенном окружении. Работы териологической школы*. 2006. Вып. 8. С. 81–85.

371. Горова А. І. Методологічні аспекти оцінки генетичних наслідків техногенезу. *Екологія і природокористування*. Дніпропетровськ, 2001. Вип. 3. С. 143–151.

372. Клестова З. С., Собко А. И., Прискока В. А. Методические рекомендации по обнаружению, учету aberrаций хромосом клеток свиней при вирусных инфекциях. Киев, 2005. 24 с.

373. Tanchev S., Georgieva S., Zhelyazkov E., Popov B. Comparative study of karyotype mutability in inbred and outbred rabbits after gamma irradiation. *Trakia Journal of Sciences*. 2006. Vol. 4, Iss. 1. P. 27–32.

374. Пономарева А. В., Матвеева В. Г. Исследования цитогенетических нарушений у жителей Алтая в зонах радиационного загрязнения. *Сибирский экологический журнал*. 2000. № 1. С. 73–78.

375. Колубаева С. Н. Хромосомные aberrации, микроядра и апоптоз в лимфоцитах при радиационных воздействиях и других патологических состояниях : автореф. дис. д-ра биол. наук : 03.01.01. Обинск, 2010. 39 с.

376. Voitovich A. M., Afonin V. Y., Krupnova E. V. The level of aberrant cells in various tissues of bank vole depending on doses and radionuclide balance in organism *Tsitol. Genet.* 2003. Vol. 37, Iss. 4. P. 10–15.

377. Sahu K., Das R. K. Micronucleus assay in pulmonary alveolar macrophages, a simple model to detect genotoxicity of environmental agents

entering through the inhalation route. *Mutation Research*. 1995. Vol. 347, Iss. 2. P. 61–65.

378. El-Zein R. A., Schabath M. B., Etzel C. J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk. *Cancer. Res.* 2006. Vol. 66, Iss. 12. P. 6449–6456.

379. Хохлов А. М. Распространение генетических аномалий в популяциях домашних животных. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Київ, 2010. С. 458–463.

380. Шельов А. В. Порівняння показників міжвидової хромосомної мінливості свійських тварин. *Матеріали V конференції молодих вчених та аспірантів*. Київ : Аграрна наука, 2007. С. 106.

381. Iannuzzi L., Berardino D. D. Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animalcytogenetics. *The oretical and Applied Genetics*. 2008. Vol. 49 (4). P. 357–366.

382. Копилов К. В. Стан та перспективи використання генотипного маркування в селекції тварин. *Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2010. Т. 8, № 2. С. 223–228.

383. Haley C. Genetical genomics in livestock: potentials and pitfalls. *Animal Genetics*. 2007. Vol. 37. P. 10–12.

384. Luikart G., England P., Tallmon D., Jordan S., Taberlet P. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*. 2003. Vol. 4. P. 981–994.

385. Bruford M., Bradley M., Luikart G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Review Genetics*. 2003. Vol. 4. P. 900–910.

386. Boel M. Genetic resources in agriculture. A summary of the projects co-financed under Council Regulation. 2007. 50 p.

387. Cockett N., Kole E. Genome mapping and genomics in domestic animals. Chittaranjan, Springer, 2009. 280 p.
388. Avise J. C. Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer, 2003. 684 p.
389. Глазко В. И., Цветков И. Л., Созинова Л. Ф., Глазко Т. Т. Молекулярно-генетические маркеры полиморфизма ДНК и их геномное позиционирование. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2009. № 3. С. 11–14.
390. Measures of genetic diversity. URL: <http://irc.igd.cornell.edu/MolecularMarkers/04Measures.pdf>
391. Зиновьева Н. А., Гладырь Е. А., Эрнст Л. К., Брем Е. А. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных. Дубровицы, 2002. 112 с.
392. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. Москва : Академкнига, 2003. 431 с.
393. Gholizadeh M., Mianji G., Zadeh H. Potential use of molecular markers in the genetic improvement of livestock. *Asian journal animal veterinary advanch*. 2008. Vol. 3(3). P. 120–128.
394. Geldermann H. Genome analysis in domestic animals. *Genetics*. 1994. Vol. 134. P. 943–951.
395. Teneva A. Molecular markers in animal genome analysis. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 2009. Vol. 25(5-6). P. 1267–1284.
396. Warren E. Mathematical population genetics. Cornell University. 2006. URL: <http://www.fulviofrisone.Com/attachments/article/417/cornelllect.pdf>
397. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1973. Vol. 70. P. 3321–3323.

398. Saitou N., Nei M. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 1987. Vol. 4. P. 406–425.

399. Askari1 N., Mohammadreza M., Baghizadeh A. ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iranian journal of biotechnology*. 2011. Vol. 9 (3). P. 222–229.

400. Zagaroza M., Alarriba J, Amorena B. Genetic distances between rabbit breeds presently bred in Spain. *Animal blood groups and biochemical genetics* : 19 International conference on animal blood groups and biochemical polymorphisms. Gottingen, 1987. P. 22–23.

401. Kimura M., Ohta T. Theoretical Aspects of Population Genetics. Princeton : Princeton University Press, 1971. 219 p.

402. Meuwissen T., Hayes B., Goddard M. Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps Hayes. *Genetics*. 2001. Vol. 157. P. 1819–1829.

403. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*. 1994. Vol. 20. P. 176–183.

404. Столповский Ю. А., Шимит Л. В., Евсюков А. Н., Рузина М. Н., Чургуй О. И., Сулимова Г. Е. Анализ генетической изменчивости и филогенетических связей у популяций тувинской короткожирнохвостой овцы с использованием ISSR-маркеров. *Сельскохозяйственная биология*. 2009. № 6. P. 34–43.

405. Prevost A. A, Wilkinson M. New system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 1999. Vol. 98. P. 107–112.

406. Joshi S. P., Gupta V. S., Aggarwal P. K, Ranjekar P. K, Brar D. S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* 2000. Vol. 100. P. 1311–1320.

407. Cekic C., Battey N., Wilkinson M. The potential of ISSR-PCR primer pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor. Appl. Genet.* 2001. Vol. 103. P. 540–546.

408. Сулимова Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и область применения. *Электронный журнал лаборатории сравнительной генетики животных ИОГЕН им. Н. И. Вавилова, РАН*. 2004. URL: [http:// www. labsgj. by. ru](http://www.labsgj.by.ru)

409. Чесноков Ю. В. ДНК-фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений. *Сельскохозяйственная биология*. 2005. № 1. С. 20–40.

410. Beuzen N. D., Stear M. J., Chang K. C. Stear Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*. 2000. Vol. 160(1). P. 42–52.

411. Mackill D. J., Ni J. Molecular mapping and marker assisted selection for major-gene traits in rice. *Proc. Fourth Int. Rice Genetics Symp.*, 2000. P. 137–151.

412. Лукашов В. В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. Москва : БИНОМ, 2009. 253 с.

413. Даншин В. А. Оценка генетической ценности животных. Киев : Аграрна наука, 2008 180 с.

414. Сметанин В. Т. Сохранение изменчивости в популяциях. *Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету*. 2008. № 2. С. 240–248.

415. Подоба Б. Є., Копилов К. В., Ковтун С. І., Копилова К. В., Подоба Ю. В., Добрянська М. Л. Молекулярно-генетичні та біотехнологічні дослідження в галузі тваринництва. Київ : Аграрна наука, 2013. 246 с.

416. Кузнецов В. М. Стратегия развития генетической оценки животных в XXI веке. *Здоровье–питание–биологические ресурсы* : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-лет. со дня рожд. Н. В. Рудницкого. Киров : НИИСХ Северо-Востока, 2002. Т. 2. С. 299–310.

417. Глазко В. И., Дымань Т. Н., Тарасюк С. И., Дубин А. В. Полиморфизм белков, RAPD-PCR и ISSR-PCR маркеров у зубров, бизонов и крупного рогатого скота. *Цитология и генетика*. 1999. Т. 33, № 6. С. 30–38.

418. Столповский Ю. А., Ахани Азари М., Евсюков А. Н., Кол Н. В., Рузина М. Н., Воронкова В. Н., Сулимова Г. Е. Сравнительный анализ полиморфизма ISSR маркеров у пород крупного рогатого скота. *Генетика*. 2011. Т. 47, № 2. С. 213–226.

419. Столповский Ю. А., Ахани Азари М., Евсюков А. Н., Кол Н. В., Рузина М. Н., Воронкова В. Н., Сулимова Г. Е. Дифференциация пород КРС с использованием данных мультилокусного межмикросателлитного анализа (ISSR). *Сельскохозяйственная биология*. 2011. № 4. С. 36–45.

420. Воронкова В. Н., Цэндсүрэн Цэдэв, Сулимова Г. Е. Сравнительный анализ информативности ISSR-маркеров для оценки генетического разнообразия пород лошадей. *Генетика*. 2011. Т. 47, № 8. С. 1131–1134.

421. Сулимова Г. Е., Кол Н. В., Рузина М. Н., Столповский К. Ю., Воронкова В. Н., Бояринцева И. С., Столповский Ю. А. Разработка универсального метода оценки генетического разнообразия и паспортизации пород и популяций domesticiрованных видов животных. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2011. Т. 12. С. 19–27.

422. Bower M. A., McGivney B. A., Campana M. G., Gu J., Andersson L. S., Barrett E., Davis C. R., Mikko S., Stock F., Voronkova V., Bradley D. G., Fahey A. G., Lindgren G., Machugh D. E., Sulimova G., Hill E. W. The genetic origin and history of speed in the Thorough bred race horse. *Nature Communications*. 2012. Vol. 3. doi:10.1038/ncomms1644.

423. Voronkova V., Sulimova G. Estimation of the genetic diversity level in local populations of Turano-Mongolian horse breeds. *Book of abstracts of the 62nd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science*. 2011. P. 186.

424. Lippold S. Discovery of lost diversity of paternal horse lineages using ancient DNA. *Nat Commun*. 2011. Vol. 2(1). P. 450.

425. Levine M. A. Botai and the origins of horse domestication. *Journal of Anthropological Archaeology*. 1999. Vol. 18(1). P. 29–78.

426. Столповский Ю. А. Сохранение культурного биоразнообразия. *Биоразнообразие и сохранение генофонда флоры, фауны и народонаселения ЦентральноАзиатского региона*. СО РАН. КЫЗЫЛ, 2003. С. 90–94.

427. Алтухов Ю. П., Захаров И. А., Столповский Ю. А. Динамика популяционных генофондов животных. *Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях* / под ред. Ю. П. Алтухова. Москва : Наука, 2004. С. 110–294.

428. Захаров И. А., Сулимова Г. Е., Столповский Ю. А. Мониторинг генофондов популяций животных в связи с задачами селекции и изучением филогении. Москва : РАН, 2005. С. 96–98.

429. Сулимова Г. Е., Столповский Ю. А., Каштанов С. Н., Моисеева И. Г., Захаров И. А. Методы управления генетическими ресурсами domesticированных животных. *Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами*. Москва : Т-во науч. изд. КМК, 2005. С. 331–340.

430. Столповский Ю. А., Захаров И. А. Генетические аспекты проблемы сохранения биологического разнообразия домашних животных. *Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России* / ред. И. А. Захаров. Москва : Наука, 2006. С. 8–22.

431. Захаров И. А., Столповский Ю. А., Уханов С. В., Моисеева И. Г., Сулимова Г. Е. Мониторинг генофондов популяций животных в связи с задачами селекции и изучении филогении. *Биоразнообразие и динамика генофондов. Динамика генофондов*. Москва, 2007. С. 122–124.

432. Баранов А. С., Столповский Ю. Л., Яблоков А. В., Баранов А. В. К сохранению генетических ресурсов сельскохозяйственных пород и сортов России. *Сборник трудов ГСХА*. Караваево, 2009. С. 28–32.

433. Столповский Ю. Л., Захаров И. А. Генофонды отечественных пород – национальное богатство России. *Вісник інституту тваринництва центральних районів УААН*. Дніпропетровськ, 2009. Вип. 5. С. 124–141.

434. Глазко В. И., Столповский Ю. А., Феофилов Ф. В., Кол Н. В. Распределение фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повтора мидитринуклеотидных микросателлитов, в геномах серого украинского скота. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2009. № 1. С. 155–162.

435. Сулимова Г. Е., Ахани Азари М., Столповский Ю. А., Лазебный О. Е., Максименко В. Ф. Сравнительное исследование полилокусных спектров фрагментов ДНК, фланкированных участков микросателлитных локусов (ISSR-PCR) стад и линий ярославской породы крупного рогатого скота. *Научные основы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных* / под ред. В. Е. Кремина. Ярославль, 2009. С. 159–163.

436. Столповский Ю. А., Ахани Азари М., Кол Н. В., Рузина М. Н., Столповский К. Ю., Сулимова Г. Е., Глазко В. И. Сравнительное

исследование полилокусных спектров фрагментов ДНК, фланкированных участками микросателлитных локусов (ISSR-PCR) у пород крупного рогатого скота. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2009. № 3. С. 89–97.

437. Столповский Ю. Л., Шимиит Л. В., Кол Н. В., Евсюков А. Н., Рузина М. Н., Чургуйоол О. И., Сулимова Г. Е. Анализ генетической изменчивости и филогенетических связей среди популяций тувинской короткожирнохвостой овцы с использованием 1 SSR- маркеров. *Сельскохозяйственная биология*. 2009. № 6. С. 34–43.

438. Глазко В. И., Столповский Ю. А. Получение подборки ДНК для микрочипов удобных для одновременного генотипирования крупного рогатого скота : метод. рек. / МСХРФ имени К. А. Тимирязева. Москва, 2009. 34 с.

439. Столповский Ю. А. Новые организационные система и принципы сохранения генофондов domesticiрованных видов животных. *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2009. № 6. С. 80–81.

440. Столповский Ю. Л., Лазебный О. Е., Столповский К. Ю., Сулимова Г. Е. Применение метода ISSR- PCR для оценки популяционной структуры идентификации и сходства генофондов пород и видов domesticiрованных животных. *Генетика*. 2010. Т. 46. № 6. С. 1–9.

441. Buoen L. C., Zhang T. Q., Weber A. F., Ruth G. R. SRY-negative, XX intersex horses: the need for pedigree studies to examine the mode of inheritance of the condition. *Equine Vet. J.* 2000. Vol. 32. P. 78–81.

442. Bugno M., Słota E., Wieczorek M., Yang F., Buczyn'ski J., Świton'ski M. Non-mosaic X trisomy, detected by chromosome painting, in an infertile mare. *Equine Vet. J.* 2003. Vol. 35. P. 209–210.

443. Kubien' E., Tischner M. Reproductive success of a mare 64,XX/65,XX+30. *Equine Vet. J.* 2002. Vol. 34(1). P. 99–100.

444. Дьомін Е. А., Бариляк І. Р, Пілінська М. А. Глосарій з радіаційної цитогенетики. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів.* 2009. Т. 7, № 1. С. 125–163.

445. Воронкова В. Н. Оценка генетического разнообразия лошадей Саяно-Алтайского региона использованием ядерных и митохондриальных ДНК-маркеров : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.01. Москва, 2012. 166 с.

446. Кочиева Е. З., Рыжова Н. Н., Храпалова И. А., Пухальский В. А. Определение генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. Методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR). *Генетика.* 2002. Т. 38, № 9. С. 1133–1142.

447. Макарова Н. Н., Нестерук Л. В., Столповский Ю. А., Москаленко Л. П., Николаева Е. А. Перспективы использования мультилокусных маркеров ДНК при сохранении и разведении романовской породы овец. *Вестник АПК Верхневолжья.* 2013. № 2 (22). С. 75–80.

448. Моисеева И. Г., Уханов С. В., Столповский Ю. А., Сулимова Г. Е., Каштанов С. Н. Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / отв. ред. И. А. Захаров. Москва : Наука, 2006. 462 с.

449. Озеров М. Ю., Марзанов Н. С., Тапио М., Марзанова Л. К., Петров С. Н., Кантанен Ю. Использование микросателлитных локусов для определения достоверности происхождения потомства овец. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.* 2007. № 2. С. 32–36.

450. Озеров М. Ю., Тапио М., Марзанов Н. С., Насибов М. Г., Шайдуллин И. Н., Кантанен Ю. Микросателлитный анализ эволюционно-генетических связей у различных пород овец. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.* 2006. № 2. С. 30–33.

ДОДАТКИ

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації у наукових фахових виданнях України

1. **Стародуб Л. Ф.**, Остаповець Л.І. Міжпородна диференціація корів порід абердин-ангус і українська чорно-ряба молочна за рівнем соматичного мутагенезу. *Біологія тварин*. Львів, 2012. Т.14. №1–2 С. 491–497. (Особистий внесок – брала участь у 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*. Херсон, 2012. Вип. 78 ч. 2(1). 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*. Київ, 2012. Вип. 46. С. 257– 260. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).
4. **Стародуб Л.Ф.** Цитогенетичний контроль великої рогатої худоби червоної польської породи. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2013. 5 (41).URL: [http://nbuv.gov.ua/j-pdf / Nd. 2013 5 9.pdf](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 лошат 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 лошат, 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 лошат на ранніх пасажах культивування *invitro*. *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.** 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*. Київ, 2015. № 50. С. 167–173

9. **Стародуб Л. Ф.** Характеристика каріотипу великої рогатої худоби сірої української породи. *Вісник аграрної науки*. Київ. 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*. Київ,

2017. Вип. 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*. Київ, 2018. Вип. 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. Том21. №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 зборі архівних матеріалів та вивченні питань по збереженню гуцульських коней, написанні статті).

14. **Стародуб Л.Ф.,** Рєзнікова Н. Л., Височанський Й. С. Каріотипова мінливість корів бурої карпатської породи. *Розведення і генетика тварин*. Київ. 2021. Вип. 61. С. 226–231. (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*. Київ,

2020. Вип. 60. С. 110-115. (Особистий внесок – брала участь в аналізі одержаних результатів та 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. № 14 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., Bezdieniezhykh 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 цито- 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. *Весці 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. (Особистий внесок – брала участь в постановці культури, одержанню метафазних пластинок, аналізі цитогенетичних препаратів, написанні статті).

Наукові праці апробаційного характеру

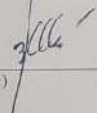
21. Костенко С., Джус П., **Стародуб Л.**, Куриленко Ю., Федорова Е. Соматический мутагенез сельскохозяйственных животных в разных радиоэкологических условиях содержания. Малые дозы. Материалы международной научной конференции, посвященной 25-летию Института радиобиологии. 26-28 сентября 2012 г. Гомель. 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. Львів : СПОЛОМ, 2021. 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 : метод. рек. Чубинське, 2017. 32 с. (Здобувачем отримано експериментальні 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: метод. рек. Чубинське, 2020. 35 с. (Здобувачем отримано експериментальні дані про мінливість каріотипу досліджуваних тварин та здійснено їх аналіз).

Погоджено Проректор з науково-педагогічної роботи  Шинкарук В.Д. (Підпис) (Прізвище, ініціали)	Затверджую Проректор з наукової роботи та інноваційної діяльності  Шинкарук В.М. (Підпис) (Прізвище, ініціали)
---	---



А К Т

про впровадження дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на
 тему: «Генетична мінливість аборигенних порід великої рогатої
худоби та коней за різними типами маркерів»

виконаної Стародуб Любов'ю Феофілівною
назва теми
ПІБ здобувача

за спеціальністю 204 «Технологія виробництва і переробки продукції
тваринництва»
 впроваджено у навчальну програму при викладанні дисциплін(и) «Генетика
тварин», «Генетика кількісних та якісних ознак тварин».
назва дисципліни

У навчальному процесі з результатів дисертаційної роботи використані
 основні методики приготування цитогенетичних препаратів, аналізу каріотипів
 різних видів свійських тварин, встановлення їх порушень, проведення
 мікроядерного тесту, ампліфікації послідовностей ДНК, фланкованих
 інвертованими повторами мікросателітів, побудова дендрограм генетичних
 відстаней між тваринами різних видів та порід із використанням методу М.
 Нея, програм TreeView X.

(необхідно конкретизувати, які результати дисертаційної роботи і яким чином (способом) використані при викладанні дисциплін(и))

на кафедрі генетики, розведення і біотехнології тварин
назва кафедри

у підготовці фахівців ОС «Бакалавр» та «Магістр»
за напрямом «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»
із спеціальності 204 «Технологія виробництва і переробки продукції
тваринництва»

назва спеціальності

Національний університет біоресурсів і природокористування України
назва ВУЗ

Декан факультету
тваринництва та водних біоресурсів



Кононенко Р.В.

Завідувача кафедри
генетики, розведення і біотехнології тварин



Рубан С.Ю.

Форма № Н - 3.04

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Кафедра генетики, розведення та біотехнології тварин

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Декан факультету

к.с.-г.н., доцент Кондратюк В.М.

“ _____ ” _____ 2020 р.

РОЗГЛЯНУТО І СХВАЛЕНОна засіданні кафедри генетики,
розведення та біотехнології тварин

Протокол № 13 від. “ 11 ” червня 2020 р.

Завідувач кафедри

_____ Рубан С.Ю.

РОБОЧА ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ**ГЕНЕТИКА КІЛЬКІСНИХ І ЯКІСНИХ ОЗНАК ТВАРИН**

(назва навчальної дисципліни)

спеціальність 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»

(шифр і назва спеціальності)

факультет Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва _____

(назва факультету)

Розробник: Костенко С.О., професор кафедри генетики, розведення і біотехнології тварин,
д.б.н., професор

Київ – 2020 р.

Продовження додатку В

1. Мета та завдання навчальної дисципліни

Дисципліна „ Генетика кількісних та якісних ознак тварин ” є однією із основних за спеціальністю 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва».

Мета - надання студентам теоретичних та практичних знань для майбутньої ефективної виробничої та науково-дослідницької діяльності щодо покращення показників продуктивності стад тварин.

Завдання:

- 1) надати фундаментальні знання щодо історії та використання сучасних та класичних методів генетичного аналізу;
- 2) навчити студентів за використання цитогенетичного аналізу тварин з метою виявляти тварин-носіїв цитогенетичних аномалій;
- 3) допомогти студентам підбирати за молекулярно-генетичного аналізу тварин для визначати їх генотипи за генами кількісних ознак;
- 4) надати належні дослідницькі уміння щодо виявлення тварин-носіїв господарсько-цінних генів та генних ансамблів для одержання нащадків з очікуваними параметрами продуктивності чи з новими якісними ознаками;
- 5) сприяти формуванню навичок у виявленні тварин-носіїв спадкових аномалій.

У результаті вивчення навчальної дисципліни студент повинен

знати:

- основні етапи історії генетики як науки, її методи;
- основні закономірності успадкування якісних та кількісних ознак при моно-, дигібридному та полігібридному схрещуваннях, взаємодії неалельних генів;
- основні спадково зумовлені патології свійських тварин і способи їх виявлення;
- генетичну суть інбридингу і гетерозису
- генетичні основи індивідуального розвитку тварин;
- генетичні особливості структури популяцій і їх динаміку, суть генетичних процесів в популяціях
- особливості успадковування та мінливості ознак у тварин різних видів;
- методи аналізу мінливості кількісних ознак та їх використання у селекції тварин.

вміти:

- використовувати сучасні бази даних QTL свійських тварин;
- проводити цитогенетичний аналіз тварин і виявляти кількість хромосом, тільця Барра;
- планувати та аналізувати результати гібридологічного методу при моно-, ди- та полігібридному схрещуванні;
- виявляти статистично вірогідні відхилення від теоретично очікуваних результатів схрещувань;
- аналізувати та складати генетичні карти хромосом на основі аналізуючого схрещування;

- визначати батьківство за допомогою генетичних маркерів;
- виявляти тварин-носіїв спадкових аномалій;
- здійснювати біометричний аналіз мінливості малої та великої вибірки тварин (а також кореляційний, регресивний, дисперсійний, успадкованості, повторюваності ознак);
- аналізувати генетичну структуру популяцій;
- проводити генеалогічний аналіз тварин.

Продовження додатку В

2. Програма та структура навчальної дисципліни для

- повного терміну денної форми навчання

- скороченого терміну денної (заочної) форми навчання

Структура навчальної дисципліни

Назви змістових модулів і тем	Кількість годин											
	денна форма						Заочна форма					
	усього	у тому числі					усього	у тому числі				
		л	п	лаб	інд	с.р.		л	п	лаб	інд	с.р.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Змістовий модуль 1. Закономірності успадкування якісних ознак тварин												
Тема 1. Сучасні та класичні методи генетичного аналізу	18	4	2	-		12						
Тема 2. Закономірності успадкування якісних ознак тварин.	12	2	2	-		8						
Разом за змістовим модулем 1	30	6	4			20						
Змістовий модуль 2. <u>Закономірності успадкування кількісних ознак тварин</u>												
Тема 1. Закономірності успадкування кількісних ознак тварин	30	2	2	-		26						
Тема 2. Сучасні бази даних QTL свійських тварин. Методи аналізу мінливості кількісних ознак та їх використання у селекції тварин	30	2	4	-		24						
Разом за змістовим модулем 2	60	4	6			50						
УСЬОГО ГОДИН	90	10	10			70						

Теми практичних занять

№ з/п	Назва теми	Кількість годин
1	Сучасні та класичні методи генетичного аналізу	2
2	Закономірності успадкування якісних ознак тварин.	1
3	Контроль знань за першим змістовним модулем	1
4	Закономірності успадкування кількісних ознак тварин	2
5	Сучасні бази даних QTL свійських тварин. Методи аналізу мінливості кількісних ознак та їх використання у селекції тварин	3
6	Контроль знань за другим змістовним модулем	1
7	Допуск до іспиту. Консультація.	
30	Усього	10

Самостійна робота

№ з/п	Назва теми	Кількість годин
	Сучасні та класичні методи генетичного аналізу	12
	Закономірності успадкування якісних ознак тварин.	8
	Патогенетика тварин	26
	Генетика господарсько-корисних ознак свійських тварин. Сучасні бази даних QTL свійських тварин (ВРХ, овець)	12
	Генетика господарсько-корисних ознак свійських тварин. Сучасні бази даних QTL свійських тварин (свиней, курей, коней)	12
	Усього	70

3 Контрольні питання, комплекти тестів для визначення рівня

засвоєння знань студентами

Перелік питань до іспиту

1. Історія і можливості методів генетичних досліджень у вивченні генетики свійських тварин.
2. Сучасні та класичні методи генетичного аналізу.
3. Ознака як результат експресії одного або декількох генів.
4. Сучасні методи генетичних досліджень.
5. Цитогенетичний аналіз тварин.
6. Охарактеризуйте каріотип виду (за вибором). Які геномні та хромосомні мутації відомі для цього виду? Якими фенотиповими ознаками вони супроводжуються?
7. Молекулярно-генетичні маркери, їх класифікація.
8. Групи крові.
9. Поліморфні білки.

10. ДНК-маркери (структурні гени, високоповторювані послідовності ДНК – міні та мікросателіти, тощо), РНК-маркери.
11. ПЛР, її етапи, галузі використання.
12. Метод ПЛР-ПДРФ, його застосування у генетиці свійських тварин.
13. Секвенування геномів.
14. Використання молекулярно-генетичних досліджень в генетиці продуктивних ознак тварин.
15. Мутаційні процеси в популяціях.
16. Назвіть відомі вам спадкові порушення, які характерні для виду (за вибором). Назвіть як вони успадковуються?
17. Класифікація мутацій. Частота спонтанних і індукованих мутацій, їх вплив на пристосованість. Поняття мутаційного вантажу (Г.Меллер). Селективно-нейтральні мутації, їх доля в популяції (Р.Фішер, М.Кимура).
18. Міграція генів і її вплив на генетичний склад популяції.
19. Методи виявлення мутацій. Швидкість накопичення мутацій. Мутагенні фактори і їх вплив на популяції тварин.
20. Геноміка та біоінформатика в аналізі свійських тварин.
21. Сучасні бази даних з генетики тварин.
22. Методи роботи з мережею Інтернет, пошук інформації зі спеціальної генетики.
23. Аналіз послідовностей ДНК та білків за допомогою програм FAST, BLAST, тощо.
24. Використання методів геноміки та біоінформатики у сучасних технологіях виробництва та переробки продукції тваринництва.
25. Спеціальна генетика. Генетика ВРХ. Особливості каріотипу великої рогатої худоби. Геномні мутації ВРХ, їх наслідки. Поліморфні системи білків, групи крові. Гени господарсько -корисних ознак ВРХ (молочної (гени казеїнів), м'ясної продуктивності: гени гормону росту, міостатину,). Спадково обумовлені патології ВРХ. Мутація BLAD та ін.
26. Спеціальна генетика. Генетика свині свійської. Особливості каріотипу свиней. Геномні та хромосомні мутації свиней. Реципрокні транслокації і їх вплив на репродуктивні якості свиней. Поліморфні системи білків, групи крові. Гени господарсько корисних ознак свиней (естроген-рецептору, пролактин-рецептору, стрес-чутливості, стійкості до колібактеріозів). Спадково обумовлені патології свиней.
27. Спеціальна генетика. Генетика коней. Особливості каріотипу коней та споріднених видів. Геномні та хромосомні мутації коней, їх вплив на репродуктивні якості коней. Поліморфні системи білків, групи крові. Визначення походження коней за різними поліморфними системами (групи крові, міні- та мікросателіти). Спадково обумовлені патології коней.
28. Спеціальна генетика. Генетика овець, кіз. Особливості каріотипу овець, кіз та споріднених видів. Геномні та хромосомні мутації овець, кіз, їх вплив на репродуктивні якості. Поліморфні системи білків, групи крові. Гени господарсько-корисних якостей овець, кіз (гени казеїнів, багатоплідності). Спадково обумовлені патології овець, кіз.
29. Спеціальна генетика. Генетика с.-г птиці, бджіл. Особливості каріотипу та розмноження, визначення статі бджіл.

30. Геномні та хромосомні мутації курей. Поліморфні системи білків, групи крові, послідовностей нуклеотидів курей. Нутрігеноміка. Спадково обумовлені патології с.-г птиці.

. Методичне забезпечення Рекомендована література Базова

1. Проценко М.Ю. Генетика К., "Вища школа", 1994.- 303
2. Ларцева С.Х., Муксинов М.К. Практикум по генетике. М. Агропромиздат, 1985 - 287с.
3. Ченцов Ю.С. Общая цитология: Учебник. - М.: Изд-во МГУ, 1984.- стр. 299-308.
4. Д.М.Фаллер, Д.Шилдс Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. Пер. с англ.М.: БИНОМ-Пресс, 2003.- С-149.
5. Рис Э., Стенберг М. Введение в молекулярную биологию: От клеток к атомам: Пер. с англ.- М.: Мир, 2002.-С. 10-17.
6. Проценко М.Ю. Генетика К., "Вища школа", 1994.- 303
7. Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 359-375.
8. Жимулев И.Ф.Общая и молекулярная генетика.-Издательство Новосибирского университета.-2003.-458 с.
9. Ратнер В. А. Генетический код как система // Соросовский образовательный журн. 2000. № 3. С. 17-22.
10. Трофименко О.Л.. Популяційна генетика - К: КВІЦ.- 2006. -640с.
11. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику.- Мир, 1984.-232 с.
12. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. В 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1988. С. 72-166.
13. Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 359-375.
14. Алтухов Ю. П. Генетика популяций и сохранение биоразнообразия // Соросовский образовательный журн. 1995. № 1. С. 32-43.

Додаткова література

1. Эрнст Л.К., Жигачев А.И. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупно-масштабной селекции. - Москва, 2006. - 383 с.
2. Визнер Э.В, Виллер З.В. Ветеринарная патогенетика/Пер. с нем. Г. И. Лойди-ной, Е. А. Яновской; Под ред. и с предисл. П. Ф. Терехова.—М.: Колос, 1979. —424 с, ил.
3. Генетична експертиза у скотарстві/ Б.Є.Подоба, В.С.Качура, М.В.Дідик.- К.: Урожай.- 1991.- 176 с.
4. Московкина Н.Н., Сотская М.Н. Генетика и наследственные болезни собак и кошек — М. - ООО «АКВАРИУМ ПРИНТ», 2004. - 448 с.
5. Дж. Паджетт Контроль наследственных болезней у собак. Пер. с англ., М.: Издательство «Софион». 2006, 94 ил., 280 с.

6. Глазко В.И., Глазко Г.В. Введение в генетику, биоинформатика, геномика, протеомика.-К.: КВІЦ.-2004.- 640 с.
7. Генетика с основами селекции /Анте-Вечтомов.- М., 1989.
8. Зорина З.А., Полетаева И.И., Резникова Ж.И. Основы этологии и генетик поведения.Учебник.-М.:МГУ: Высшая школа.-2002.-383 с.
9. Эрман Л., Парсонс П. Генетика поведения и эволюция.- М.: Мир.-1984.- 566 с.
10. Дубинин Н.М., Глембоцкий Я.Л. Генетика популяций и селекция.- К.: Наука, 1967. -771 с.
11. Лесли Дж. Генетические основы селекции сельскохозяйственных животных –М.: Колос, 1992.-390 с.
12. Племенное дело в животноводстве /Л.К. Эрнст, Н.А.Кравченко, А.П. Солдатов и др.; под ред. Н.А.Кравченко. -М.: Колос, 1987. -285 с.
13. Популяционная генетика для животноводов-селекционеров /Р. Шталь, Д. Раш, Р.Шиллер и др. -М.: Колос, 1973. -430 с.
14. Трофименко О.Л., Гиль М.І. Генетика популяцій. Навчальний посібник. –Миколаїв, 2003. -226 с.
15. Эйсер Ф.Ф. Теория и практика племенного дела в скотоводстве.- К.: Урожай, 1981. -192 с.
16. Барминцев Ю.Н. Коннозаводство и конный спорт. – М., «Колос», 1972. 319 с. с ил.
17. Басовский М.З., Рудик І.А., Буркат В.П. Вирощування, оцінка і використання плідників. - К.: Урожай, 1992. -213 с.
18. Беляев Д.К. О генетических принципах селекции животных. - М.: Колос, 1966. -238 с.
19. Вите В.О. Практика и теория чистокровного коннозаводства.- М., 1957.
20. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве /М.В.Зубец, В.П. Буркат, Ю.Ф. Мельник и др. Под ред. М.В.Зубца, В.П. Бурката.- К: „БМТ”, 1997. -722 с.
21. Генетика воспроизводства овец /Р.Б. Лэнд, Д.У. Робинсон.; Пер. с англ. и с предисл. А.И. Гольцбланта. - М.: Агропромиздат, 1987. -455 с.
22. Генетика і селекція у тваринництві. - К., 1968. –280 с.
23. Зеленков П.И., Бараников А.И., Зеленков А.П. Скотоводство. –Ростов н/Д: «Феникс», 2005. -572 с. –(Высшее образование).
24. Злочевская К.В., Пенионжкевич Э.Э., Шахнова Л.В. Разведение и племенное дело в птицеводстве. – М., «Колос», 1974. –240 с. с ил. (Учебники и учеб. пособия для с.-х. техникумов).
25. Иогансон И., Рендель Я., Граверт О. Генетика и разведение домашних животных. – М.: Колос, 1970. – 344 с.
26. Красота В.Ф., Джапаридзе Т.Г., Костомахин Н.М. Разведение сельскохозяйственных животных. -5-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 2005. -424 с.: ил. –(Ученики и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).
27. Кочиш И.И., Сидоренко Л.И., Щербатов В.И. Биология сельскохозяйственной птицы. – М.: КолосС, 2005. – 203 с.: ил. – (Ученики и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).
28. Плёмінна робота (довідник). За ред. М.В.Зубця, М.З. Басовського. К.: Асоціація „Україна”, 1995. –440 с.
29. Рибалко В.П., Буркат В.П., Березовський М.Д. Генофонд, оцінка та використання свиней. – К.: Асоціація „Україна”, 1994. –124 с.

30. Свечин К.Б., Бобылев И.Ф., Гопка Б.М. Коневодство. –М.: Колос, 1992. –271 с.
31. Хатт Ф. Генетика животных. Пер. с англ. и под ред. Я.Л.Глембоцкого. М., «Колос», 1969. –445 с. с ил.

8. Інформаційні ресурси

1. База даних локусів кількісних ознак <https://www.animalgenome.org/QTLdb/faq/>
2. База даних фенів не лабораторних тварин <https://omia.org/home/>
3. База даних National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information

Bos taurus	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=bos+taurus
Canis lupus familiaris	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9615&build=3.1
Equus caballus	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Equus+caballus
Felis catus	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=felis%20catus
Oryctolagus cuniculus	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9986&build=1.1
Ovis aries	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9940&build=100.0
Sus scrofa	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Sus+scrofa

Бази даних по генетиці великої рогатої худоби:

- [AgBase](#)
- [ArkDB - cow](#)
- [BAC Fingerprint Map - Genome Sciences Center](#)
- [Bovine Genome Project - Baylor](#)
- [Bovine HapMap Project](#)
- [Bovine QTL Viewer - University of Adelaide](#)
- [Bovine SNPs - Baylor](#)
- [Breeds of Livestock - Cattle](#)
- [CSIRO Livestock Genomics - Bovine](#)
- [Cattle Genome Sequencing Consortium](#)
- [CattleQTLdb](#)

- [DFCI Cattle Gene Index](#)
- [GOLD](#)
- [IBISS SNP and mRNA database](#)
- [INRA Bovmap database](#)
- [ISAS Catalog of Bovine Genes](#)
- [Interactive Bovine In Silico SNP Database \(IBISS\)](#)
- [Livestock Genomics, CSIRO](#)
- [NAGRP Cattle Genome Coordination Program](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Animals \(OMIA\)](#)
- [QTL Map - University of Sydney](#)
- [Rare Breeds Survival Trust](#)
- [The Bovine Genome Database](#)
- [The Bovine SNP Retriever](#)

[University of Illinois at Urbana-Champaign Cattle Comparative Genomics](#)

Бази даних по генетиці коня свійського :

- [Horse Genome Project - University of Kentucky](#)
- [Horse Genome Project - Broad Institute](#)
- [ArkDB](#)
- [Equinegenome.org](#)
- [Horsemap](#)
- [NISC](#)
- [NRSP-8 Bioinformatics Coordination Program](#)
- [OMIA](#)
- [Breeds of Livestock - Horse](#)
- [Horse Immunogenetics](#)
- [CHORI BAC Library](#)
- [Texas A&M BAC Library](#)
- [INRA BAC-YAC Resource Center](#)
- [HyperCLDB - horse cell lines](#)

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Кафедра генетики, розведення та біотехнології тварин

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Декан факультету

к.с.-г.н., доцент Кондратюк В.М.

“ _____ ” _____ 2020 р.

РОЗГЛЯНУТО І СХВАЛЕНОна засіданні кафедри генетики,
розведення та біотехнології тварин

Протокол № 13 від. “ 11 ” червня 2020 р.

Завідувач кафедри

_____ Рубан С.Ю.

РОБОЧА ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ**ГЕНЕТИКА ТВАРИН**

(назва навчальної дисципліни)

спеціальність 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»

(шифр і назва спеціальності)

факультет Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва _____

(назва факультету)

Розробник: Костенко С.О., професор кафедри генетики, розведення і біотехнології тварин,
д.б.н., професор

Київ – 2020 р.

1. Мета та завдання навчальної дисципліни

Дисципліна „Генетика тварин” є однією із основних за спеціальністю 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва». В даному курсі викладаються цитогенетичні та молекулярні основи спадковості, закономірності успадкування кількісних та якісних ознак тварин.

Мета - надання студентам теоретичних та практичних знань для майбутньої ефективної виробничої та науково-дослідницької діяльності щодо покращення показників продуктивності стад тварин. „Генетика тварин з основами біометрії” - теоретична основа таких дисциплін як розведення та селекція тварин.

Завдання:

- 1) надати фундаментальні знання з проведення гібридологічного і генеалогічного аналізу;
- 2) навчити студентів за використання цитогенетичного аналізу тварин з метою виявляти тварин-носіїв цитогенетичних аномалій;
- 3) допомогти студентам підбирати за молекулярно-генетичного аналізу тварин для визначати їх генотипи за генами кількісних ознак;
- 4) надати належні дослідницькі уміння щодо виявлення тварин-носіїв господарсько-цінних генів та генних ансамблів для одержання нащадків з очікуваними параметрами продуктивності чи з новими якісними ознаками;
- 5) сприяти формуванню навичок у виявленні тварин-носіїв спадкових аномалій.

У результаті вивчення навчальної дисципліни студент повинен

знати:

- основні етапи історії генетики як науки, її методи;
- цитологічні основи спадковості, роль органел клітини в передачі і реалізації спадкової інформації;
- молекулярні основи спадковості: реплікацію, транскрипцію, трансляцію генетичного матеріалу, будову нуклеїнових кислот, властивості генетичного коду;
- основні закономірності успадкування якісних та кількісних ознак при моно-, дигібридному та полігібридному схрещуваннях, взаємодії неалельних генів;
- хромосомну теорію спадковості, кросинговер, теоретичні основи побудови генетичних карт;
- закономірності успадкування ознак, зчеплених зі статтю;
- генетичну природу мінливості, її типи, суть спонтанного і індукованого мутагенезу, специфіку і особливості дії фізичних і хімічних мутагенів.
- класифікацію мутацій, причини їх виникнення та можливості виявлення;
- основи імуногенетики, поняття про групи крові тварин;
- основні спадково зумовлені патології свійських тварин і способи їх виявлення;
- генетичну суть інбридингу і гетерозису
- генетичні основи індивідуального розвитку тварин;
- генетичні особливості структури популяцій і їх динаміку, суть генетичних процесів в популяціях
- особливості, можливості і досягнення генної інженерії.- основні гени господарсько-корисних ознак свійських тварин;
- особливості успадковування та мінливості ознак у тварин різних видів;

вміти:

- проводити цитогенетичний аналіз тварин і виявляти кількість хромосом, тільця Барра;
- планувати та аналізувати результати гібридологічного методу при моно-, ди- та полігібридному схрещуванні;
- виявляти статистично вірогідні відхилення від теоретично очікуваних результатів схрещувань;
- аналізувати та складати генетичні карти хромосом на основі аналізуючого схрещування;
- визначати батьківство за допомогою генетичних маркерів;
- виявляти тварин-носіїв спадкових аномалій;
- здійснювати біометричний аналіз мінливості малої та великої вибірки тварин (а також кореляційний, регресивний, дисперсійний, успадковуваності, повторюваності ознак);
- аналізувати генетичну структуру популяцій;
- проводити генеалогічний аналіз тварин.

3. Програма та структура навчальної дисципліни для

- повного терміну денної форми навчання

- скороченого терміну денної (заочної) форми навчання

Назви змістових модулів і тем	Кількість годин											
	денна форма						Заочна форма					
	усього	у тому числі					усього	у тому числі				
		л	п	лаб	інд	с.р.		л	п	лаб	інд	с.р.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Змістовий модуль 1. <u>Історія, методи і теоретичні принципи генетики. Цитогенетичні основи спадковості.</u>												
Тема 1. Історія розвитку генетики, сучасні та класичні методи генетичного аналізу	6	2		-		4	6	1				5
Тема 2. Цитологічні основи спадковості. Клітинний цикл. Мітоз.	10	2		4		4	10	1		2		5
Тема 3. Мейоз. Гаметогенез	14	2		6		6	14					14

Разом за змістовим модулем 1	30	6		10		14	30	2		2		26
Змістовий модуль 2. <i>Молекулярні основи спадковості</i>												
Тема 1. Молекулярні основи спадковості. ДНК.	5	2		2		1	5	1		1		3
Тема 2. Центральна догма молекулярної біології. Будова РНК, транскрипція.	5	2		2		1	5			1		4
Тема 3. Генетичний код, його властивості.	5	2		2		1	5			1		4
Тема 4. Регуляція експресії генів	5	2		2		1	5					5
Тема 5. Мінливість, її класифікація.	5	2		2		1	5	1				4
Тема 6. Мутаційна мінливість.	5	2		2		1	5					5
Разом за змістовим модулем 2	30	12		12		6	30	2		3		25
Змістовий модуль 3. <i>Закономірності успадкування ознак при статевому розмноженні.</i>												
Тема 1. Взаємодія алельних генів. Закони Менделя.	7	2		4		1	7	1		1		5
Тема 2. Взаємодія неалельних генів.	9	2		6		1	9			1		8
Тема 3. Зчеплене успадкування генів, кросинговер.	5	2		2		1	5	1		1		3
Тема 4. Генетика статі.	5	2		2		1	5			1		5
Тема 5. Популяційна генетика. Закон Харді-Вайнберга.	5	2		2		1	5	1		1		5
Тема 6.	3	2		-		1	3					3

Еволюційна генетика та геноміка.												
Тема 7. Генетика кількісних ознак. Генетика як основа селекції.	5	2		2		1	5	1				4
Тема 8. Генна інженерія і клонування с.-г. тварин	4	2		1		1	4					4
Тема 9. Імуногенетичні, ДНК-, РНК-маркери с.-г. тварин.	4	2		1		1	4	1				3
Тема 10. Генетика поведінки, онтогенезу.	3	2		-		1	3					3
Тема 11. Патогенетика с.-г. тварин	3	2		1			3	1				1
Тема 12. Спеціальна генетика. Генетика ВРХ	1	1		-			1					1
Тема 13. Генетика свині свійської	1	1	-	-			1					1
Тема 14. Генетика коней	1	1	-	-			1					1
Тема 15. Генетика овець, кіз.	1	1	-	-			1					1
Тема 16. Генетика птиці та бджіл.	1	1	-	-			1					1
Разом за змістовим модулем 3	60	27		23		10	60	4		5		
<i>Усього годин</i>	120	45		45		30	120	10		10		100

13. Методичне забезпечення

1.Дисципліна забезпечена методичними рекомендаціями, які розміщені на сайті <http://bioaqua.nauu.kiev.ua/course/view.php?id=75>

14. Рекомендована література

Базова

1. Проценко М.Ю. Генетика К., "Вища школа", 1994.- 303
2. Ларцева С.Х., Муксинов М.К. Практикум по генетике. М. Агропромиздат, 1985 - 287с.
3. Ченцов Ю.С. Общая цитология: Учебник.- М.: Изд-во МГУ, 1984.- стр. 299-308.
4. Д.М.Фаллер, Д.Шилдс Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. Пер. с англ.М.: БИНОМ-Пресс, 2003.- С-149.
5. Рис Э., Стенберг М. Введение в молекулярную биологию: От клеток к атомам: Пер. с англ.- М.: Мир, 2002.-С. 10-17.
6. Проценко М.Ю. Генетика К., "Вища школа", 1994.- 303
7. Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 359-375.
8. Жимулев И.Ф.Общая и молекулярная генетика.-Издательство Новосибирского университета.-2003.-458 с.
9. Ратнер В. А. Генетический код как система // Соросовский образовательный журн. 2000. № 3. С. 17-22.
10. Трофименко О.Л.. Популяційна генетика - К: КВІЦ.- 2006. -640с.
11. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику.- Мир, 1984.-232 с.
12. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. В 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1988. С. 72-166.
13. Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 359-375.
14. Алтухов Ю. П. Генетика популяций и сохранение биоразнообразия // Соросовский образовательный журн. 1995. № 1. С. 32-43.

Додаткова література

1. Эрнст Л.К., Жигачев А.И. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупно-масштабной селекции. - Москва, 2006. - 383 с.
2. Визнер Э.В, Виллер З.В. Ветеринарная патогенетика/Пер. с нем. Г. И. Лойди-ной, Е. А. Яновской; Под ред. и с предисл. П. Ф. Терехова.—М.: Колос, 1979. —424 с, ил.
3. Генетична експертиза у скотарстві/ Б.Є.Подоба, В.С.Качура, М.В.Дідик.- К.: Урожай.- 1991.- 176 с.
4. Московкина Н.Н., Сотская М.Н. Генетика и наследственные болезни собак и кошек — М. - ООО «АКВАРИУМ ПРИНТ», 2004. - 448 с.
5. Дж. Паджетт Контроль наследственных болезней у собак. Пер. с англ., М.: Издательство «Софион». 2006, 94 ил., 280 с.
6. Глазко В.И., Глазко Г.В. Введение в генетику, биоинформатика, геномика, протеомика.-К.: КВІЦ.-2004.- 640 с.
7. Генетика с основами селекции /Анте-Вечтомов.- М., 1989.
8. Зорина З.А., Полетаева И.И., Резникова Ж.И. Основы этологии и генетик поведения.Учебник.-М.:МГУ: Высшая школа.-2002.-383 с.
9. Эрман Л., Парсонс П. Генетика поведения и эволюция.- М.: Мир.-1984.- 566 с.
10. Дубинин Н.М., Глембоцкий Я.Л. Генетика популяций и селекция.- К.: Наука, 1967. -771 с.

11. Лесли Дж. Генетические основы селекции сельскохозяйственных животных –М.: Колос, 1992.-390 с.
12. Племенное дело в животноводстве /Л.К. Эрнст, Н.А.Кравченко, А.П. Солдатов и др.; под ред. Н.А.Кравченко. -М.: Колос, 1987. -285 с.
13. Популяционная генетика для животноводов-селекционеров /Р. Шталь, Д. Раш, Р.Шиллер и др. -М.: Колос, 1973. -430 с.
14. Трофименко О.Л., Гиль М.І. Генетика популяцій. Навчальний посібник. –Миколаїв, 2003. -226 с.
15. Эйсер Ф.Ф. Теория и практика племенного дела в скотоводстве.- К.: Урожай, 1981. -192 с.
16. Барминцев Ю.Н. Коннозаводство и конный спорт. – М., «Колос», 1972. 319 с. с ил.
17. Басовский М.З., Рудик І.А., Буркат В.П. Вирощування, оцінка і використання плідників. - К.: Урожай, 1992. -213 с.
18. Беляев Д.К. О генетических принципах селекции животных. - М.: Колос, 1966. -238 с.
19. Вите В.О. Практика и теория чистокровного коннозаводства.- М., 1957.
20. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве /М.В.Зубец, В.П. Буркат, Ю.Ф. Мельник и др. Под ред. М.В.Зубца, В.П. Бурката.- К: „БМТ”, 1997. -722 с.
21. Генетика воспроизводства овец /Р.Б. Лэнд, Д.У. Робинсон.; Пер. с англ. и с предисл. А.И. Гольцбланта. - М.: Агропромиздат, 1987. -455 с.
22. Генетика і селекція у тваринництві. - К., 1968. –280 с.
23. Зеленков П.И., Бараников А.И., Зеленков А.П. Скотоводство. –Ростов н/Д: «Феникс», 2005. -572 с. –(Высшее образование).
24. Злочевская К.В., Пенионжkevич Э.Э., Шахнова Л.В. Разведение и племенное дело в птицеводстве. – М., «Колос», 1974. –240 с. с ил. (Учебники и учеб. пособия для с.-х. техникумов).
25. Иогансон И., Рендель Я., Граверт О. Генетика и разведение домашних животных. – М.: Колос, 1970. – 344 с.
26. Красота В.Ф., Джапаридзе Т.Г., Костомахин Н.М. Разведение сельскохозяйственных животных. -5-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 2005. -424 с.: ил. –(Ученики и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).
- 27.

Додаткова література

28. Эрнст Л.К., Жигачев А.И. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупно-масштабной селекции. - Москва, 2006. - 383 с.
29. Визнер Э.В, Виллер З.В. Ветеринарная патогенетика/Пер. с нем. Г. И. Лойди-ной, Е. А. Яновской; Под ред. и с предисл. П. Ф. Терехова.—М.: Колос, 1979. —424 с, ил.
30. Генетична експертиза у скотарстві/ Б.Є.Подоба, В.С.Качура, М.В.Дідик.- К.: Урожай.- 1991.- 176 с.
31. Московкина Н.Н., Сотская М.Н. Генетика и наследственные болезни собак и кошек — М. - ООО «АКВАРИУМ ПРИНТ», 2004. - 448 с.
32. Дж. Паджетт Контроль наследственных болезней у собак. Пер. с англ., М.: Издательство «Софион». 2006, 94 ил., 280 с.
33. Глазко В.И., Глазко Г.В. Введение в генетику, биоинформатика, геномика, протеомика.-К.: КВІЦ.-2004.- 640 с.

34. Генетика с основами селекции /Анте-Вечтомов.- М., 1989.
35. Зорина З.А., Полетаева И.И., Резникова Ж.И. Основы этологии и генетик поведения. Учебник.-М.:МГУ: Высшая школа.-2002.-383 с.
36. Эрман Л., Парсонс П. Генетика поведения и эволюция.- М.: Мир.-1984.- 566 с.
37. Дубинин Н.М., Глембоцкий Я.Л. Генетика популяций и селекция.- К.: Наука, 1967. -771 с.
38. Лесли Дж. Генетические основы селекции сельскохозяйственных животных –М.: Колос, 1992.-390 с.
39. Племенное дело в животноводстве /Л.К. Эрнст, Н.А.Кравченко, А.П. Солдатов и др.; под ред. Н.А.Кравченко. -М.: Колос, 1987. -285 с.
40. Популяционная генетика для животноводов-селекционеров /Р. Шталь, Д. Раш, Р.Шиллер и др. -М.: Колос, 1973. -430 с.
41. Трофименко О.Л., Гиль М.І. Генетика популяцій. Навчальний посібник. –Миколаїв, 2003. -226 с.
42. Эйсер Ф.Ф. Теория и практика племенного дела в скотоводстве.- К.: Урожай, 1981. -192 с.
43. Барминцев Ю.Н. Коннозаводство и конный спорт. – М., «Колос», 1972. 319 с. с ил.
44. Басовский М.З., Рудик І.А., Буркат В.П. Вирощування, оцінка і використання плідників. - К.: Урожай, 1992. -213 с.
45. Беляев Д.К. О генетических принципах селекции животных. - М.: Колос, 1966. -238 с.
46. Вите В.О. Практика и теория чистокровного коннозаводства.- М., 1957.
47. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве /М.В.Зубец, В.П. Буркат, Ю.Ф. Мельник и др. Под ред. М.В.Зубца, В.П. Бурката.- К: „БМТ”, 1997. -722 с.
48. Генетика воспроизводства овец /Р.Б. Лэнд, Д.У. Робинсон.; Пер. с англ. и с предисл. А.И. Гольцбланта. - М.: Агропромиздат, 1987. -455 с.
49. Генетика і селекція у тваринництві. - К., 1968. –280 с.
50. Зеленков П.И., Бараников А.И., Зеленков А.П. Скотоводство. –Ростов н/Д: «Феникс», 2005. -572 с. –(Высшее образование).
51. Злочевская К.В., Пенионжкевич Э.Э., Шахнова Л.В. Разведение и племенное дело в птицеводстве. – М., «Колос», 1974. –240 с. с ил. (Учебники и учеб. пособия для с.-х. техникумов).
52. Иогансон И., Рендель Я., Граверт О. Генетика и разведение домашних животных. – М.: Колос, 1970. – 344 с.
53. Красота В.Ф., Джапаридзе Т.Г., Костомахин Н.М. Разведение сельскохозяйственных животных. -5-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 2005. -424 с.: ил. –(Ученики и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).
54. Кочиш И.И., Сидоренко Л.И., Щербатов В.И. Биология сельскохозяйственной птицы. – М.: КолосС, 2005. – 203 с.: ил. – (Ученики и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).
55. Племінна робота (довідник). За ред. М.В.Зубця, М.З. Басовського. К.: Асоціація „Україна”, 1995. –440 с.
56. Рибалко В.П., Буркат В.П., Березовський М.Д. Генофонд, оцінка та використання свиней. – К.: Асоціація „Україна”, 1994. –124 с.
57. Свечин К.Б., Бобылев И.Ф., Гопка Б.М. Коневодство. –М.: Колос, 1992. –271 с.

58. Хатт Ф. Генетика животных. Пер. с англ. и под ред. Я.Л.Глембоцкого. М., «Колос», 1969. -445 с. с ил.

15. Інформаційні ресурси

1. База даних локусів кількісних ознак <https://www.animalgenome.org/QTLdb/faq/>
2. База даних фенів не лабораторних тварин <https://omia.org/home/>
3. База даних National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information

Bos taurus	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=bos+taurus
Canis lupus familiaris	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9615&build=3.1
Equus caballus	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Equus+caballus
Felis catus	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=felis%20catus
Oryctolagus cuniculus	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9986&build=1.1
Ovis aries	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9940&build=100.0
Sus scrofa	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Sus+scrofa

Бази даних по генетиці великої рогатої худоби:

- [AgBase](#)
- [ArkDB - cow](#)
- [BAC Fingerprint Map - Genome Sciences Center](#)
- [Bovine Genome Project - Baylor](#)
- [Bovine HapMap Project](#)
- [Bovine QTL Viewer - University of Adelaide](#)
- [Bovine SNPs - Baylor](#)
- [Breeds of Livestock - Cattle](#)
- [CSIRO Livestock Genomics - Bovine](#)
- [Cattle Genome Sequencing Consortium](#)
- [CattleQTLdb](#)
- [DFCI Cattle Gene Index](#)
- [GOLD](#)

- [IBISS SNP and mRNA database](#)
- [INRA Bovmap database](#)
- [ISAS Catalog of Bovine Genes](#)
- [Interactive Bovine In Silico SNP Database \(IBISS\)](#)
- [Livestock Genomics, CSIRO](#)
- [NAGRP Cattle Genome Coordination Program](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Animals \(OMIA\)](#)
- [QTL Map - University of Sydney](#)
- [Rare Breeds Survival Trust](#)
- [The Bovine Genome Database](#)
- [The Bovine SNP Retriever](#)
- [University of Illinois at Urbana-Champaign Cattle Comparative Genomics](#)

Бази даних по генетиці коня свійського :

- [Horse Genome Project - University of Kentucky](#)
- [Horse Genome Project - Broad Institute](#)
- [ArkDB](#)
- [Equinegenome.org](#)
- [Horsemap](#)
- [NISC](#)
- [NRSP-8 Bioinformatics Coordination Program](#)
- [OMIA](#)
- [Breeds of Livestock - Horse](#)
- [Horse Immunogenetics](#)
- [CHORI BAC Library](#)
- [Texas A&M BAC Library](#)
- [INRA BAC-YAC Resource Center](#)
- [HyperCLDB - horse cell lines](#)

Załącznik nr 2 do Zarządzenia
nr 14/17 z dnia 3 kwietnia 2017 r.

Tekst jednolity Program ochrony zasobów genetycznych koni rasy konik polski

1. Słownik pojęć

Użyte w treści Programu nazwy oznaczają:

- 1) Program ochrony – program ochrony zasobów genetycznych koni rasy konik polski,
- 2) Program hodowlany – program doskonalenia koni rasy konik polski,
- 3) Instytut – Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, podmiot upoważniony Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi do koordynacji lub realizacji programów ochrony zasobów genetycznych zwierząt,
- 4) Związek – Polski Związek Hodowców Koni/Okręgowe Związki Hodowców Koni, podmiot prowadzący księgę stadną koni rasy konik polski oraz ocenę wartości użytkowej koni,
- 5) Grupa Robocza – Grupę Roboczą ds. ochrony zasobów genetycznych koni powołaną zarządzeniem Dyrektora Instytutu Zootechniki PIB nr 7/15 z dnia 23.03.2015 r. (z późn. zm.) w sprawie realizacji zadań w zakresie ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich.

2. Historia rasy

Koniki polskie są jedyną rodzimą, prymitywną rasą koni wiodzącą się bezpośrednio od dzikich tarpanów.

Dzikie konie zwane tarpanami można było jeszcze w XVIII wieku spotkać na lesistych terenach Polski, Litwy i Prus. Opisywane były w książkach i dokumentach przez dawnych kronikarzy i podróżników, którzy podkreślając ich leśne bytowanie nazywali je po łacinie *Equi silvestris* (konie leśne). W lesie chroniły się one głównie przed ludźmi, natomiast pasły się najczęściej na otwartych terenach, takich jak polany, pola, łąki czy nieużytki. W stanie dzikim tarpany przetrwały najdłużej w okolicach Puszczy Białowieskiej, mniej więcej do 1780 roku, kiedy to ostatecznie je odłowiono i przekazano do zwierzynca hrabiów Zamojskich w miejscowości Zwierzyniec k. Biłgoraja. Około 1806 roku wylapano je ze zwierzynca i rozdano okolicznym chłopom. Tym samym można przyjąć, że w ten sposób dokonał się ostatni akt udomowienia dzikich koni na terenie Polski.

Pierwsze badania, przeprowadzone 100 lat później (w 1914 roku) przez Jana Grabowskiego i Stanisława Schucha dowiodły, że w okolicach Biłgoraja przetrwały prymitywne konie przypominające w dużym stopniu dawne dzikie tarpany. Były to nieduże koniki, o wzroście około 110–130 cm, najczęściej maści myszatej z charakterystyczną ciemną pręgą wzdłuż grzbietu i niekiedy pręgowaniem na kończynach. W drugiej połowie lat dwudziestych zainteresował się nimi Tadeusz Vetulani, późniejszy profesor Uniwersytetu Poznańskiego. Jemu to głównie zawdzięczamy wprowadzenie na trwałe nazwy „konik polski” do literatury hipologicznej. Profesor T. Vetulani wysunął ciekawą hipotezę, że spośród tarpanów żyjących na stepach wschodniej Europy wyodrębniła się odmiana leśna, która jeszcze w połowie XVIII wieku bytowała na terenach Polski, Litwy i Prus. Od tej leśnej odmiany miały pochodzić koniki polskie. Hipoteza ta znalazła wielu zwolenników, ale

Зведений текст

Програма збереження генетичних ресурсів породи коней**Польський поні**

1. Словник термінів

Назви, що використовуються, означають:

- 1) Програма захисту - програма захисту генетичних ресурсів польського коня
Конік,
- 2) Селекційна програма - програма удосконалення коней польської породи
конік,
- 3) Інститут - Національний науково-дослідний інститут тваринництва,
суб'єкт, уповноважений постановою Міністра сільського господарства та
розвитку сільських територій координувати або реалізовувати програми
захисту генетичних ресурсів тварин,
- 4) Zwiczek - Польська асоціація конезаводів / Oknrgowe Zwiczki
конезаводчики, організація, яка веде племінну книгу польського Конік та
оцінює продуктивність коней,
- 5) Робоча група - Робочі групи з охорони генетичних ресурсів коней,
створені наказом директора Національного науково-дослідного інституту
тваринництва No 7/15 від 23.03.2015 (із змінами) щодо виконання завдань у
галузі охорони генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин.

2. Історія породи

Польські поні - це єдина рідна порода коней виведена безпосередньо з диких тарпанів.

Диких коней, званих тарпанами, ще можна було зустріти в лісистих районах Польщі, Литви та Пруссії у 18 столітті. Вони описувались у книгах та документах старими літописцями та дослідниками, які, підкреслюючи своє лісове існування, називали їх латиною *Equi silvestris* (лісові коні). У лісі вони захищались переважно від людей, тоді як паслися переважно на відкритих

ділянках, таких як галявини, поля, луки чи пустирі. У дикій природі тарпани найдовше вижили в околицях Біловезької пущі, більш-менш до 1780 року, коли їх остаточно зловили і передали в зоопарк графів Замойських у Звезинці біля Білгорая. Близько 1806 року їх конфіскували і роздали місцевим селянам. Таким чином, можна припустити, що це останній випадок приручення диких коней у Польщі.

Перші дослідження, проведені через 100 років (у 1914 р.) Яном Грабовським та Станіславом Шухом, довели, що в околицях Білгорая збереглися примітивні коні, багато в чому схожі на старі дикі тарпани. Це були маленькі коні, заввишки близько 110-130 см, найчастіше в мишової масті з характерними темними смугами вздовж спини, а іноді і на кінцівках. У другій половині 20-х років ними зацікавився Тадеуш Ветулані, майбутній професор Познаньського університету. Саме йому ми головним чином завдячуємо постійному впровадженню назви "польський кінь" в літературу про гіпологию. Професор Т. Ветулані запропонував цікаву гіпотезу, що серед тарпанів, що мешкають у степах Східної Європи, вирізняється лісова порода, яка була на території Польщі та Литви ще в середині 18 століття, від якої походять польські поні. Гіпотеза знайшла багато прихильників, але і також опонентів, які мали іншу думку. Перші спроби організованого розведення первісних коней, званих польськими коніками, були зроблені в Польщі в 1923 р. В Державному конярстві в Януві-Підляському та в 1928 р. На Садібному хуторі, що належав Кшеменецькій середній школі. У 1936 р. За ініціативою професора Т. Ветулані в Біловежі було створено польський заповідник коней з метою відновлення тарпана лісового шляхом природної селекції в диких умовах життя в Пущі. До Другої світової війни, у 1938 році, на Віленщині було відкрито три стайні, де тримали найкращий матеріал кобил та жеребців, зібраний у цій місцевості. На жаль, селекційний матеріал цих стаєнь був повністю знищений під час війни. Під час окупації було засновано п'ять стаєнь примітивних коней: у Деразне у Волині, у Луці в Тамопольському воєводстві, у Вацині поблизу Радома та у Феліні та Пулавах

у Люблінському воєводстві. Більшість коней загинули під час бойових дій та евакуації до Німеччини.

Після війни розпочалася відновлення розведення польських коніків лише з небагатьох збережених матеріалів: 15 з стада з заповідника Біловежа, 14 з стада в Пулавах (PINGW), 7 з стада в Деразне та поодинокі тварини від приватних заводчиків. Група коней, які вижили та одужали з Німеччини (за винятком групи Біловежа), спочатку досить чисто змінили місце перебування, залишившись у в Кохчицях, Гродзець Слєскі, Пулави, Раба Визна. Тільки коли в кінці 1949 р. було відкрито студію в Попільно, можна було зібрати цей цінний матеріал в одному місці. Після смерті проф. Т. Ветулані в 1952 р. значна чистка коней з Біловежі вирушила до Попільно, яке на той час стало головним племінним центром цієї породи. У 1955 р. стадо з Попільно було передане Польській академії наук. Цього ж року в Попільно відновили перерваний експеримент проф. Т. Ветулані та, крім традиційного розведення, було розпочато резервне розведення.

На додаток до цього центру, в 1950-х - на початку 1960-х років в країні були створені невеликі стайні, де почали розводити польських поні, в т.ч. у Лоздаї поблизу Китжина, Стубно, Єжевиці (Zakład Experimental PAS), RZD Złotniki біля Познані. Незабаром більшість з них було ліквідовано або обмежено, але племінний матеріал не був втрачений, а використаний для створення осередків, що збереглися до наших днів. У 1970 році в PSK Racot на фермі «Кобильники» було створено філію польських коніків. В результаті організаційних змін у 1995 році цю філію перебрала Познанська Ходовля Рослін Тульце - насіннева станція Кобильники. Наступні польські центри конярства були створені в наступні роки: 1979 - у Добжинєво-Стад, 1983 - у Серакубь SO, 1987 - у KPGR Manieczki. Разом з Попільно вони були включені до природоохоронних центрів розведення польського коніка.

Незалежно від розвитку традиційного конярства в стабільних умовах, також розвивалося їх резервне розведення. До коней з Попільно та Біловежських додалися невеликі резервації, т. зв притулки польського коніка. У 1998 році

цю систему розведення започаткував Національний парк Розточанських у Звежинці (історичне місце останнього тарпану), а в 1990 році Еліза та Ян Плонсі заснували польську резервацію для коней у Зеленому Острові, в заповіднику "Siedem Wysp" поблизу Вигоржево (з 2009 резервацією керує Борківський лісовий округ). У 2004 році розведення було розпочато Бебжанським національним парком, а нещодавно, в 2007 році, після збільшення площі, в Ландшафтному парку „Долину Барича" поблизу Мілича заснував резервацію Олександр Ковальськи.

Польське конярство на відкритих місцевостях також успішно розвивалось, т.зв. масове вирощування. У 1960-1970-х роках були створені центри розведення коней на відкритих місцевостях, в т.ч. в районах: Grójec, Busko та Lubaszów. На жаль, у 1980-х роках племінна селекція там майже повністю занепала, і більша частина племінного матеріалу була втрачена назавжди. В даний час найбільші концентрації приватного розведення знаходяться на території Великопольщі, Малопольщі, Мазура, Шльонську, Помор'я.

Додаток Ж

Українсько-польські проекти з питань збереження коней гуцульської породи

Назви спільних програм, проектів	Термін виконання	Співвиконавці		Обсяг і джерела фінансування(у.о.)	Отримані результати співробітництва та напрямки їх використання
		Українські	Іноземні		
1.Проект № 27 -08 11-70 «Відродження зникаючих порід тварин на Гуцульщині» 2.Проект № 27 - 0816 -70-2 «Відродження гуцульських коней в Українських Карпатах» 3.Грант ПАУСІ №03-0433-143 «Обмін досвідом та допомога в розведенні та використанні гуцульської породи коней в Україні»	2001- 2009 2003 - 2004 2010-2015	РГО «Спадщина Гуцульщини» НПП «Гуцульщина» Сільські громади Рахівського району, Закарпатської області та Косівського району Івано-Франківської області	Кінний завод з розведення гуцульської породи коней «Гладишов», Польща	139810 МБФ «Хайфер проджект интерн.» 25000 МБФ «Хайфер проджект интерн.» 18515 (ПАУСІ)	Селянським родинам подаровано 58 кобил гуцульської породи. Безкоштовно надаються ветеринарні препарати і ветеринарні послуги. Частково забезпечують грубими кормами і зернофуражем. Придбано 3-х чистопородних гуцульських жеребців – плідників, а також 3 брички і 20 сідел для розвитку кінного туризму. Проведено семінар в Польщі за участю 38 осіб з України «Обмін досвідом і допомога в розведенні та використанні гуцульської породи коней на Україні» Проведено міжнародну конференцію. Видано монографію: «Розведення та використання гуцульської породи коней в Україні. Міжнародний досвід»

продовження додатку Ж

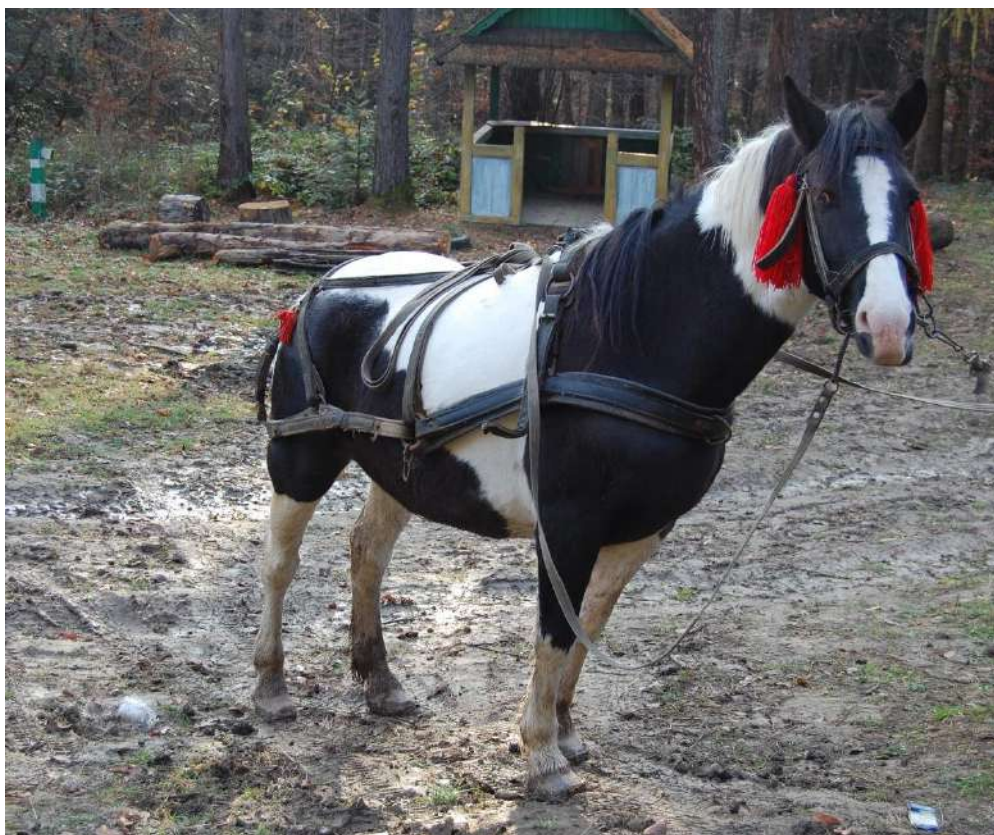
4. Демонстраційна модель сталого розвитку в Українських Карпатах	2003 -2004			12000 Фонд «Євразія» 89000 МБФ «Хайфер проджект інтерненл»	Проведено 13 семінарів і тренінгів стосовно сталого розвитку суспільства, конярства, зеленого туризму та підприємництва. Видано посібник «В Карпати на конях» Жителям Косівського району подаровано 20 голів нетелів бурокарпатської породи, 52 голови гірськокарпатської породи овець, 60 бджолопакетів, 400 саджанців кущової чорниці, 1000 саджанців журавлини та 1000 саджанців чорної смородини, а також насіння лікарських рослин. Окрім того безплатно учасникам проекту буде передано в дар: інфрачервона сушильна установка (6000 \$), мотоблок (3000\$), майстерня-взовня (2000\$), обладнання для пункту штучного осіменіння, установки капельного зрошення (5шт), сепаратори (20шт), ел. медогонка (600\$), воскотопка, ветеринарні препарати, мінеральні добрива, насіння трав, комбіко рм; проведено семінари, навчання.
5. «Карпатський проект» № 27-0826-21-01	2005-2011				

Коні гуцульської породи. Село Зелене . Прилісок Ложів. Гринявські гори



Коні гуцульської породи національного природного парку «Гуцульщина»

Продовження додатку 3



Продовження додатку 3



Кобила Стрілка, вік 11р. гуцульська порода, занесена до державної книги
племінних коней гуцульської породи

ПАСПОРТ КОНЯ
Identification document of the horse

Серія АА № 011758

Ідентифікаційний номер коня
Identification number of the horse UA260000186

Кличка коня Стрілка
Name of the horse

Порода Гуцульська
Breed

АІРТ

продовження додатку 3

Ідентифікаційний номер коня
Identification number of the horse UA260000186 Серія AA № 011758

1. ВІДОМОСТІ ПРО КОНЯ ТА ЙОГО ВЛАСНИКА
Information about the horse and its owner

Код мікрочипа
Microchip

Кличка
Name Стрілка Стать
Sex Кобила Масть
Colour Темно-гнеда

Порода
Breed Гуцульська Дата народження
Date of birth 16.08.2008

Місце народження
Place of birth Україна, Івано-Франківська обл., Косівський р-н, Гуралюк І.Т.
Посилання на ДКПК
Stud Book Reference

Батько
Sire Орлик, 2006

Мати
Dam Рута

Батько матері
Maternal grandsire

Власник /Owner Гуралюк Іван Танасійович

Адреса /Address Івано-Франківська обл., Косівський р-н., с. Вербовець, вул. Ковпака, 4

Дата видачі
Date of issuing 17.11.2010

Печатка і підпис
Stamp and signature

ІРТ

Агентство з ідентифікації і реєстрації тварин
Ідентифікаційний код 32114325
№ 3
УКРАЇНА



Жеребець Полігон, вік 12 р. гуцульська порода, занесений до державної книги племінних коней гуцульської породи господарства ТзОВ «Край неба»

Додаток І

Світлини із архівних та літературних матеріалів про розведення та збереження гуцульських коней на українських землях ХІХ-ХХ ст.



Rsunek Hucula dosiadajacego „Hucula – rokacza”

Малюнок Гуцула верхи на «Гуцулі - рябому»



Продовження додатку I

Фотографії, листівки XIX / XX століття



Na zdjęciu: Huculi na koniach Huculskich. Zdjęcia, pocztówki z XIX / XX w

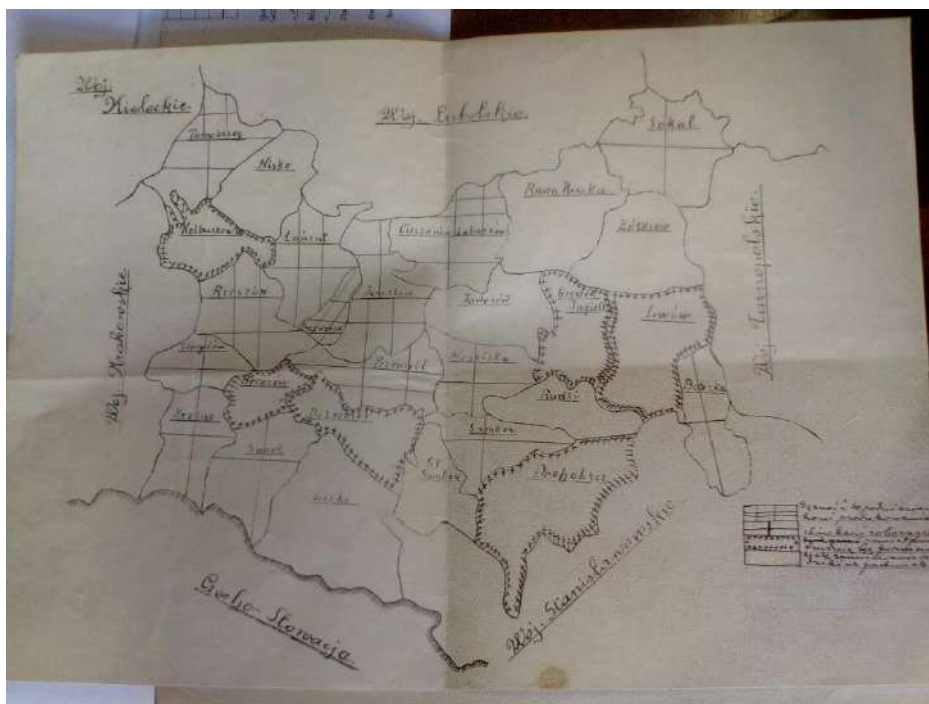
На фото: Гуцули на гуцульських конях. Фотографії, листівки XIX / XX століття



Koń „Magura” - rasa huculska. Żabie nad Czeremoszem. 1935 r.

Кінь гуцульської породи. Жаб'є над Черемошем. 1935 р.

Карти розміщення кінних заводів у повітах Львівської області, де утримували гуцульських коней XIX-XX ст.



Коні породи коник польський Яворівського національного природного парку



Велика рогата худоба аборигенних порід
Сіра українська порода ДП «ДГ «Поливанівка» ІЗК НААН





Бугаї сірої української породи

Продовження додатку 3



Корови білоголової української породи господарства ТОВ «Подільський
господар»

Корови бурої карпатської породи одноосібних фермерських господарств
С. Нижні Ворота Воловецького району Закарпатської області







МІНІСТЕРСТВО ЗАХИСТУ ДОВКІЛЛЯ ТА ПРИРОДНИХ РЕСУРСІВ УКРАЇНИ
ЯВОРІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПРИРОДНИЙ ПАРК
81070, Львівська обл., Яворівський р-н, смт Івано-Франкове, тел./факс (03259) 3-31-35,
e-mail: yavorivskiypp@gmail.com

19.08.2020 № 272

Акт впровадження

результатів науково-дослідної роботи
Стародуб Любов Феодилівни
«Генетична мінливість аборигенних порід великої рогатої худоби та коней за
різними типами маркерів»

Забір біологічного матеріалу для проведеного молекулярно-генетичного та
цитогенетичного тестування коней породи коник польський здійснено у
Яворівському національному природному парку, Львівської обл. смт Івано-
Франкове.

У результаті проведеної роботи, розроблено систему оцінювання
генетичної структури коней породи коник польський за молекулярно-
генетичними та цитогенетичними маркерами, яка передбачає виявлення
тварин із стабільними цитогенетичними показниками соматичного мутагенезу
(анеуплоїдія, мікроядра) та встановлення генетичного поліморфізму
фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами ди- і
тринуклеотидних мікросателітів $(GA)_n$ C, $(AG)_n$ C, $(AG)_n$ CA, $(AG)_n$ CG,
 $(GA)_n$ CC, $(ACC)_n$ G, $(GAG)_n$ C, $(CTC)_n$ C, для підтвердження унікальності і
консолідованості популяцій тварин цієї породи як основу для включення її в
національні програми із збереження біоресурсів.

Т.в.о. директора Яворівського
національного природного парку

С.С. Маруняк

Начальник науково-дослідного відділу

І.П. Любинець



МІНІСТЕРСТВО ЗАХИСТУ ДОВКІЛЛЯ ТА ПРИРОДНИХ РЕСУРСІВ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ПРИРОДНИЙ ПАРК "ГУЦУЛЬЩИНА"
MINISTRY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION AND NATURAL RESOURCES OF UKRAINE
NATIONAL NATURAL PARK "GUTSULSHCHYNA"

78600 Україна, Івано-Франківська обл.,
м. Косів, вул. Дружби, 84.
тел/факс (03478) 2-37-09



78600 Ukraine, Ivano-Frankivsk reg.,
Kosiv, 84 Drugba str.
tel/fax (03478) 2-37-09

№ 405/5 від 22.09.2021



ЗАТВЕРДЖУЮ
Заступник директора
з наукової роботи
Марія ПАСАЙЛЮК

Акт № 1

впровадження

результатів науково-дослідної роботи

Стародуб Любов Теофілівни

«Генетична мінливість аборигенних порід великої рогатої худоби та коней за різними типами маркерів» у науково-дослідний процес Національного природного парку "Гуцульщина" в рамках теми "Збереження генофонду гуцульської породи коней"

Комісія у складі:

Голова: Погрібний О.О., начальник науково-дослідного відділу

Члени комісії: Фокшей С.І., заступник начальника науково-дослідного відділу
Томич М.В., завідувач лабораторії екологічного моніторингу

22.09.2021 комісія розглянула матеріали результатів зазначеної НДР та можливість їх впровадження у НДП НПП "Гуцульщина". Встановлено, що забір біологічного матеріалу для проведеного молекулярно-генетичного та цитогенетичного тестування коней породи гуцульський кінь здійснено у Національному природному парку "Гуцульщина", Івано-Франківської обл., м. Косів. У результаті проведеної роботи, розроблено систему оцінювання генетичної структури коней породи гуцульський кінь за молекулярно-генетичними та цитогенетичними маркерами, яка передбачає виявлення тварин із стабільними цитогенетичними показниками соматичного мутагенезу (анеупloidія, мікроядра) та встановлення генетичного поліморфізму фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами ди- і тринуклеотидних мікросателітів (GA)_nC, (AG)_nC, (AG)_nCA, (AG)_nCG, (GA)_nCC, (ACC)_nG, (GAG)_nC, (CTC)_nC, для підтвердження унікальності і консолідованості популяції тварин цієї породи.

Пропозиції комісії: отримані результати розглядати як основу для включення породи гуцульський кінь в національні програми із збереження біоресурсів. Результати дослідження використовувати в НДП в НПП "Гуцульщина".

Т.в.о. директора НПП "Гуцульщина"

Іван КОПЧУК

Голова комісії

Олег ПОГРІБНИЙ

Члени комісії:

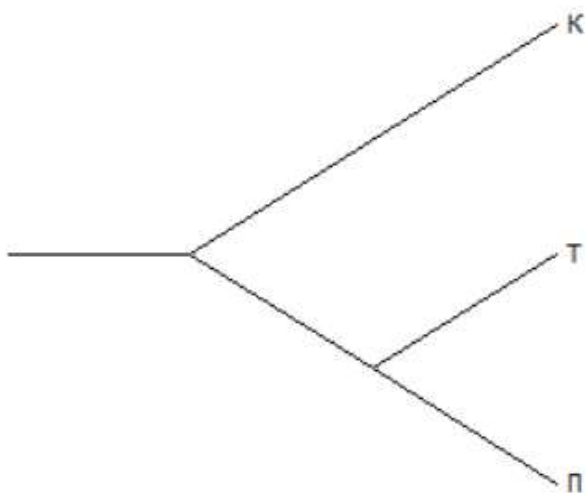
Стелла ФОКШЕЙ

Марія ТОМИЧ

Заступник директора з наукової роботи

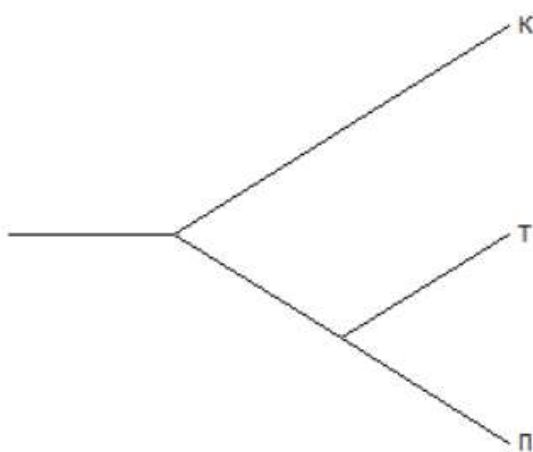
Марія ПАСАЙЛЮК

Дендрограми генетичних відстаней за ISSR–PCR маркерами у коней породи коник польський, плейстоценового коня та справжнього тарпана

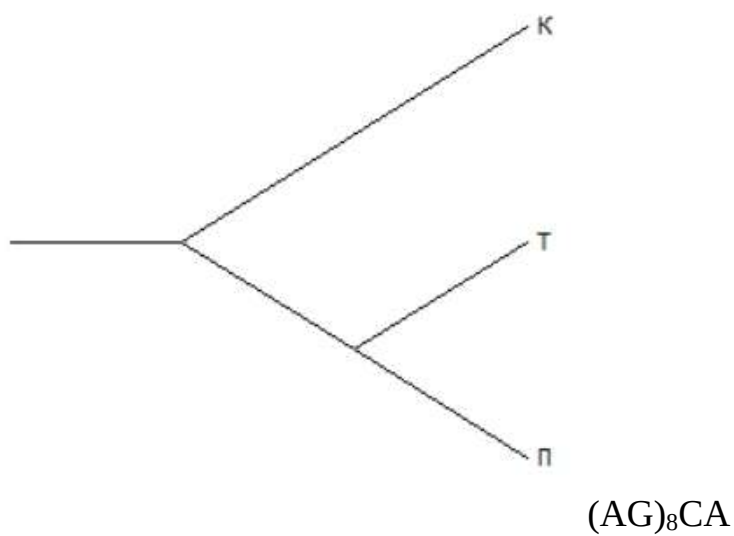


(GA)₉C

к—коник польський; т—справжній тарпан; п—плейстоценовий кінь



(AG)₉C



к—коник польський; т—справжній тарпан; п—плейстоценовий кінь

