

движении наследственного материала в поколениях, других генетических закономерностях. Такую информацию целесообразно рассматривать как один из видов генофондовой продукции, что в контексте сохранения племенных ресурсов является одним из оснований для внедрения системы генетического мониторинга с использованием широкого спектра генетических тестов в генофондовых популяциях домашних животных.

**Генетический мониторинг, генофонд домашних животных, ДНК-маркеры, онтогенез**

**GENETIC MONITORING IN PRESERVATION OF ANIMAL PEDIGREE RESOURCES.** Kopylov K.V., Zabludovskyy Y.Y.

*Besides a control for genetic situation in animal gene pool herds genetic research gives a scientific information about distribution and movement of heritable material through generations and also concerning other genetical laws. It is expediently to consider such information as a kind of gene fund production and this is a base for introduction of genetic monitoring system using wide spectrum of genetical tests in gene pool populations for preservation of domestic animal pedigree resources.*

**Genetic monitoring, gene pool of domestic animals, DNA-markers, ontogenesis**

УДК 575.113:636.03

К.В. КОПИЛОВА

*Институт розведення і генетики тварин УААН*

## **ВПРОВАДЖЕННЯ У ПРАКТИКУ ТВАРИННИЦТВА ГЕНЕТИЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ ЗА ДНК-МЕТОДАМИ**

---

*Розглянуто питання доцільності впровадження обов'язкової генетичної експертизи племінного матеріалу за сучасними ДНК-методами.*

**Генетична експертиза, мікросателіти, ДНК, праймери**

© К.В. Копилова, 2008

Розведення і генетика тварин. 2008. Вип. 42.

Відповідно до Закону України "Про племінну справу у тваринництві" [1] та згідно з вимогами "Положення про порядок проведення генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин" [2] генетичний контроль походження розглядається як невід'ємна частина племінної справи у тваринництві.

Генетичною основою контролю походження племінних тварин є спадковий поліморфізм, який зумовлюється наявністю алейних варіантів генів, розташованих на певних ділянках гомологічних хромосом, які виступають у ролі генетичних маркерів відповідного генетичного матеріалу. Оскільки алейні варіанти поліморфних систем не змінюються протягом індивідуального розвитку особини, не залежать від віку, хвороб, фізіологічного стану тварини і зовнішніх впливів оточуючого середовища, то генетичне тестування тварин проводять один раз за життя.

Контроль достовірності походження засвідчує достовірність родоводів племінних тварин, що забезпечує ефективність методів селекції, які враховують генеалогію тварин. Можливі невірні записи в родоводах зумовлені різними причинами: помилками при первинному обліку, застосуванням двох і більше плідників, не виключена можливість фальсифікації з метою збільшення кровності або вартості тварини чи племінного матеріалу.

Міжнародним комітетом по племінних книгах (ISBC) було висунуто вимоги щодо обов'язкового генотипування чистокровних верхових коней за мікросателітами ДНК з метою ідентифікації і контролю їхнього походження. У Російській Федерації відповідно до закону про племінне тваринництво (1995) і положення про Державні племінні книги (ДПК) здійснюється обов'язкове тестування і контроль походження всіх племінних коней заводських порід з видачею племінних паспортів, а запис у ДПК проводиться на підставі висновку лабораторії генетики [3].

Прогрес у дослідженні генома сільськогосподарських видів тварин та розробка і впровадження сучасних методів молекулярно-генетичного аналізу безпосередньо на рівні ДНК порівняно з класичними методами тестування тварин за групами крові дає можливість у більш короткий термін і на рівні носія спадкової інформації отримувати інформацію щодо особливостей генетичної структури, а також виявляти генетичні аномалії без застосування складного і дорогого методу генетич-

ної експертизи за нащадками. Методи аналізу ДНК, які базуються на застосуванні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), дають практичну можливість їхнього використання при експертизі походження племінних тварин та їхньому генотипуванні і забезпечують проведення ефективної селекції, спрямованої на виявлення маркерів бажаного спадкового матеріалу і вдосконалення генофонду. Крім цього метод ДНК-аналізу дає можливість використання не тільки крові тварин, а й іншого біологічного матеріалу, наприклад сперми плідників, волоссяних луковиць, слини.

**Матеріали і методи досліджень.** У перспективі основним методом генетичної експертизи племінних тварин у конярстві, скотарстві, свинарстві і вівчарстві стануть дослідження ДНК, у зв'язку з чим необхідно вирішити комплекс організаційних, технічних і методологічних проблем. Деякі підходи до їхнього розв'язання висвітлено в цій публікації.

Стрімкий розвиток досліджень генома тварин надає широкий вибір послідовностей, що вирізняються найбільшим ступенем поліморфізму, до яких належать міні- та мікросателітні послідовності ДНК, котрі широко розповсюджені в геномі тварини.

Множинний алелізм мікросателітних локусів визначається різним копіюванням мономерних одиниць у кластері. Кількість динуклеотидних тандемних повторів ДНК у різних організмів індивідуальна, вони успадковуються відповідно до законів Менделя. Перевагою мікросателітних локусів є наявність досить великої кількості алелів (у середньому 6–8 на локус), які мають кодомінантний характер успадкування. Це дає змогу чітко відрізнити гомозиготу від гетерозиготи і контролювати гени, отримані від батьків. З практичного боку, мікросателіти є ідеальними генетичними маркерами як при експертизі походження, так і в дослідженнях генетичної структури різних видів та порід тварин.

**Результати досліджень.** Протягом останніх років нами було проведено дослідження щодо аналізу поліморфізму та інформативності ISSR – PCR маркерів у 11 видів ссавців сільськогосподарських і споріднених диких видів з використанням праймерів 12 фрагментів тринуклеотидних тандемних повторів мікросателітних локусів [4]. При аналізі спектрів продуктів ампліфікації (ISSR-PCR) було отримано дані про залежність складності спек-

тра від нуклеотидної послідовності, яку було обрано як праймер. З розглянутих тринуклеотидних праймерів фрагменти пурин-піримідинових послідовностей  $(\text{CTC})_6\text{A}$ ,  $(\text{CTC})_6\text{C}$ ,  $(\text{GAG})_6\text{C}$  давали змогу одержувати найскладніші за кількістю ампліконів і найбільш інформативні у різних видів спектри. Можна припустити, що такий міжвидовий консерватизм виявлених повторів зумовлений їхньою передбачуваною участю в організації просторових структур ДНК [5]. У результаті проведених досліджень обґрунтовано доцільність використання у популяційно-генетичних дослідженнях як праймерів фрагментів тринуклеотидних мікросателітних локусів, що належать до пурин-піримідинових послідовностей.

Метод контролю походження тварин за генетичними маркерами міні- і мікросателітів вже широко застосовується в більшості країн з розвиненим тваринництвом і практично став обов'язковим елементом первинного зоотехнічного обліку.

Генетична експертиза походження тварин за мікросателітами ДНК має низку переваг, головною з яких є висока ефективність і точність отриманих результатів. Так при використанні 6 мікросателітних локусів у великої рогатої худоби вірогідність установлення помилок запису про походження становить 96%, при застосуванні 9 локусів – 98%, а 11 – понад 99,99% [6]. Проведення генетичної експертизи походження ґрунтується на принципі генетичного виключення. Відповідно до законів генетики набір генів нащадка повинен відповідати генотипам його батьків (тому що половина хромосом передається від батька, а половина від матері), внаслідок чого нащадок не може мати гени, які відсутні у батьків. Виявлення у нащадка алелів, які відсутні у батьків, свідчить про невідповідність запису про походження, а якщо відсутні алелі батька чи матері, то це вказує на помилкове батьківство.

Висока інформативність мікросателітних локусів дає змогу з успіхом використовувати їх як генетичні маркери при вирішенні різних селекційних завдань, а саме визначення ступеня гомозиготності, генетичної спорідненості, рівня внутріпородної генеалогічної диференціації.

Важливим елементом проведення генетичної експертизи є генотипування племінних тварин за генами продуктивності з метою оцінки спадкових якостей. Зокрема, у великої рогатої ху-



доби вже зараз є можливість визначити генотипи тварин за генами: капа-казеїну(CSN3), бета-лактоглобуліну (BLG), лептину (LEP), гормону росту (GH) та міостатину (MSTN). Так поліморфізм гена капа-казеїну у великої рогатої худоби дає можливість добору перспективних генотипів, оскільки його алейний варіант В асоційований з високим вмістом білка у молоці [7]. Молоко таких тварин бажано використовувати для виробництва високоякісних твердих сирів, що є економічно важливим селекційним критерієм для порід молочного напрямку продуктивності [8]. На основі такої інформації можна спрямовано формувати генофонди з необхідними генними поєднаннями, тобто на якісно новому рівні вести роботу з селекції сільськогосподарських тварин. Поліморфізм таких генів у генофондах порід великої рогатої худоби в Україні залишається недостатньо дослідженим. Початковим етапом роботи щодо дослідження структурних генів, які асоційовані з господарськи корисними ознаками у різних порід великої рогатої худоби методом ПЛР-ПДРФ, можна вважати аналіз порід великої рогатої худоби, які вирізняються за історією походження, напрямом продуктивності та умовами розведення [9].

Аналізом поліморфних генів, асоційованих з ознаками молочної чи м'ясної продуктивності, встановлено найбільш сприятливі сполучення із селекційної точки зору алейних варіантів генів. Таким поєднанням генів серед досліджених аборигенних і спеціалізованих порід, що відтворюються в Україні, характеризуються тварини бурої карпатської породи, а розподіл гомозиготних тварин за генами CSN3, BLG та LEP вказує на універсальність даної породи за продуктивними показниками. Оцінка взаємозв'язків генетичних породних характеристик, що отримані за розподілом алейних варіантів генів, шляхом порівняльного аналізу генотипів тварин за показниками молочної продуктивності (загальний надій та вміст жиру в молоці), за результатами наших досліджень, вказує на адекватність порід за розподілом алейних варіантів досліджених генів з напрямками продуктивності [10].

Отже, розподіл алейних варіантів структурних генів можна розглядати як додаткові характеристики порід, генофонди яких визначаються особливостями селекційної роботи, яка здійснюється відповідно до напрямку і спеціалізації продуктивності. Це

створює передумови до вдосконалення і підвищення генетичного потенціалу стад тварин шляхом цілеспрямованого добору та підбору батьківських пар. Так ідентифікація тварин за геном CSN3 і добір бажаних генотипів уможливають ефективніше виробництво молочних продуктів зі зниженням їхньої собівартості згідно з новими вимогами ДСТУ 3662-97, ТУ В 15.5.25027034-026-2001, які передбачають підвищену оплату за вміст жиру та одержання виробниками додаткових прибутків.

Широке впровадження методів ДНК-тестування племінних тварин для встановлення та підтвердження достовірності їхнього походження і племінного матеріалу відповідно до рекомендацій International Society of Animal Genetics (ISAG/FAO 2004) методом ДНК-аналізу потребує застосування сучасних технологій з використанням лабораторного обладнання – автоматичних секвенаторів для розділення та ідентифікації поліморфних мікросателітних послідовностей ДНК-виробництва (Applied Biosystems) і специфічних комерційних панелей мікросателітних маркерів для типізації великої рогатої худоби та свиней – за 11 маркерами, коней за – 17 маркерами (Stock Marks PE Biosystems). Використання автоматизованого обладнання дає можливість проводити генотипування зразків в автоматичному режимі в одній пробірці одночасно за всіма мікросателітними локусами – мультиплексна ПЛР.

Використання чотирикольного флуоресцентного мічення праймерів при проведенні реакції ампліфікації гіперваріабельних ділянок дає змогу визначати декілька мікросателітних послідовностей в одному капілярі. Результати знімаються лазерним детектором і передаються на комп'ютер. Програмне забезпечення ДНК-аналізатора забезпечує візуалізацію процесу лазерної детекції продуктів електрофорезу у вигляді різнокольорових графічних профілів з видачею на екран результатів генотипування зразків у вигляді графіка алельних піків, представлених на рисунку. На заключному етапі проводиться інтерпретація отриманих результатів, тобто визначення генотипу тварини і перевірка його на відповідність батькам.

Таким чином, на виконання Закону України "Про племінну справу у тваринництві" з метою забезпечення необхідної генетичної оцінки племінних (генетичних) ресурсів при відтворенні, експорті, імпорті, підвищення економічної ефективності

та конкурентоспроможності галузі в Україні існує нагальна необхідність впровадження у практику племінного тваринництва обов'язкової генетичної експертизи племінних тварин та племінного матеріалу, генетичною основою якої є контроль достовірності походження, тестування племінних тварин за генами продуктивності та виявлення носіїв генетичних аномалій. Централізоване впровадження сучасних технологій ДНК-тестування племінного матеріалу відповідно до вимог ISAG/FAO та міжнародних стандартів Standard for Parentage Testing Laboratories, USA у практику селекційної роботи в Україні одне з першочергових завдань.

Першим кроком запровадження в племінне тваринництво України сучасних методів генетичної експертизи може стати паспортизація плідників, які допускаються до відтворення за структурним генами.

1. Закон України "Про племінну справу у тваринництві" // Відомості Верховної Ради (ВВР). 1999. — № 6—7. — Ст. 37 від 21.12.99.

2. Положення про порядок проведення генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин // Наказ Міністерства аграрної політики України № 197 від 1.06.2004.

3. *Калашиникова Л.А.* Проблемы использования методов анализа ДНК в генетической экспертизе племенных животных // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: Междунар. науч. конф. — Дубровицы, 2002. — С. 138—139.

4. *Копылов К.В., Иванченко Е.В., Глазко В.И.* Зависимость спектров продуктов амплификации (ISSR-PCR) от мотивов тринуклеотидных tandemных повторов, используемых в качестве праймеров // Агроеколог. журн. — 2004. — № 3. — С. 34—43.

5. *Damha M., Noronha A.* Recognition of nucleic acid double helices by homopyrimidine 2', 5'-linked RNA // Nucleic Acids Res. — 1998. — V. 26. — P. 5152—5156.

6. *Bishop M.D., Kappes S.M.* A genetic linkage map for cattle // Genetics. — 1994. — V. 136. — P. 619—639.

7. *Сулимова Г.Е., Соколова С.С., Семикозова О.П.* Анализ полиморфизма ДНК кластерных генов у крупного рогатого скота: гены казеинов и гены главного комплекса гистосовместимости (BOLA) // Цитология и генетика. — 1992. — Т. 26, № 5. — С. 18—25.

8. Сулимова Г.Е. Разработка молекулярно-генетических методов селекции крупного рогатого скота на устойчивость к лейкозу и молочную продуктивность // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: Междунар. науч. конф. — Дубровицы, 2002. — С. 73–78.

9. Поліморфізм генів, асоційованих з господарсько-корисними ознаками у великої рогатої худоби / К.В. Копилова, К.В. Копилов, О.І. Метлицька, С.І. Тарасюк // Вісн. аграр. науки. — 2006. — № 10. — С. 52–58.

10. Аналіз взаємозв'язків поліморфізму генів з показниками продуктивності у великої рогатої худоби / К.В. Копилова, К.В. Копилов, О.І. Метлицька, С.І. Тарасюк // Вісн. аграр. науки. — 2007. — № 7. — С. 32–39.

#### **ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ ЖИВОТНОВОДСТВА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ ПО ДНК-МЕТОДАМ. Копылова К.В.**

*Рассмотрен вопрос целесообразности введения обязательной генетической экспертизы племенного материала современными ДНК-методами.*

**Генетическая экспертиза, микросателлиты, ДНК, праймеры**

#### **INTRODUCTION IN PRACTICE OF STOCK-RAISING OF GENETIC EXAMINATION OF DNA-METHODS. Kopylova K.**

*The question of expedience of conduct of obligatory genetic examination of pedigree material is considered by the modern DNA- methods.*

**Question of expedience, microsatellite, DNA, prime**