

УДК 575:636.082:504

© 2016

*К.В. Копилов,**О.І. Метлицька,**доктори сільсько-
господарських наук**Н.Б. Мохначова**Інститут розведення
і генетики тварин
імені М.В. Зубця НААН**Т.М. Супрович,**доктор сільсько-
господарських наук**Подільський державний
аграрно-технічний
університет*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МОНІТОРИНГ У СИСТЕМІ ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ ТВАРИН

Мета. Розробити теоретичні підходи щодо доцільності застосування сучасних молекулярно-генетичних методів досліджень у рамках проведення генетичного моніторингу в системі збереження генетичних ресурсів тварин.

Методи. Застосовано діалектичний метод наукового пізнання, аналізу та системного узагальнення. **Результати.** Аборигенні породи слід вважати носіями унікальної генетичної інформації, яку неможливо відтворити сучасними методами селекції. У певних екосистемах економічно доцільне їх розведення в чистоті, а також пряма інтродукція в зони, де неможливе відтворення високопродуктивних форм. З цієї точки зору, вивчення генофондів аборигенних порід важливе для пошуку нових корисних генів кількісних або інших ознак (продуктивності, стійкості до захворювань, стресів), які надалі можна використати в селекції.

Висновки. Для всебічного аналізу генетичної структури племінних ресурсів порід потрібно удосконалювати і систематизувати методи щодо визначення найінформативніших тестів за різними типами ДНК-маркерів. Упровадження елементів молекулярно-генетичного моніторингу сприятиме виявленню носіїв цінних генних комплексів способом одержання молекулярно-генетичної інформації особливостей генетичної структури, що дасть змогу ідентифікувати і визначити оптимальний склад генофондів та якості генетичного матеріалу для закладання й збереження зразків біоматеріалу.

Ключові слова: молекулярно-генетичний моніторинг, генетичні ресурси, поліморфізм, ДНК-маркери.

У результаті процесів, що відбуваються у складних системах взаємовідносин природи і людини, екологічні напрями розвитку суспільства стали пріоритетними і сконцентровані на захисті природних ресурсів. Проблема охорони генофонду планети і процеси адаптації різних популяцій до різко мінливих умов навколишнього середовища стали основоположними напрямками досліджень сучасної науки.

Нині надзвичайної актуальності набуває проблема збереження генофонду порід і популяцій сільськогосподарських видів тварин, які за рівнем продуктивності не здатні конкурувати з високоспеціалізованими племінними ресурсами. В умовах ринкової економіки їх розведення не дає змоги забезпечити потрібний рівень рентабельності, що змушує власників відповідного поголів'я тварин зменшувати його чисельність або

повністю припиняти напрям їх розведення. Насамперед це стосується місцевих (аборигенних) високоадаптованих до місцевих умов розведення порід, що призводить до зрушення природної різноманітності і безповоротної втрати унікальних характеристик, притаманних цим породам. Саме такі породи найчастіше вирізняються кращою пристосованістю до несприятливих чинників зовнішнього середовища, мають міцну конституцію, підвищений рівень загальної резистентності, стабільну високу відтворувальну здатність і ряд інших цінних властивостей, ефективне відтворення яких методами селекції неможливе або потребує значних витрат.

Збереження таких порід доцільно з огляду на те, що постійно змінюються вимоги до сільськогосподарських видів тварин внаслідок конкуренції (нові продукти харчування, взаємодія цін на них), зміни в управлінні та забезпеченні тваринництва (механізація, вдосконалення технологій виробництва), зміни гігієнічних та екологічних вимог (нові види хвороб, вакцини, зміна навколишнього середовища). Будь-яка аборигенна порода — це резерв спадкових властивостей, використання яких не становить потреби сьогодні, але є перспективою майбутнього [1].

У скотарстві України до таких порід належать: сіра українська, білоголова українська, лебединська, бура карпатська. Їх можна кваліфікувати саме тими генетичними ресурсами біосфери, які створювалися протягом тривалого періоду, а нині перебувають на межі знищення. У результаті проведеного в Україні 2006–2010 рр. обстеження племінних ресурсів тваринництва було відзначено важливість поглибленого вивчення генетичної структури стад, виявлення найтипівіших представників кожної з цих порід. Така робота потрібна для визначення мережі генотипових стад і об'єктів, розробки конкретних заходів щодо програмованого відтворення селекційного матеріалу, який може забезпечити підтримку біорізноманітності в тваринництві України на потрібному рівні. Результати комплексних досліджень можуть знайти застосування у створенні генетичних типів найбільш пристосованих до нових технологій і до екстремальних умов відтворення в майбутньому.

Мета досліджень — розробка теоретичних підходів щодо доцільності застосування сучасних молекулярно-генетичних методів досліджень у рамках проведення

генетичного моніторингу в системі збереження генетичних ресурсів тварин.

Матеріали і методи досліджень. Для вирішення поставлених у роботі завдань щодо доцільності впровадження молекулярно-генетичного моніторингу в системі збереження генетичних ресурсів тварин застосовано діалектичний метод наукового пізнання, аналізу та системного узагальнення.

Результати досліджень. Аборигенні породи слід вважати носіями унікальної генетичної інформації, яку неможливо відтворити сучасними методами селекції. У певних екосистемах економічно доцільне їх розведення в чистоті, а також пряма інтродукція в зони, де неможливе відтворення високопродуктивних форм. З цієї точки зору, вивчення генотипових аборигенних порід важливе для пошуку нових корисних генів кількісних або інших ознак (продуктивності, стійкості до захворювань, стресів), які надалі можуть бути використані в селекції [2].

Відносно недавнє походження порід сільськогосподарських (доместикованих) тварин від диких предків свідчить про їх певну подібність, що можна використовувати для комплексного аналізу під час генетичного картування [3] та ідентифікації мутацій, які є в основі фенотипової різноманітності. Зіставлення простих геномних послідовностей не виявляє чітких відмінностей, які можна визначити, якщо мутації не лежать у ділянках кодування генів з добре відомою функцією і, взагалі, еволюція окремого локусу може бути під впливом добору або дрейфу та не обов'язково відображати розбіжності у філогенії [3].

Крім цього, доместиковані види тварин — це найцінніші модельні об'єкти для вирішення питань сучасної медицини. Їх використання вважається перспективним для тестування нових лікарських препаратів, у вивченні функцій генів з моногенними і мультифакторними проявами за різного виду захворювань [2]. Тому всебічний аналіз сільськогосподарських видів тварин не тільки важливий для дослідження і розуміння процесів еволюційного формування, а й спрямований також на використання отриманих результатів у прикладних цілях. Це безпосередньо пов'язано зі збільшенням одержуваної сільськогосподарської продукції за нижчих економічних затрат.

Розробку концептуальних засад методології та програм збереження, регулювання

і відтворення біологічного різноманіття в тваринництві України потрібно здійснювати способом урахування, опрацювання і узагальнення міжнародних угод, законодавчих та нормативних актів України щодо функціонування і розвитку тваринництва [4–6].

На основі даних комплексного спостереження за досліджуваною популяцією (породою) можна приймати аргументовані рішення щодо статусу тварини та породи загалом, розробляти науково обґрунтовані програми якісного збереження різноманіття з урахуванням моделювання процесу розведення та його оптимальної стратегії.

Тому під час стратифікації племінних ресурсів і реалізації програм збереження генофонду порід набувають великого значення генетичні дослідження, застосування яких на генофондових популяціях створює систему генетичного моніторингу, який покликаний вирішувати широке коло завдань [7, 8].

Генетичний моніторинг — частина біологічного або екологічного моніторингу, за допомогою якого відстежують межі внутрішньопопуляційних генних потоків. За збереження порід домашніх тварин об'єктом контролю є внутрішньо- і міжпородна генетична різноманітність, здійснюється оцінка та прогнозування її динаміки, визначається оптимум і межі допустимих змін. Генетичний поліморфізм (структурних генів, полілокусних послідовностей ДНК, хромосомних і геномних мутацій) характеризує генетичну структуру породи, що беруть за основу під час збереження генофонду рідкісних і зникаючих порід.

За збереження порід *in situ* основне завдання полягає в тому, щоб не втратити специфічних генних комплексів (або збалансованої системи генів), які зумовлюють фенотипові породні характеристики, пов'язані з екстер'єрними особливостями, продуктивністю, життєздатністю, резистентністю тварин [9].

В основу генетичного моніторингу покладено фенетичний метод (моніторинг фенів і структурних генів), моніторинг генних і хромосомних мутацій, моніторинг генофонду за допомогою різних типів молекулярно-генетичних маркерів (STR, ISSR-маркери, QTL). Використання молекулярних методів дає змогу якісно оцінювати, прогнозувати і контролювати популяційно-генетичні процеси, які відбуваються в стадах за штучного і природного добору.

Проведення генетичної оцінки стану популяцій за цими критеріями базується

на здійсненні генетичної експертизи, яка забезпечує інвентаризацію алельного складу порід і системне застосування генетичних методів для вирішення теоретичних та практичних питань розведення сільськогосподарських тварин. Як об'єктивні критерії різноманітності генофонду популяцій враховують кількість і частоту виявлених алелів та теоретичний і фактичний рівні гомозиготності за певними локусами. Водночас вважають, що невелика кількість алелів і високе число значення коефіцієнта гомозиготності свідчать про гомогенність і консолідованість генофонду популяції, а велика кількість алелів і відносно невисока гомозиготність — про значний резерв генетичної різноманітності.

Дослідження такого плану мають як теоретичне, так і практичне значення під час визначення генетичного статусу порід, оцінки ефективності застосування різних методів розведення і селекції.

Перевага молекулярно-генетичних методів у системі генетичного моніторингу полягає не тільки в можливостях довготривалого збереження зразків генетичного матеріалу, а й у тому, що для визначення ДНК-поліморфізму є реальна можливість використання сперми плідників. Це є передумовою для створення банків ДНК способом накопичення певної кількості доз сперми від плідників, які давно вже вибули. Зокрема, для цього доцільно використати спермобанки, в яких зберігається сперма плідників локальних і малочисельних порід.

Накопичення та зберігання генетичного матеріалу вже нині в кріобанках і банках ДНК у подальшому сприятиме накопиченню інформації за структурними генами, полілокусними спектрами ДНК, мутаційній мінливості, що може стати незамінним джерелом інформації за фундаментальних геногеографічних досліджень та вибору генетичних стратегій для програм зі збереження порід і селекції тварин з прогнозованими властивостями.

Розробленою і здійснюваною під егідою FAO Міжнародною програмою зі збереження різноманіття генетичних ресурсів тварин і рослин передбачено для досліджень за генетичними маркерами на рівні окремих видів відбирати зразки, виходячи із 25% порід від загальної їх кількості для певного виду сільськогосподарських тварин. За наявності у виді понад 200 порід потрібно дослідити не менше 50 з них. У межах кожної породи рекомендовано дослідити 50 неспоріднених

особин, а для виявлення мінливості породи за мікросателітами — не менше 25 тварин. Внутрішньопородні вибірки тварин рекомендовано формувати з кількох стад (мінімум з 3–5-ти, а оптимально — 8–10-ти) таким чином, щоб у них були представлені потомки різних плідників, яких використовували протягом останніх 6–8 років у стадах великої рогатої худоби, 4–5 років — у стадах свиней і овець, 2–3 років — у стадах птиць. Для порівняльної оцінки генофондів порід мінімальна вибірка має становити 10–15 гол. з кожного стада. Якщо ж метою є виявлення специфіки внутрішньопородних формувань, тоді чисельність тварин у вибірках потрібно збільшити у 3–4 рази.

Одним із важливих завдань щодо визначення найбільш оптимальних і цінних зразків біоматеріалу для довготривалого зберігання в банку ДНК є виявлення найоптимальніших ДНК-маркерів, які б давали змогу визначити молекулярно-генетичну характеристику на індивідуальному рівні та характеризувати генофонд породи.

За вивчення генетичної мінливості в природних популяціях нуклеотидні послідовності інформативніші, ніж електрофоретичні варіанти білків, оскільки більша частина ДНК не кодує білків. Генетична мінливість у некодуючих частинах ДНК (інтрони, фланкуючі райони і т.п.) виявляється тільки на рівні послідовностей ДНК. Послідовності ДНК також дають змогу отримати детальну інформацію про причини виникнення генетичної мінливості — завдяки нуклеотидним замінам, інсерції/делеції, генній конверсії, нерівному кросинговеру, горизонтальному перенесенню генів та ін. Поліморфізм ДНК дає змогу перейти від аналізу дії окремих генів до інтегрального дослідження цілих геномів.

Ступінь ДНК поліморфізму оцінюється порізному, але найпоширенішими є кількість сегрегуючих сайтів на одну нуклеотидну позицію і нуклеотидне різноманіття (або гетерозиготність на нуклеотидному рівні). Мірою поліморфізму ДНК, яка не залежить від об'єму вибірки, є середня кількість нуклеотидних різниць на позицію між двома послідовностями (нуклеотидна різноманітність).

Порівняно з методом прямого секвенування нуклеотидних послідовностей цей метод дає грубіші оцінки числа нуклеотидних замін. Однак він забезпечує одержання точних результатів під час порівняння близьких послідовностей, крім того, це швидкий і порівняно

малозатратний метод виявлення кількості нуклеотидних замін. Тому його краще використовувати у дослідженнях генетичної диференціації внутрішньовидових популяцій або близькоспоріднених видів.

Характеристика на молекулярно-генетичному рівні проводиться, головним чином, для аналізу генетичної різноманітності в межах і між популяціями тварин та для визначення генетичних взаємозв'язків між такими популяціями, а саме: для визначення параметрів мінливості усередині і між породами; ідентифікації географічної локалізації окремих популяцій; отримання інформації про еволюційні взаємини (дерева філогенезу) і з'ясування центрів походження та маршрутів міграції; здійснення картування генів, включаючи ідентифікацію носіїв відомих генів; установлення походження і генетичних взаємозв'язків; генетичного поліпшення популяцій тварин за допомогою маркерів; створення ДНК-сховищ для досліджень і розвитку (FAO, 2005).

Вважаємо, визначення поліморфізму за локусами мітохондріальної ДНК є однією з важливих характеристик, яка стосується тестування племінних ресурсів з погляду оцінки біорізноманіття. Це дає змогу скласти об'єктивне уявлення про вклад у генофонд порід генетичного матеріалу, який успадковується по материнській лінії. Одним з найпоширеніших методів, який дає змогу визначення генотипу тварин як за локусами кількісних ознак (QTL), так і мтДНК, є метод ПЛР — ПДРФ.

Ферменти рестрикції розпізнають специфічні поєднання нуклеотидних пар (сайти рестрикції), в основному, довжиною в 4 або 6 нуклеотидних пар, і розрізають ДНК у цих сайтах. Тому, якщо кільцева ДНК мітохондрій тварин несе n сайтів розпізнавання (рестрикції), вона буде фрагментована на n сегментів після обробки цим ферментом. Кількість і локалізація сайтів рестрикції визначається нуклеотидною послідовністю. Чим ближче порівнювані послідовності ДНК, тим більше збіг розподілу фрагментів рестрикції. Отже, порівнюючи локалізацію сайтів рестрикції, можна оцінити кількість нуклеотидних замін для гомологічних послідовностей ДНК. Кількість нуклеотидних замін можна оцінити також за часткою загальних рестрикційних фрагментів ДНК.

У популяційній генетиці ферменти рестрикції часто використовують для виявлення

генетичного поліморфізму за ядерними локусами ДНК; у цьому разі алелі — це фрагменти різної довжини після рестрикції певною рестриктазою. Поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) використовують для створення карт генетичного зчеплення, проте він корисний і в еволюційних дослідженнях. Кількість алелів, що виявляються для генетичного локусу (фрагмента ДНК), як правило, невелика і популяційні відмінності можна визначити в термінах алельних частот. Для великої кількості ПДРФ локусів у близькоспорідних видів кількість нуклеотидних замінів можна оцінити за даними фрагментації ДНК рестриктазами.

Передбачається, що нуклеотиди (А, Т, С, G) випадково розподілені в послідовностях ДНК і ймовірність виникнення замінів однакова для всіх позицій послідовності. Ці припущення не завжди справедливі, однак,

оскільки метод ферментної рестрикції використовують тільки тоді, коли кількість нуклеотидних замінів на сайті (d) відносно мала ($d < 0,2$), порушення цих припущень не вносить істотних помилок [10].

Підвищення ефективності робіт у рамках збереження біорізноманіття і поліпшення селекційно-плеємної роботи залежить від інтегральної оцінки генотипу в системі генетичного моніторингу, який покликаний об'єднати в збалансовану систему комплекс генетичних тестів з метою всебічної оцінки селекційного матеріалу.

Саме визначення найцінніших генотипів на індивідуальному і популяційному рівнях за локусами кількісних ознак (QTL) у комплексі STR, ISSR-маркерами, мтДНК, вважаємо, є одним із основних елементів проведення молекулярно-генетичної оцінки біоматеріалу.

Висновки

Для всебічного аналізу генетичної структури плеємних ресурсів порід потрібно удосконалювати і систематизувати методи щодо визначення найінформативніших тестів за різними типами ДНК-маркерів. Упровадження елементів молекулярно-генетичного моніторингу сприятиме виявленню

носіїв цінних генних комплексів способом одержання молекулярно-генетичної інформації особливостей генетичної структури, що дасть змогу ідентифікувати і визначити оптимальний склад генофондів та якості генетичного матеріалу для закладання та збереження зразків біоматеріалу.

Бібліографія

1. *Генетические ресурсы крупного рогатого скота: редкие и исчезающие отечественные породы* [С.В. Уханов, Ю.А. Столповский, Л.В. Банникова и др.]. — М.: Наука, 1993. — С. 170.
2. *Andersson L. Domestic — animal genomics: deciphering the genetics of complex traits/L. Andersson, M. Georges/Genetics.* — 2004. — 5. — P. 202—212.
3. *Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology/P. Sunnucks/Tree.* — 2000. — V. 15. — P. 199—203.
4. *Національна програма збереження та раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин України/М.В. Зубець, В.П. Буркат, М.Я. Єфіменко [та ін.]/Матер. наук.-практ. конф., присвяч. 125-річчю від дня народження М.Ф. Іванова. — Асканія-Нова, 1996. — С. 43—47.*
5. *Програма збереження та раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин: М-во аграр. політ. України, УААН.* — К., 2001. — 26 с.
6. *Состояние всемирных генетических ресурсов в сфере продовольствия и сельского*

- хозяйства: краткий отчет/Комиссия по генетическим ресурсам в сфере продовольствия и сельского хозяйства. Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций. — Рим, 2007. — 37 с.
7. *Генетико-селекційний моніторинг у м'ясоному скотарстві* [М.В. Зубець, В.П. Буркат, О.Ф. Мельник та ін.]; за ред. М.В. Зубця. — К.: Аграр. наука, 2000. — 187 с.
8. *Генетико-селекційний моніторинг у молочному скотарстві* [М.В. Зубець, В.П. Буркат, М.Я. Єфіменко та ін.]; за ред. В.П. Бурката. — К.: Аграр. наука, 1999. — 88 с.
9. *Столповский Ю. А. Концепция и принципы генетического мониторинга для сохранения in situ пород domesticiрованных животных/Ю.А. Столповский// Сельскохозяйственная биология.* — 2010. — № 6. — С. 3—8.
10. *Tajima F. Biases of the estimates of DNA divergence obtained by the restriction enzyme technique/ F. Tajima, M. Nei/J. Mol. Evol.* — 1982. — V. 17. — P. 115—120.

Надійшла 9.03.2016.