

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КУЛІБАБА РОМАН ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 636.52/.58.082:575.113

ДИСЕРТАЦІЯ

**ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТА ПРАКТИЧНА РЕАЛІЗАЦІЯ
МАРКЕР-АСОЦІЙОВАНОЇ СЕЛЕКЦІЇ УКРАЇНСЬКИХ ЛОКАЛЬНИХ
ПОРІД КУРЕЙ**

03.00.15 – генетика

(сільськогосподарські науки)

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

Р. О. Кулібаба

Науковий консультант: **Сахацький Микола Іванович**, доктор біологічних наук, професор, академік НААН України

Харків – 2018

АНОТАЦІЯ

Кулібаба Р.О. Теоретичне обґрунтування та практична реалізація маркер-асоційованої селекції українських локальних порід курей. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 «Генетика». – Інститут тваринництва НААН. – Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, с. Чубинське Київської обл., 2018.

У дисертаційній роботі проведено комплексні дослідження, які ґрунтуються на визначенні поліморфізму мікросателітів та локусів кількісних ознак у популяціях курей локальних порід української селекції, пошуку зв'язку виявлених поліморфних генів з господарсько-корисними ознаками птиці, оптимізації методів ДНК-типування курей дослідних популяцій при використанні молекулярно-генетичних маркерів SSR та Indel.

Для вирішення завдання щодо оптимізації ДНК-типування при використанні SSR-маркерів досліджено питання стосовно виникнення особливого класу конформаційних химерних молекул у процесі ампліфікації динуклеотидних мікросателітних локусів. Доведено, що утворення нелінійної гомодуплексної ДНК є характерним для значної кількості мікросателітних маркерів (MCW0104, LEI0094, MCW0123, MCW0245, MCW0034). Установлено, що чинником утворення цього типу артефактів ПЛР є безпосередня взаємодія антипаралельних ланцюгів молекул ДНК. Виявлено залежність утворення нелінійної гомодуплексної ДНК від концентрації ампліфікованих фрагментів. З'ясовано, що утворення нелінійної гомодуплексної ДНК у концентрації, яка є достатньою для детекції за допомогою електрофорезу, відбувається з 20 – 25 циклу ПЛР.

За використання 14 мікросателітних маркерів проведено порівняльний аналіз генетико-популяційних параметрів дослідних порід курей різних напрямів продуктивності. Як результат досліджень встановлено, що загальна кількість алелів за всіма локусами становила 66. У процесі аналізу показників

F-статистики (F_{st}) виявлено, що дослідні популяції характеризуються значною дивергенцією (19,5 % загальної генетичної мінливості розподілено між породами, в той час як 80,5 % припадає на внутрішньопорідну складову).

За значеннями генетичних дистанцій за N_{ei} встановлено, що породи плімутрок білий та род-айленд червоний характеризуються найбільшими генетичними відмінностями (65,9 % відмінностей), у той час як плімутрок білий та полтавська глиняста – найменшими (32,3 %). Між породами яєчно-м'ясного напрямку продуктивності (полтавська глиняста та род-айленд червоний) виявлено 35,9 % відмінностей. У яєчних курей породи бірківська барвиста найбільші відмінності відмічено з породою род-айленд червоний (58,8 %).

За використання мікросателітних маркерів, що рекомендовані ISAG-FAO, проведено порівняльний аналіз генетичної диференціації субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей (субпопуляції Г-1, Г-2, Г-3, Г-4 та С), а також ліній 02 та 38 породи род-айленд червоний. Загальний алелефонд дослідних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей за обраними локусами представлений 38 алелями, для ліній род-айленду червоного – 29. У субпопуляції Г-4 виявлено найменшу кількість алелів за всіма локусами (30), найбільшу – у субпопуляції Г-2 (35). Що до породи род-айленд червоний – у лінії 02 визначено 29 алелів; в лінії 38 – 28. Найменше генетичне різноманіття за кількістю алелів на локус серед усіх досліджених популяцій курей характерне для маркеру ADL0278 (3 алеля на локус), найбільше – для MCW104 (6,4 алеля на локус) у випадку м'ясо-яєчних курей; LEI0094 та MCW0081 (2 алеля на локус) і MCW104 (7 алелів на локус) для род-айленду червоного, відповідно.

За результатами розрахунків генетичних дистанцій з'ясовано, що найбільш генетично розділеними є субпопуляції Г-1 та Г-4 (28,8 % відмінностей), в той час як субпопуляції Г-2 та Г-3 максимально подібні серед усіх дослідних груп м'ясо-яєчних курей (13,3 % відмінностей). У свою чергу між лініями 02 та 38 породи род-айленд червоний виявлено 7,9 % відмінностей.

Оцінено генетичну структуру популяцій курей порід плімутрок білий (лінія Г-2), бірківська барвиста (лінія А), полтавська глиняста (лінія 14) та род-айленд червоний (лінія 38) за поліморфізмом локусів кількісних ознак.

За наявності інсерції у промоторі пролактину спостерігається картина вираженого превалювання частоти алеля І у популяції яєчних курей. У свою чергу, для курей комбінованого напрямку продуктивності є характерним переважання значень частоти алеля D, при цьому у випадку з полтавськими курами цей локус взагалі відноситься до мономорфних (у популяції в наявності лише особини з генотипом DD).

У випадку з мутацією С-2402Т локусу PRL у популяції яєчних курей частоти алелів С та Т співпадають за значенням з частотами алелів І та D, що пов'язано з тотальним превалюванням кількості особин з гаплотипом ІС над ІТ та DT над DC. При цьому в інших дослідних лініях курей цю особливість не відмічено. В межах лінії 14 частота алеля С максимальна серед популяцій курей комбінованого напрямку продуктивності. У свою чергу, за співвідношенням частот алелів С та Т лінії Г-2 та 38 практично ідентичні.

При аналізі розподілу частот гаплотипів у локусі пролактину виявлено, що повна нерівновага за зчепленням (complete LD) в наявності у популяціях курей порід бірківська барвиста та род-айленд червоний (в обох випадках $D' = 1$). У популяції яєчних курей найчастіше зустрічаються особини з гаплотипом ІС (0,82). У той же час у популяції курей породи род-айленд червоний переважають особини з гаплотипом DT (0,86). Між тим як в межах лінії Г-2 м'ясо-яєчних курей також переважають особини з гаплотипом DT (0,72), значення D' дорівнює 0,72.

За MspI-поліморфізмом у першому інтроні гену гормону росту для популяції курей породи род-айленд червоний характерним є превалювання частоти алеля С (0,48), тоді як в усіх інших популяціях частота його зустрічальності є незначною. Найменшу частоту зустрічальності алеля С виявлено для популяції курей породи полтавська глиняста (0,072). Також

полтавські кури характеризуються як найбільшою частотою алеля А (0,908), так і найменшим значенням частоти алеля В (0,02).

За MspI-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту в популяціях курей порід полтавська глиняста та бірківська барвиста гомозиготних за алелем В особин не виявлено, при цьому для полтавських курей характерна найвища частота алеля С. Найбільша частота зустрічальності алеля А має місце в популяції яєчних курей, найменша – яєчно-м'ясних (лінія 14). На відміну від інших дослідних популяцій, для лінії 38 притаманна найбільша частота алеля В.

За SacI-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту кури яєчного напрямку продуктивності значно відрізняються від інших популяцій за рахунок переважання частоти зустрічальності алеля А (0,55). В інших популяціях алель А зустрічається з набагато нижчою частотою – від 0,03 до 0,11; при цьому лише у гетерозиготному стані.

За локусом інсуліноподібного ростового фактору І (PstI-поліморфізм) для всіх дослідних популяцій характерне превалювання частоти алеля С₂, що найбільш виражене у лінії Г-2. Найбільш подібні значення частоти алелів властиві для курей яєчно-м'ясоного напрямку продуктивності.

При дослідженні HinfI-поліморфізму у промоторній ділянці гену інсуліноподібного ростового фактору І виявлено, що у цьому випадку найбільші відмінності від усіх інших дослідних популяцій характерні для лінії м'ясо-яєчних курей. У ній переважають особини, гомозиготні за алелем А. При цьому решта дослідних популяцій курей практично не різняться одна від іншої.

За поліморфізмом генів родини трансформуючих ростових факторів β спостерігається наступна картина: у випадку з MboII-поліморфізмом екзонної ділянки *TGF-β1* виділяється популяція яєчних курей, для якої характерним є превалювання частоти алеля В. Для популяцій курей комбінованого напрямку продуктивності відмічено превалювання частоти зустрічальності алеля F.

За RsaI-поліморфізмом промоторного фрагменту *TGF-β2* значних відмінностей між дослідними лініями не виявлено. В цілому для них, за

винятком плімутрока білого, є характерним загальне переважання частоти алеля В, що досягає максимального значення в лінії полтавських курей.

У свою чергу, за співвідношенням частот алелів *TGF-β3* популяції курей м'ясо-яєчного та яєчного напрямів продуктивності практично однакові та відзначаються значним превалюванням частоти алеля L. У лінії 38 спостерігається практично двократне переважання частоти алеля L над В ($p < 0,001$). Тоді як популяція курей породи полтавська глиняста суттєво різниться від інших дослідних ліній ($p < 0,001$), при цьому частоти алелів В і L практично співпадають (0,52 та 0,48).

За *RsaI*-поліморфізмом гену *Mx* в усіх популяціях спостерігається переважання частоти алеля G над А, що найбільш помітне у популяції курей яєчно-м'ясного напрямку продуктивності та найменш – яєчного.

У ході аналізу співвідношень частот алелів гену гіпофізарного фактору транскрипції-1 (*PIT-1*) найбільші відмінності виявлено між популяціями курей яєчного та яєчно-м'ясного напрямів продуктивності. М'ясо-яєчні кури займають проміжне положення.

За *NspI*-поліморфізмом у п'ятому інтроні гену рецептору гормону росту за значенням частот алелів дослідні популяції курей суттєво різняться ($p < 0,001$). Найбільшу частоту алеля А виявлено у популяції курей породи плімутрок білий (0,72), найменшу – у популяції курей породи род-айленд червоний (0,20). Лінія А займає проміжне положення та має майже однакові значення частот алелів А і В (0,46 та 0,54 відповідно).

За *HindIII*-поліморфізмом у другому інтроні ген рецептору гормону росту виявився поліморфним лише в популяції полтавських курей, для якої в наявності особини всіх можливих генотипів – А0 (*HindIII*-/0) та В0 (*HindIII*+/0). В усіх інших дослідних популяціях ген рецептору гормону росту (*GHR*) за вивченим поліморфізмом є мономорфним.

За локусом рецептору пролактину в усіх дослідних породах курей виявлено лише особин з генотипом А0 (*VamHI*+), особин з генотипом В0 (*VamHI*-) не було взагалі, що вказує на мономорфний характер цього локусу.

За результатами аналізу нуклеотидних послідовностей четвертого інтрону гену гормону росту курей визначено нову мутацію в сайті рестрикції для AluI (транзиція С→Т у положенні Chr27:1788455). Підбрано праймери, що фланкують фрагмент четвертого інтрону розміром 460 п.н., який містить поліморфний сайт рестрикції для AluI. З'ясовано, що ген гормону росту за обраним поліморфізмом є поліморфним в усіх дослідних популяціях курей, при цьому відмінності між лініями є достатньо згладженими. Наявність транзиції С→Т є характерною для переважної кількості особин та становила 70–96 %.

За аналізом загальних показників гетерозиготності дослідних популяцій за всіма поліморфними локусами виявлено, що найменші середні показники фактичної та очікуваної гетерозиготності характерні для лінії 14 породи полтавська глиняста (0,31 та 0,33), найбільші – для лінії А породи бірківська барвиста (0,42 та 0,41). Популяції курей порід плімуток білий та род-айленд червоний приймають проміжні значення (0,36; 0,38 та 0,39; 0,39, відповідно).

За результатами розрахунку генетичних дистанцій встановлено, що найбільш віддалені породи – бірківська барвиста та род-айленд червоний (24,9 % відмінностей). При цьому максимально виражені відмінності яєчних курей з породами яєчно-м'ясного напряму продуктивності (23–25 % відмінностей в алельних варіантів локусів). Різниця між породами курей м'ясо-яєчних та яєчно-м'ясних недостатньо виражена. Максимальні відмінності відмічені між породами полтавська глиняста та плімуток білий (11,2 %), мінімальні – між род-айлендом червоним та плімутоком білим (4,2 %). Величина генетичної дистанції між двома яєчно-м'ясними породами становить 7,1 %.

Встановлено зв'язок різних алельних варіантів виявлених поліморфних локусів з проявом господарсько-корисних ознак. Для кожної дослідної популяції визначено комплекси перспективних генотипів за напрямом продуктивності. В напрямі яєчної продуктивності для породи бірківська барвиста формула бажаних комплексних генотипів – $PRL^{II} PRL^{CC} GHI (MspI)^{BB} GH4 (MspI)^{CC} TGF-\beta 1^{FF} TGF-\beta 3^{LL} Mx^{GG}$; для породи полтавська глиняста –

$PRL^{CC} GHR (HindIII)^{B0} GH (SacI)^{AB} IGF-I (HinfI)^{CC} TGF-\beta 1^{FF} TGF-\beta 2^{LL} TGF-\beta 3^{BB}$;
 для породи род-айленд червоний – $PRL^{ID} PRL^{CT} IGF-I (PstI)^{C1C2} TGF-\beta 2^{BL} TGF-\beta 3^{LL} Mx^{AG}$. Виявлені генотипи за кожним із локусів пов'язані з проявом підвищених значень кількості яєць за 12 та/або 40 тижнів продуктивності, а також з масою яйця на 30-й та/або 52-й тиждень життя.

У напрямку м'ясної продуктивності для породи полтавська глиняста формула бажаних комплексних генотипів – $GH4 (SacI)^{AB} GHR (HindIII)^{B0} IGF-I (HinfI)^{CC} PIT-1^{DD} TGF-\beta 1^{FF}$; для породи род-айленд червоний – $GH1 (MspI)^{AA} GH4 (MspI)^{CC} GH4 (AluI)^{TT} TGF-\beta 2^{BB} TGF-\beta 3^{BB}$. Виявлені генотипи за кожним із локусів пов'язані з проявом підвищених значень показників живої маси, маси тушки, маси м'язів стегна, гомілки, грудних м'язів, м'язового шлунку.

Ключові слова: поліморфізм, кури, ген, алель, локуси кількісних ознак, мікросателіти, популяція, мінливість, рестрикція, ампліфікація, електрофорез, продуктивність.

ABSTRACT

Kulibaba R.O. Theoretical basis and practical application of Marker-Assisted Selection of Ukrainian local chicken breeds. – Manuscript copyright.

Thesis for the Doctor's degree of Agricultural Sciences, specialty 03.00.15 – Genetics. – Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V. Zubets of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Chubynske village, Kyiv Region – 2018.

In the dissertation work complex researches were carried out that included the task of studying the polymorphism of microsatellites and quantitative trait loci in the populations of local chicken breeds of Ukrainian selection, analysis of associations between detected polymorphic genes with chicken productive traits, optimization of DNA-typing methods of experimental chickens populations using SSR and Indel molecular markers.

To solve the problem of DNA-typing optimization using SSR-markers, questions regarding the emergence of a special class of conformational chimerical molecules in the process of amplification of dinucleotide microsatellite loci were

considered. It is shown that the formation of non-linear homoduplex DNA is characteristic for many microsatellite markers (MCW0104, LEI0094, MCW0123, MCW0245 and MCW0034). It is proved that the cause of the formation of this type of PCR artifacts is the direct interaction of antiparallel chains in DNA molecules. Dependence of formation of nonlinear homoduplex DNA on the concentration of amplified fragments was revealed. It is shown that the formation of non-linear homoduplex DNA in a concentration sufficient to detect by electrophoresis occurs from 20-25 cycles of PCR.

Comparative analysis of genetic and population parameters of experimental chicken breeds of different direction of productivity with the use of 14 microsatellite markers was conducted. According to the research results, the total number of alleles in all the loci was 66. According to the F statistics (F_{st}) analysis, experimental populations are characterized by a significant divergence (19,5 % of the total genetic variability is distributed among breeds, while 80,5 % is attributed to the intrapopulation component).

According to the values of the genetic distances, it has been shown that the White Plymouth Rock and Rhode Island Red chicken breeds are characterized by the biggest genetic differences (65,9 % of differences), the smallest were between White Plymouth Rock and Poltava clay chicken breeds (32,3 %). Between lines 14 and 38 (the egg-laying–meat direction of productivity), 35,9 % of the differences were observed. By comparison of the population of Birkivska Barvista chicken breed (line A), the maximum differences were found with the Rhode Island Red (58.8%)

Using microsatellite loci which recommended by ISAG-FAO, population genetic structure analysis of genetic differentiation of Ukrainian dual-purpose chickens (subpopulation G-1, G-2, G-3, G-4 and C) and Rhode Island Red chicken breed line 02 and 38 was conducted. The total allele pool in all experimental populations for 8 selected microsatellite loci was presented by 38 alleles for Ukrainian dual-purpose chickens and 29 alleles for lines of Rhode Island Red chicken breed. The smallest number of alleles for all the loci (30) was detected in the subpopulation G-4, the largest – in the subpopulation G-2 (35). For Rhode Island Red

chicken breed – 29 alleles were detected in line 02 and 28 in the line 38. The lowest genetic diversity for the number of alleles per locus in all experimental populations was shown for ADL0278 marker (3 alleles per locus), the largest – for MCW0104 (6.4 alleles per locus) in the case of Ukrainian dual-purpose chickens; LEI0094 & MCW0081 (2 alleles per locus) and MCW104 (7 alleles for locus) within Rhode Island Red chicken breed, respectively.

According to the values of the genetic distances, it has been shown that the biggest genetic differences were detected between subpopulations G-1 and G-4 (28,8 % of differences) while G-2 and G-3 subpopulations were the closest (13,3 % of differences). In turn, between the lines 02 and 38 of Rhode Island Red chicken breed 7,9 % of differences were detected.

The genetic structure of the populations of chickens of White Plymouth Rock (G-2 line), Birkivska Barvista (line A), Poltava clay (line 14) and Rhode Island Red (line 38) for polymorphism of quantitative trait loci was studied.

Concerning the presence of insertion in prolactin promoter it is observed the picture of the expressed prevalence of allele I frequency in the population of egg-laying chicken. In turn, for chickens of the combined productivity direction, the predominance of the values of the allele D frequency is characteristic, whereas in the case of Poltava Clay chicken breed, this locus in general belongs to monomorphic (there are only individuals with the genotype DD in the population).

In the case of C-2402T mutation of PRL locus in the egg-laying chicken population, the frequencies of C and T alleles coincide with the values of the allele frequencies I and D, due to the total prevalence of the number of individuals with the haplotype IC over IT and DT over DC. At the same time, in other experimental chicken breeds, this tendency was not noted. In the population of line 14, the frequency of the allele C was highest among the chicken breeds with the combined direction of productivity. In turn, the ratio of alleles C and T frequencies in lines G-2 and 38 were practically identical.

By the distribution of haplotype frequencies in prolactin locus, it is shown that the complete disequilibrium state (complete LD) was observed in the populations of

Birkivska Barvista and the Rhode Island Red chicken breeds (in both cases $D' = 1$). In the population of egg-laying chickens the most common were individuals with haplotype IC (0,82). At the same time, in the population of Rhode Island Red chicken breed was dominated by individuals with the haplotype DT (0,86). In turn, in line G-2 of dual purpose chicken breed the number of individuals with haplotype DT (0,72) also prevails, the D' value was equals 0,72.

According to MspI-polymorphism in the first intron of growth hormone gene for the population of Rhode Island Red chicken breed, high frequency of allele C (0,48) was characteristic, while in all other populations its frequency was small. The smallest allele C frequency was detected in the population of Poltava clay chicken breed (0,072). The population of Poltava clay chicken breed was also characterized by the highest value of allele A frequency (0,908) and the lowest – of allele B (0,02).

By MspI-polymorphism in the fourth intron of growth hormone gene the homozygous individuals by allele B were not found in the populations of Poltava clay and Birkivska Barvista chicken breeds and the highest value of allele C frequency was characterized for Poltava clay chickens. The highest frequency of allele A was characterized for egg-laying chickens, the smallest – for egg-laying–meat chickens (line 14). In contrast with other experimental populations line 38 was characterized by the highest frequency of allele B.

For SacI-polymorphism in the fourth intron of growth hormone gene the egg-laying chickens were significantly different from other populations due to high allele A frequency (0,55). In other populations, allele A was met with much lower frequencies – from 0,03 to 0,11; and only in heterozygous state.

By insulin-like growth factor I gene (PstI-polymorphism) for all experimental populations the prevalence of C_2 allele frequency was characteristic, which was the most pronounced in line G-2. The most similar values of the allele frequencies were characteristic for chicken breeds of egg-laying–meat direction of productivity.

In the study of HinfI-polymorphism in promoter region of gene of insulin-like growth factor I, it was found that in this case the greatest differences from all other experimental populations are characteristic of the line of meat-and-egg chickens. In

this population, individuals that are homozygous for allele A were prevailed. In this case, the rest of the experimental chicken populations practically did not differ from each other.

By polymorphism of transforming growth factors β gene family the following picture is observed. In the case of MboII-polymorphism in the exon site of *TGF- β 1*, the population of egg-laying chicken breed was distinguished, which was characterized by the prevalence of the allele B frequency. The high value of allele F frequency was noted for chicken populations of the combined direction of productivity.

There were no significant differences between the experimental lines by RsaI-polymorphism in the promoter fragment of *TGF- β 2*. In general, for experimental populations, with the exception of White Plymouth Rock, the general predominance of allele B frequency was characteristic, which reaches its maximum value in the line of the Poltava clay chickens.

In turn, the ratio of allele frequencies of *TGF- β 3* in chicken populations of meat-and-egg and egg-laying directions of productivity was almost identical and was characterized by the significant prevalence of allele L frequency. In line 38 allele L frequency was almost twice times prevalence over B ($p < 0.001$). In turn, the population of Poltava clay chicken breed was significantly different from other experimental lines ($p < 0.001$), while frequencies of alleles B and L practically correspond (0,52 and 0,48).

According to RsaI-polymorphism of Mx gene, the prevalence of allele G over A was observed in all populations, which is the most noticeable in the population of chickens of meat-and-egg direction of productivity and the least – for egg-laying chickens.

According to the results of the analysis of *PIT-1* allele frequencies, the greatest differences were found between populations of egg-laying and egg-laying–meat direction of productivity. Meat-and-egg chickens occupied an intermediate position.

For NspI-polymorphism in the fifth intron of growth hormone receptor gene by value of the allele frequencies, the experimental chicken populations differ

significantly ($p < 0,001$). The highest frequency of allele A was observed in the population of White Plymouth Rock chicken breed (0,72), the smallest – in the population of Rhode Island Red breed (0,20). Line A occupied an intermediate position and was characterized by almost identical values of the frequencies of alleles A and B (0,46 and 0,54 respectively).

By HindIII-polymorphism in the second intron growth hormone receptor gene was polymorphic only in the population of Poltava clay chickens, for which individuals with all possible genotypes were found – A0 (HindIII-/0) and B0 (HindIII+/0). In all other populations, growth hormone receptor gene (*GHR*) was monomorphic.

For prolactin receptor gene only individuals with genotype A0 (BamHI+) were found in all experimental breeds (individuals with genotype B0 were not found at all), what indicates the monomorphic character of this locus.

As the result of analysis of nucleotide sequences of the fourth intron of chicken growth hormone gene, a novel polymorphism in AluI restriction site (cytosine to thymine transition in Chr27:1788455 position) was detected. Primers flanking the fragment of the fourth intron of 460 bp in size, which contains polymorphic AluI restriction site, were developed. It was shown that growth hormone gene (in accordance with AluI polymorphism in 1788455 position) is polymorphic in all experimental chicken populations. C→T transition was present for the vast majority individuals and comprised 70–96%.

According to results of the research of general indexes of heterozygosity for all polymorphic loci, the lowest values of observed and expected heterozygosity were characteristic for line 14 of Poltava clay breed (0,31 and 0,33), the highest – for line A of Birkivska Barvista breed (0,42 and 0,41). Chicken breed populations of White Plymouth Rock (line G-2) and Rhode Island Red (Line 38) occupied an intermediate position (0,36; 0,38 and 0,39; 0,39, respectively).

By results of the research it is shown that the most genetically distant breeds were Birkivska Barvista and Rhode Island Red chicken breeds (24,9 % of differences). At the same time, the differences of egg-laying chicken lines from

breeds of egg-laying–meat productivity direction were maximally expressed (23–25 % of differences in allelic variants of loci). The difference between meat–egg-laying and egg-laying–meat chicken breeds was not expressed enough. Maximum differences were noted between populations of Poltava clay and Plymouth Rock white (11,2 %), minimum – between Rhode Island Red and White Plymouth Rock (4,2 %). In turn, the value of the genetic distance between the two egg-laying–meat breeds was 7,1 %.

The association of different allelic variants of detected polymorphic loci with the manifestation of economically useful traits was established. For each experimental population, complexes of desirable genotypes corresponded by productivity directions were identified. In the direction of egg productivity for Birkivska Barvista chicken breed the formula of the desirable complex genotypes is $PRL^{II} PRL^{CC} GH1 (MspI)^{BB} GH4 (MspI)^{CC} TGF-\beta 1^{FF} TGF-\beta 3^{LL} Mx^{GG}$; for Poltava clay chicken breed – $PRL^{CC} GHR (HindIII)^{B0} GH (SacI)^{AB} IGF-I (HinfI)^{CC} TGF-\beta 1^{FF} TGF-\beta 2^{LL} TGF-\beta 3^{BB}$; for Rhode Island Red chicken breed – $PRL^{ID} PRL^{CT} IGF-I (PstI)^{C1C2} TGF-\beta 2^{BL} TGF-\beta 3^{LL} Mx^{AG}$.

The revealed genotypes for each of the loci were associated with manifestation of increased values of indexes of the egg numbers for 12 and/or 40 weeks of productivity, as well as the egg weight at 30th and/or 52th week of life.

In the direction of meat productivity for Poltava clay chicken breed the formula of the desirable complex genotypes is $GH4 (SacI)^{AB} GHR (HindIII)^{B0} IGF-I (HinfI)^{CC} PIT-I^{DD} TGF-\beta 1^{FF}$; for the Rhode Island Red chicken breed – $GH1 (MspI)^{AA} GH4 (MspI)^{CC} GH4 (AluI)^{TT} TGF-\beta 2^{BB} TGF-\beta 3^{BB}$. The revealed genotypes for each of the loci were associated with the manifestation of elevated values of indexes of live weight, carcass weight, weight of thighs, shin, pectoral muscles and stomach.

Key words: polymorphism, chickens, gene, allele, quantitative trait loci, microsatellites, population, variability, restriction, amplification, electrophoresis, productivity.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**Публікації у виданнях іноземних держав або у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз**

1. **Кулибаба Р. А.**, Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Генетическая дифференциация пород кур украинской селекции с использованием различных типов молекулярно-генетических маркеров. *Сельскохозяйственная биология*. 2018. Т. 53, № 2. С. 282–292. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).*
2. **Кулибаба Р. А.** Особенности генетической структуры популяции кур породы род-айленд красный по локусам количественных признаков. *Цитология и генетика*. 2018. Т. 52, № 3. С. 25–32.
3. **Кулибаба Р. А.**, Ляшенко Ю. В. К вопросу об образовании конформационных химерных молекул в процессе амплификации динуклеотидных тандемных повторов. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2017. Т. 22. С. 34–42. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).*
4. **Кулибаба Р. А.**, Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Новый AluI-полиморфизм в четвертом интроне гена гормона роста кур. *Цитология и генетика*. 2017. Т. 51, № 1. С. 69–75. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*
5. **Кулибаба Р. А.**, Ляшенко Ю. В. Влияние артефактов ПЦР на эффективность генотипирования по микросателлитным локусам при использовании электрофореза в нативных полиакриламидных гелях. *Цитология и генетика*. 2016. Т. 50, № 3. С. 16–23. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

6. **Кулибаба Р. А.** Анализ встречаемости мутации G2032A MX гена в популяциях кур различных пород украинской селекции. *Зоотехническая наука Белоруссии. Сборник научных трудов.* 2016. Т. 1 (ч. 1). С. 112–119.

7. **Кулибаба Р. А.,** Юрко П. С., Ляшенко Ю. В. MspI-полиморфизм четвертого интрона гена гормона роста в популяциях кур различных пород. Анализ причин возникновения дополнительного паттерна рестрикции. *Цитология и генетика.* 2015. Т. 49, № 6. С. 30–37. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).*

8. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм генов гормона роста, рецептора гормона роста, пролактина и рецептора пролактина в связи с яичной продуктивностью у кур породы полтавская глинистая. *Сельскохозяйственная биология.* 2015. Т. 50, № 2. С. 198–207.

9. **Кулибаба Р. А.** Связь функционального полиморфизма целевых генов (PRL, GH, GHR) с продуктивными признаками яичных кур украинской селекции. *Генетика и разведение животных.* 2015. № 3. С. 75–80.

10. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм генов семейства трансформирующих ростовых факторов-бета в линиях кур украинской селекции. *Молекулярная и прикладная генетика.* 2014. Т. 17. С. 97–104.

11. **Кулибаба Р. А.,** Подстрешный А. П. Полиморфизм генов пролактина и гормона роста в линиях кур украинской селекции. *Цитология и генетика.* 2012. № 6. С. 75–83. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).*

Публікації у наукових фахових виданнях України

12. **Кулібаба Р. О.,** Юрко П. С., Ляшенко Ю. В. Аналіз розподілу гаплотипів у локусах пролактину та інсуліноподібного ростового фактору-I у популяціях курей різних порід. *Вісник аграрної науки.* 2018. № 3 (780). С. 30–34.

(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).

13. **Кулібаба Р. О.** Генетична структура популяції курей лінії 02 породи род-айленд червоний за поліморфізмом мікросателітної ДНК. *Таврійський науковий вісник*. 2018. Вип. 100. Т. 1, С. 167–172.

14. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В. Аналіз генетичної диференціації субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей з використанням мікросателітних маркерів. *Вісник аграрної науки причорномор'я*. 2018. Вип. 1. С. 164–175. (Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).

15. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В. Мікросателітна мінливість у популяціях курей українських локальних порід. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького*. 2018. Т. 20, № 84. С. 70–76. (Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).

16. **Кулібаба Р. О.** Використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки селекційної роботи з популяціями курей українських локальних порід. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2017. № 118. С. 104–113.

17. **Кулібаба Р. О.** Продуктивні якості курей порід української селекції різних генотипів за локусами родини трансформуючих ростових факторів бета. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2017. № 117. С. 86–93.

18. **Кулібаба Р. О.** Аналіз зв'язку алельних варіантів генів IGF-I, GH та PIG-1 з продуктивними ознаками курей породи бірківська барвіста. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького*. 2017. Т. 19, № 79. С. 53–57.

19. **Кулібаба Р. О.** Розподіл GHR-алелів у популяціях курей різних порід. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2016. № 116. С. 54–61.

20. **Кулібаба Р. О.** Порівняльний аналіз продуктивних якостей двох експериментальних мікроліній курей породи бірківська барвиста. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2016. № 115. С. 127–133.

21. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В. Генетико-популяційний аналіз ліній курей української селекції за локусом IGF-I. *Тваринництво України*. 2015. № 11. С. 11–16. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).*

22. **Кулібаба Р. О.** Утворення гетеродуплексної ДНК при ампліфікації фрагментів генів TGF- β 2 та CHD у птахів. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2015. № 114. С. 77–83.

23. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В. Динаміка генетичної структури популяції курей породи бірківська барвиста за локусами кількісних ознак. *Сучасне птахівництво*. 2015. № 11-12. С. 14–20. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

24. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Оптимізація різних етапів ПЛР при ампліфікації промоторної ділянки гену TGF- β 2. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2014. Вип. 72. С. 30–37. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

25. **Кулибаба Р. А.,** Ляшенко Ю. В. Сравнительный анализ эффективности использования агарозных и полиакриламидных гелей в молекулярно-генетических исследованиях. *Птахівництво. Міжвід. темат. наук. збірник*. 2014. Вип. 71. С. 88–99. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

26. **Кулибаба Р. А.** SacI-полиморфизм гена гормона роста в популяциях кур пород белый плимутрок, борковская барвистая и полтавская глинистая. *Сучасне птахівництво*. 2013. № 7. С. 21–24.

27. **Кулібаба Р. О.**, Білецька Г. В., Ткачик Т. Е. Генетична структура курей з різною чутливістю до хвороби Марека за локусом *Mx*-гену. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2013. Вип. 69. С. 167–173. (Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).

28. **Кулібаба Р. О.** Алельний поліморфізм гену *pit-1* у двох лініях курей різного напрямку продуктивності. *Сучасне птахівництво.* 2012. № 11. С. 9–12.

29. **Кулібаба Р. О.**, Подстрешний О.П. Визначення статі пtiці з невираженим статевим диморфізмом з використанням полімеразної ланцюгової реакції. *Сучасне птахівництво.* 2012. № 5. С. 18–23. (Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).

30. **Кулибаба Р. А.** Генетическая структура линий кур разного направления продуктивности по локусу рецептора гормона роста. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2012. Вип. 69. С. 26–32.

31. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм гена инсулиноподобного ростового фактора-I в линии мясо-яичных кур отечественной селекции. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2012. Вип. 68. С. 250–256.

32. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм гена инсулиноподобного ростового фактора-I в популяции кур породы «Борковская барвистая». *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво».* 2012. Вип. 12 (21). С. 90–93.

Наукові праці апробаційного характеру

33. **Кулибаба Р. А.** Анализ связи аллелей гена *Mx* с хозяйственно-полезными признаками кур разных направлений продуктивности. *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: материалы XX Международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию образования кафедр крупного животноводства и переработки животноводческой продукции; свиноводства и мелкого животноводства УО БГСХА.* Горки, 2017. С. 77–81.

34. Shulika L. V., **Kulibaba R. O.** Genetic structure of Rhode-Island Red chicken breed population on PRL and INS loci. Associations between genotype and chicken productivity. *14th International Symposium of Animal Biology and Nutrition*. Bucharest, 28-29 September 2017, Bucharest. Bucharest, 2017. P. 33. (Дисертант провів частину досліджень, аналіз отриманих даних, підготував статтю).

35. **Кулібаба Р. О.** Аналіз причин типових помилок при інтерпретації даних електрофоретичного розподілу фрагментів ДНК. *Науковий прогрес в тваринництві і птахівництві: Матеріали XI Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених* (Харків, 25-26 вер. 2017 р.). Харків, 2017. С. 12–14.

36. **Кулібаба Р. О.** Моніторинг розповсюдження мутації G2032A Мх гена в популяціях курей української селекції. *Практичні результати та методичні аспекти досліджень з розведення, генетики та біотехнології у тваринництві: матеріали XIV Всеукраїнської наукової конференції молодих учених та аспірантів, присвяченої пам'яті академіка УААН Валерія Петровича Бурката*. Чубинське, 2016. С. 36–37.

37. **Кулібаба Р. О.** Особливості генотипування птиці за гемізіготними локусами з використанням молекулярно-генетичних маркерів. *Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві: матеріали X Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених* (Харків, 11-12 жовт. 2016 р.). Харків, 2016. С. 12–14.

38. **Kulibaba R. A., Tereshchenko A. V.** Transforming growth factor β 1, pituitary-specific transcriptional factor 1 and insulin-like growth factor I gene polymorphisms in the population of the Poltava clay chicken breed: association with productive traits. *Agricultural Science and Practice*. 2015. Vol. 2 (1). P. 67–72. (Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).

39. **Кулібаба Р. О.** Використання гетеродуплексного аналізу як альтернативи методу ПЛР-ПДРФ для генотипування особин птиці. *Актуальні дослідження з проблем розведення та генетики у тваринництві: матеріали XIII всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та аспірантів, присвяченої пам'яті академіка НААН Михайла Васильовича Зубця*. Чубинське, 2015. С. 29–30.

40. **Кулібаба Р. О.,** Руда С. В. Генетична характеристика популяції курей лінії Г2 породи плімутрок білий за біохімічними та ДНК-маркерами. *Птахівництво 2015: Матеріали XI міжнародної конференції* (Трускавець, 15 – 17 верес. 2015 р.). Трускавець, 2015. С. 54–59. *(Дисертант провів частину досліджень, аналіз отриманих даних, підготував статтю).*

41. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм генов PRL, PRLR, GH, GHR, PIT-1, IGFI, TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3 в линиях кур украинской селекции. *Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России: материалы XVIII международной конференции ВНАП.* Сергиев Посад, 2015. С. 72–74.

42. **Кулибаба Р. А.,** Ляшенко Ю. В. Определение пола птиц отряда *Psittaciformes* с использованием полимеразной цепной реакции. *Молекулярная диагностика 2014.* Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Москва, 2014. Т. 2. С. 517–518. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

43. **Кулибаба Р. А.** Маркер-ассоциированная селекция – ключ к решению проблемы насиживания. *Сучасні досягнення у тваринництві та птахівництві: матеріали VIII всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених.* Харків, 2014. С. 40–42.

44. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм генов семейства TGF- β в популяциях кур украинской селекции. *Сучасні досягнення в тваринництві та птахівництві: матеріали VII всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених.* Мартова. 2013. С. 47–48.

45. **Кулибаба Р. А.,** Терещенко А. В. Определение пола птиц с невыраженным половым диморфизмом методом полимеразной цепной реакции. *Инновационные разработки и их освоение в промышленном птицеводстве: материалы XVII международной конференции.* Сергиев Посад, 2012. С. 79–80. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

46. **Кулібаба Р. О.** Поліморфізм генів PRL, GH, GHR, IGF-I та PIT1 у м'ясо-яєчних та яєчних курей вітчизняної селекції. *Здоров'я тварин – екологічне благополуччя України: матеріали науково-практичної інтернет-конференції*. Тернопіль, 2012. С. 24–27.

47. **Kulibaba R. O.**, Podstreshnyi O. P., Tereshchenko O. V. Polymorphism of the prolactin gene promoter in two chicken lines of Ukrainian selection. *The 3rd Mediterranean Poultry Summit AND The 6th International Poultry Conference*. 2012. URL: <http://www.mpn-wpsa.org/3rdmps/search/abstract.php?ida=10134/> (last access: 22.05.17). Title from the screen. (*Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку*).

48. **Кулибаба Р. А.**, Кривохижая М. В. Определение пола птиц методом полимеразной цепной реакции. *Голубівництво та декоративне птахівництво: історія, проблеми, перспективи: матеріали міжнарод. науково-практ. конф., 11-12 червня 2011 р. Миколаїв, 2011. С. 129–134. (Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку)*.

49. **Кулібаба Р. О.**, Подстрешний О. П., Подстрешна І. О. Генетична ідентифікація і паспортизація ліній і порід птиці. *Аграрна наука – виробництво*. 2011. № 3. С. 23. (*Дисертант провів частину досліджень, аналіз отриманих даних, підготував статтю*).

Додатково відображають наукові результати дисертації

50. **Кулібаба Р. О.**, Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів (PCR-RFLP, Indel) у селекційній роботі з птицею порід Полтавська глиняста та Бірківська барвиста: методичні рекомендації. Бірки: Державна дослідна станція птахівництва НААН, 2015. 18 с. (*Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків*).

51. **Кулібаба Р. О.**, Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Спосіб контролю денатурації ДНК при використанні електрофорезу у поліакриламідному гелі:

патент на корисну модель № 123147, МПК: G01N 33/483. № u201709210; заявл. 18.09.2017; опубл. 12.02.2018. Бюл. № 3. 3 с. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ABSTRACT.....	8
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	28
ВСТУП.....	29
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	38
1.1 Сучасне птахівництво – стратегічна галузь тваринництва.....	38
1.2 Маркер-асоційована селекція (MAS) у сучасному птахівництві	41
1.3 Поліморфізм ДНК як основа генетичної мінливості	49
1.4 Молекулярно-генетичні маркери – інструмент дослідження генетичної мінливості популяцій	54
1.5 Функціональний поліморфізм генів, що пов’язані з проявом господарсько- корисних ознак курей.....	65
1.6 Обґрунтування наряду власних досліджень	84
РОЗДІЛ 2. ЗАГАЛЬНА МЕТОДИКА ТА ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ....	86
2.1 Матеріал досліджень.....	86
2.2 Обладнання, що використане в роботі.....	89
2.3 Методики та методи досліджень.....	89
2.4 Методи статистичної обробки результатів досліджень.....	94
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕХНІКИ ДНК-ТИПУВАННЯ.....	100
3.1 Аналіз конформаційних артефактів ПЛР при вивченні мікросателітної мінливості	101
3.2 Гетеродуплексний аналіз поліморфізму цільових генів.....	119

РОЗДІЛ 4. МІКРОСАТЕЛІТНА МІНЛИВІСТЬ У ПОПУЛЯЦІЯХ КУРЕЙ РІЗНИХ ПОРІД УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ.....	125
4.1 Мікросателітна мінливість у популяціях курей різних порід яєчного та комбінованого напрямів продуктивності	126
4.2 Генетична диференціація різних субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей	134
4.3 Генетична диференціація популяцій курей ліній 02 та 38 породи род-айленд червоний.....	143
РОЗДІЛ 5. ПОЛІМОРФІЗМ ЛОКУСІВ КІЛЬКІСНИХ ОЗНАК У ПОПУЛЯЦІЯХ КУРЕЙ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ.....	149
5.1 Поліморфізм гену пролактину за наявністю інсерції розміром 24 п.н. у промоторній ділянці	150
5.2 Однонуклеотидний поліморфізм у положенні -2402 гену пролактину (С-2402Т)	153
5.3 MspI-поліморфізм у першому інтроні гену гормону росту	158
5.4 SacI-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту	162
5.5 Поліморфізм гену гіпофізарного фактору транскрипції-1 за наявністю інсерції розміром 57 п.н. у другому інтроні	165
5.6 Поліморфізм генів родини TGF- β	168
5.6.1 MboII-поліморфізм екзонної ділянки гену TGF- β 1	168
5.6.2 RsaI-поліморфізм промоторної дялінки гену TGF- β 2	170
5.6.3 BslI-поліморфізм у четвертому інтроні гену TGF- β 3	175
5.7 PstI-поліморфізм у 5'UTR фрагменті гену інсуліноподібного ростового фактору I.....	179
5.8 HinfI-поліморфізм у промоторній ділянці гену інсуліноподібного ростового фактору-I.....	183

	26
5.9 NspI -поліморфізм у 5 інтроні гену рецептора гормону росту.....	188
5.10 HindIII-поліморфізм у другому інтроні гену рецептору гормону росту.....	190
5.11 BamHI-поліморфізм у 5 екзоні гену рецептора пролактину	194
5.12 RsaI-поліморфізм у 13 екзоні Mx гену.....	196
5.13 MspI-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту.....	199
5.14 AluI-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту	212
5.15 Динаміка генетичної структури популяції курей породи бірківська барвіста за локусами кількісних ознак	219
5.16 Генетична диференціація дослідних популяцій за поліморфізмом локусів кількісних ознак	224
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ЗВ'ЯЗКУ ПОЛІМОРФНИХ ЛОКУСІВ ІЗ ГОСПОДАРСЬКО- КОРИСНИМИ ОЗНАКАМИ КУРЕЙ РІЗНИХ ПОРІД ТА НАПРЯМІВ ПРОДУКТИВНОСТІ	
	231
6.1. Зв'язок генотипів поліморфних локусів з показниками продуктивності курей породи бірківська барвіста.....	232
6.2 Виробнича перевірка продуктивних якостей двох експериментальних мікроліній курей породи бірківська барвіста	241
6.3 Зв'язок генотипів поліморфних локусів з показниками яєчної продуктивності курей породи полтавська глиняста.....	243
6.4 Зв'язок генотипів поліморфних локусів з показниками м'ясної продуктивності курей породи полтавська глиняста.....	251
6.5 Зв'язок генотипів поліморфних локусів з показниками яєчної продуктивності курей породи род-айленд червоний.....	258
6.6 Зв'язок генотипів поліморфних локусів з показниками м'ясної продуктивності курей породи род-айленд червоний.....	266
6.7 Порівняльний аналіз зв'язку різних алельних варіантів функціональних генів з показниками продуктивності курей різних порід	273

	27
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	278
ВИСНОВКИ.....	297
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	301
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	302
ДОДАТКИ.....	355

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

bp – base pair;

GH – ген гормону росту;

GHR – ген рецептору гормону росту;

IGF-I – ген інсуліноподібного ростового фактору-I;

Indel – інсерція/делеція;

LD – нерівновага за зчепленням;

MAS – маркер-асоційована селекція;

Mx – Mx-ген;

PAAG – поліакриламідний гель;

PCR – полімеразна ланцюгова реакція;

PIT-1 – ген гіпофізарного фактору транскрипції 1;

PRL – ген пролактину;

PRLR – ген рецептору пролактину;

QTL – локуси кількісних ознак;

RFLP – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів;

SNP – однонуклеотидний поліморфізм;

SSR – короткі прості послідовності;

STR – короткі тандемні послідовності;

TGF- β 1 – ген трансформуючого ростового фактору β 1;

TGF- β 2 – ген трансформуючого ростового фактору β 2;

TGF- β 3 – ген трансформуючого ростового фактору β 3;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

п.н. – пар нуклеотидів.

ВСТУП

Актуальність теми. У сучасній генетиці птиці все більшу розповсюдженість отримують молекулярно-генетичні методи досліджень. Молекулярно-генетичні маркери, які донедавна були своєрідною екзотикою, наразі є повсякденним інструментом у проведенні масштабних генетико-селекційних досліджень [1]. Повсюдне розповсюдження ДНК-технологій дало змогу створити передумови для проведення селекції птиці на принципово новому рівні, приймаючи до уваги всі можливості роботи безпосередньо зі спадковим матеріалом [2]. Розробка у середині 80-х років минулого століття методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) призвела до революційного прориву в галузі молекулярної генетики. Вперше з'явилася можливість практично в кожній спеціалізованій лабораторії аналізувати цільові фрагменти геному, що, у свою чергу, супроводжувалось колосальним прогресом у найрізноманітніших галузях наук про життя [3].

У практиці світового тваринництва взагалі, та птахівництва зокрема, використання досягнень маркерної та геномної селекції вже відноситься до невід'ємних компонентів науково-технічного прогресу. В Україні сучасні ДНК-технології активно використовуються в дослідженнях різних порід великої рогатої худоби та в практиці свинарства [4, 5]. Виявлено перспективи використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів для вирішення цілої низки проблем бджільництва [6]. Однак, незважаючи на очевидні переваги, у вітчизняному птахівництві роботи, присвячені використанню сучасних досягнень молекулярної генетики, представлені лише у вигляді поодиноких, окремих досліджень, проведених, за рідкісним винятком, на комерційних породах курей [7–10]. Переважна більшість робіт з визначення генетичних особливостей локальних порід та ліній курей української селекції охоплює лише питання стосовно біохімічного поліморфізму, імуногенетики, а

також варіації прояву продуктивних ознак, тобто, фенотипного прояву в цілому [11–14].

На цьому етапі розвитку науки методи, що ґрунтуються на фенотиповій оцінці рівня генетичної мінливості, не можуть повною мірою відобразити істинну картину, що багато в чому перешкоджає ефективному впровадженню різних селекційних програм та обмежує можливості використання українських локальних порід курей у практиці сучасного птахівництва.

Виходячи із зазначеного, теоретичне обґрунтування та практична реалізація маркер-асоційованої селекції українських локальних порід курей, а також дослідження генетичної структури дослідних популяцій за використання різних типів ДНК-маркерів відносяться до найактуальніших завдань вітчизняного птахівництва та мають суттєве теоретичне та практичне значення, що й обумовило напрям виконаної дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Загальні положення дисертаційної роботи розроблені та виконані у лабораторії генетичного контролю та молекулярної діагностики Інституту птахівництва НААН, лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Інституту тваринництва НААН, лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Державної дослідної станції птахівництва НААН та в лабораторії молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН у період 2010 – 2018 років за завданнями: «Розробити методологію оцінки продуктивного потенціалу сільськогосподарської птиці із застосуванням молекулярно-генетичних маркерів» (номер державної реєстрації 0111U002491); «Вивчити генетичні особливості курей вітчизняної селекції резистентних до хвороби Марека» (номер державної реєстрації 0111U002495); «Розробити методологію раціонального використання наявного в Україні генофонду птиці для ресинтезу зниклих і синтезу нових перспективних форм» (номер державної реєстрації 0111U002498); «Визначити генетичну структуру популяцій великої рогатої худоби та особливості реалізації генетичного потенціалу тварин за

використання методів біоінформатики та геноміки» (номер державної реєстрації 0116U002304).

Мета і завдання досліджень. Теоретично обґрунтувати та практично реалізувати використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів у маркер-асоційованій селекції українських локальних порід курей.

Для досягнення означеної мети були поставлені наступні завдання:

- уніфікувати та оптимізувати методи проведення генотипування особин курей за використання PCR-RFLP, Indel та SSR-маркерів;
- розробити теоретичні підходи щодо оцінки впливу артефактів ампліфікації на ефективність генотипування птиці за використання PCR-RFLP, Indel та SSR-маркерів;
- вивчити генетичну структуру популяцій курей порід плімутрок білий, полтавська глиняста, бірківська барвиста та род-айленд червоний за локусами пролактину (*PRL*), рецептору пролактину (*PRLR*), гормону росту (*GH*), рецептору гормону росту (*GHR*), гіпофізарного фактору транскрипції 1 (*PIT-1*), інсуліноподібного ростового фактору I (*IGF-I*), генної родини трансформуючих ростових факторів β (*TGF- β 1*, *TGF- β 2*, *TGF- β 3*), Мх-гену (*Mx*);
- виявити особливості мікросателітної мінливості у популяціях курей різних порід української селекції;
- дослідити генетичну диференціацію субпопуляцій українських курей в межах комбінованих напрямів продуктивності за сукупністю мікросателітних локусів;
- виявити специфіку генетичної структури популяцій українських локальних порід курей за сукупністю молекулярно-генетичних маркерів;
- з'ясувати зв'язок алельних варіантів генів *PRL*, *PRLR*, *GH*, *GHR*, *IGF-I*, *PIT-1*, *TGF- β 1*, *TGF- β 2*, *TGF- β 3* та *Mx* з показниками м'ясної та ячної продуктивності курей різних порід;
- визначити формули перспективних генотипів для ліній курей ячного та комбінованого напрямів продуктивності за комплексом різних функціональних генів;

- отримати мікролінії курей на основі виявлених бажаних генотипів за сукупністю алельних варіантів поліморфних локусів;
- установити продуктивні якості дослідних мікроліній курей із заданими генотипами за виявленими поліморфними маркерами;
- розробити комплексну систему використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів у маркер-асоційованій селекції українських локальних порід курей.

Об'єкт дослідження – популяційно-генетична оцінка дослідних ліній та порід курей за сукупністю молекулярно-генетичних маркерів, асоціації алельних варіантів різних локусів кількісних ознак з проявом господарсько-корисних ознак курей різних порід.

Предмет дослідження – частоти генотипів та алелів мікросателітних локусів та генів кількісних ознак, генетична мінливість за сукупністю різних типів молекулярно-генетичних маркерів, параметри генетичної відстані та диференціації дослідних ліній курей, яєчна та м'ясна продуктивність птиці.

Методи дослідження: *молекулярно-генетичні* – виділення ДНК, проведення ампліфікації та рестрикції дослідних фрагментів, проведення горизонтального та вертикального електрофорезу, детекція нуклеїнових кислот; *популяційно-генетичні* – визначення частот генотипів та алелів, фактичної та очікуваної гетерозиготності, ефективної кількості алелів, індексу поліморфності локусу, відповідності стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, показників F-статистики Райта, розрахунок генетичних дистанцій за Nei; *зоотехнічні* – визначення показників продуктивності птиці; *статистичні* – біометрична обробка результатів досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше науково обґрунтовано, розроблено і рекомендовано до практичної реалізації комплексну систему використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів у маркер-асоційованій селекції за розведення вітчизняних локальних порід курей як основний методологічний інструментарій для визначення їх загальних генетико-популяційних характеристик.

Вперше виявлено складові генетичної структури дослідних популяцій курей порід плімутрок білий (лінія Г-2), бірківська барвиста (лінія А), полтавська глиняста (лінія 14) та род-айленд червоний (лінія 38) за використання молекулярно-генетичних маркерів PCR-RFLP, Indel та SSR.

Оптимізовано техніку ДНК-типування особин дослідних популяцій із застосуванням молекулярно-генетичних маркерів SSR і Indel, на основі яких розкрито механізм утворення неспецифічних продуктів ПЛР та конформаційних химерних молекул ДНК в процесі ампліфікації динуклеотидних тандемних повторів.

Встановлено найбільш інформативні генетико-популяційні параметри мікросателітної мінливості в дослідних лініях курей вітчизняної селекції різних напрямів продуктивності.

Вперше виявлено особливості генетичної диференціації різних субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей (лінії Г-1, Г-2, Г-3, Г-4 і С) та курей породи род-айленд червоний (лінії 02 і 38) із застосуванням комплексу мікросателітних маркерів.

Вперше доведено існування нової мутації в четвертому інтроні гену гормону росту – транзиція С→Т у положенні Chr27:1788455, для детекції якої розроблено і експериментально апробовано оригінальний метод PCR-RFLP за використання ендонуклеази рестрикції AluI.

Аргументовано зв'язок різних алельних варіантів цільових генів (10 QTL, 16 мутацій) з господарсько-корисними ознаками курей різних генотипів та обґрунтовано найбільш перспективні з них для ефективного використання у селекційній роботі з метою підвищення яєчної та м'ясної продуктивності.

Розроблено спосіб контролю денатурації ДНК при використанні електрофорезу в поліакриламідному гелі, інноваційну складову якого захищено патентом України на корисну модель № 123147.

Практичне значення одержаних результатів. Використання отриманих в дисертаційній роботі результатів досліджень з визначення особливостей генетичної структури популяцій курей українських локальних порід різних

напрямів продуктивності, а також зв'язку між виявленими алельними варіантами поліморфних локусів і господарсько-корисними ознаками дає змогу, у комплексі з класичними методами, проводити селекційну роботу безпосередньо на рівні варіацій спадкового матеріалу, що, у свою чергу, сприяє значному збільшенню продуктивного потенціалу птиці.

Застосування сукупності молекулярно-генетичних маркерів PCR-RFLP, Indel і SSR для виявлення загальних параметрів генетичної мінливості дослідних популяцій курей вітчизняної селекції забезпечує ефективний контроль селекційної роботи з нею. Запропоновані формули перспективних генотипів у напрямках яєчної та м'ясної продуктивності курей різних порід за локусами кількісних ознак зумовили можливість отримання нащадків з бажаними комплексними генотипами шляхом індивідуального підбору особин для схрещування.

Розроблений метод PCR-RFLP дає змогу проводити масштабні типування особин курей за AluI-поліморфізмом четвертого інтрону гену гормону росту.

Розроблені концептуальні підходи з оптимізації техніки ДНК-типування особин дослідних популяцій за сукупністю мікросателітних локусів, а також встановлені особливості утворення різних артефактів у процесі ампліфікації цільових фрагментів геному, сприяли підвищенню ефективності та суттєвому зменшенню помилок генотипування.

Окремі напрацювання використовуються у навчальному процесі при викладенні фахових дисциплін, що підтверджується актами про впровадження результатів дисертаційної роботи у навчальний процес та карткою зворотного зв'язку: «Технологія виробництва продукції птахівництва», «Інноваційні технології у тваринництві» факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва Полтавської державної аграрної академії; «Основи молекулярної біотехнології та генної інженерії», «Молекулярна біотехнологія» факультету біотехнології та природокористування Харківської державної зооветеринарної академії; «Технологія виробництва продукції птахівництва», «Інноваційні технології виробництва продукції тваринництва», «Технологія

виробництва і переробки продукції тваринництва» факультету технології продукції тваринництва та менеджменту Харківської державної зооветеринарної академії; «Основи генетики та селекції сільськогосподарських тварин» технологічного відділення Липковатівського аграрного коледжу.

Особистий внесок здобувача. Автором безпосередньо розроблено систему використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів у маркер-асоційованій селекції за розведення вітчизняних локальних порід курей, сформульовано методологічну концепцію виконаної роботи, програму комплексних досліджень, проведено патентний пошук, аналіз джерел літератури за темою дисертаційної роботи, розроблено схеми дослідів у лабораторних та виробничих умовах, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, виконано статистичну обробку отриманого матеріалу, сформульовано висновки та пропозиції виробництву.

Використання матеріалів спільних досліджень, в яких автор брав участь безпосередньо, погоджено зі співавторами. Одержані наукові результати, що виносяться на захист, є особистим досягненням здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на засіданнях вченої ради та ради молодих вчених Інституту птахівництва НААН, Державної дослідної станції птахівництва НААН, Інституту тваринництва НААН упродовж 2010 – 2018 років, засіданнях методичної ради Інституту птахівництва та Інституту тваринництва НААН; IV Українській молодіжній конференції по птахівництву (Задонецьке, 2010); Міжнародній науково-практичній конференції «Голубівництво та декоративне птахівництво: історія, проблеми, перспективи» (Миколаїв, 2011); VI Українській молодіжній конференції «Новітні досягнення в тваринництві та птахівництві» (Задонецьке, 2012); Науково-практичній інтернет конференції «Здоров'я тварин – екологічне благополуччя України» (Тернопіль, 2012); XIII Українській конференції з птахівництва «Актуальні проблеми сучасного птахівництва» (Алушта, 2012); «The 3rd Mediterranean Poultry Summit and The 6th International Poultry Conference» (Alexandria, 2012);

XVII Міжнародній конференції «Иновационные разработки и их освоение в промышленном птицеводстве» (Сергіїв Посад, 2012); VII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Сучасні досягнення в тваринництві та птахівництві» (Мартова, 2013); IX Міжнародній конференції «Птахівництво 2013» (Судак, 2013); XIV Українській конференції з птахівництва з міжнародною участю «Актуальные проблемы современного птицеводства» (Алушта, 2013); VIII Всеросійській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Молекулярная диагностика 2014» (Москва, 2014); VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Сучасні досягнення у тваринництві та птахівництві» (Харків, 2014); XI Міжнародній конференції «Птахівництво 2015» (Трускавець, 2015); XIII Всеукраїнській науковій конференції молодих вчених та аспірантів, присвяченій пам'яті академіка НААН Михайла Васильовича Зубця «Актуальні дослідження з проблем розведення та генетики у тваринництві» (Чубинське, 2015); XVIII Міжнародній конференції «Иновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России» (Сергіїв Посад, 2015); IX Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Сучасні досягнення і перспективи розвитку тваринництва та птахівництва. Погляд молодих учених» (Харків, 2015); «9 Украинской конференции по птицеводству и инкубации яиц сельскохозяйственной птицы» (Харків, 2016); XIV Всеукраїнській науковій конференції молодих учених та аспірантів, присвяченої пам'яті академіка УААН Валерія Петровича Бурката «Практичні результати та методичні аспекти досліджень з розведення, генетики та біотехнології у тваринництві» (Чубинське, 2016); X Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві» (Харків, 2016); XX Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства» (Горки, 2017); XI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Науковий прогрес в тваринництві і птахівництві» (Харків, 2017); 14th International Symposium of Animal Biology and Nutrition (Bucharest, 2017).

Публікації. Основні положення та результати дисертаційної роботи викладено у 51 науковій праці, серед яких опубліковано у фахових виданнях України – 21, у виданнях іноземних держав або у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз – 11 (з них у SCOPUS – 7), робіт апробаційного характеру – 17, методичні рекомендації – 1, патент України на корисну модель – 1.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 374 сторінках комп'ютерного тексту, містить 61 рисунок, 63 таблиці та складається з анотацій, переліку умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів, вступу, огляду літератури, загальної методики та основних методів досліджень, результатів власних експериментальних досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел (482 джерела, у тому числі 322 латиницею), а також додатків.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасне птахівництво – стратегічна галузь тваринництва

У контексті сучасного тваринництва, до однієї із галузей, що інтенсивно розвиваються за цілою низкою показників, відноситься птахівництво, яке характеризується загальною скоростиглістю, високим рівнем рентабельності та швидкою окупністю внесків [15].

Ключова особливість птахівництва – можливість забезпечити населення продуктами харчування (м'ясо, яйця) за короткий час, що робить цю галузь стратегічно важливою у контексті продовольчої безпеки держави [16]. Ріст населення планети відноситься до одного із основних чинників різкого розвитку птахівництва у напрямку збільшення виробництва м'яса. У подальшому, із урахуванням прогнозу про збільшення чисельності населення до 9 млрд. осіб до 2050 року тенденції розвитку галузі тільки посиляться, що призведе до необхідності у все більшій інтенсифікації виробництва [17].

На цей час саме птахівництво, у першу чергу виробництво бройлерів, може задовольнити потребу світового населення у повноцінному джерелі білку. Однак й у цьому випадку необхідний подальший розвиток галузі із залученням сучасних технологій і нових методичних підходів [18].

На сьогоднішній день у світовому виробництві м'яса продукція птахівництва займає провідне місце поряд із свинарством, однак у подальшому, з урахуванням перспектив, що відкриваються, показники зміняться у бік збільшення. Розвитку галузі, росту об'ємів виробництва продукції сприяє використання досягнень сучасної генетики та селекції, підвищення рівня ветеринарного обслуговування, використання передових технологій утримання та годівлі птиці [19]. При цьому безпосередньою основою ефективності птахівництва в цілому стає використання сучасних інструментів селекційної

роботи, що поєднує у собі найрізноманітніші підходи та досягнення молекулярної і прикладної генетики.

Метою сучасної селекції в птахівництві є створення високопродуктивних порід та ліній птиці за двома основними напрямками продуктивності – м'ясному та яєчному. Поряд із цим до перспективного напрямку відноситься також комбінований тип продуктивності – м'ясо-яєчний або яєчно-м'ясний. Спеціалізовані яєчні або м'ясні породи курей, як вузькоспеціалізовані для отримання конкретного продукту (яйця, м'ясо), чудово підходять для використання на великих промислових об'єктах з виробництва продукції птахівництва в масових об'ємах. Породи комбінованого напрямку продуктивності, не дивлячись на їх відставання від значень показників господарсько-корисних ознак спеціалізованих порід курей, більш універсальні, та, при цьому, перспективні для використання у дрібних фермерських господарствах або для задоволення потреб приватного сектору (подвір'я, підсобні підприємства).

На сьогоднішній день птахівництво в Україні – це найбільш розвинена галузь тваринництва, що має увесь необхідний потенціал для подальшого розвитку [20–22]. Птахівництво, серед інших галузей тваринництва, – це практично єдина галузь, яка протягом останніх років демонструвала позитивну динаміку росту [23]. Після періоду різкого спаду галузі впродовж 90-х років минулого сторіччя, поголів'я всіх видів сільськогосподарської птиці, починаючи з 2000 року, поступово збільшувалось включно до 2013 року. Останні декілька років спостерігається деяке зменшення поголів'я та, відповідно, об'ємів виробництва продукції птахівництва, що, насамперед, пов'язано зі складною економічною ситуацією в країні [24]. При цьому враховуються як промислове птахівництво, так і невеликі приватні господарства у населення. Досить високий відсоток птиці, що утримується саме населенням, відносно загального, є однією із особливостей українського птахівництва [25].

В Україні на 2014 рік склалась наступна ситуація щодо розподілу птиці в господарствах різних типів власності: в цілому загальне поголів'я птиці всіх видів становило близько 218,4 млн. голів. 57 % від загальної його кількості утримувалось у спеціалізованих крупних виробничих центрах, 43 % – у населення. Відповідним чином розподілялась і продукція птахівництва [26].

В останні роки, не дивлячись на успіхи світового птахівництва, а цілком можливо завдяки їм, складається ситуація фактичної монополізації ринку племінних ресурсів з боку найбільших селекційних компаній, що потенційно має у собі підвищені ризики для локального племінного птахівництва [27]. Монополізація ринку, окрім очевидних економічних наслідків, зумовлює безпосередню загрозу існуванню місцевих генофондних порід різних видів сільськогосподарської птиці. Головний чинник – істотне відставання сукупності селекційних досягнень за значеннями продуктивних показників локальних порід порівняно з комерційними лініями. Однак, не дивлячись на існуючу різницю в показниках господарсько-корисних ознак кури локальних порід та порідних груп при цьому мають унікальний генофонд, сформований під дією багатьох років утримання та селекційної роботи, характеризуються високими значеннями показників життєздатності та адаптованістю до місцевих умов. Більше того, з урахуванням наявності унікальних комплексних генотипів, характерних саме для курей локальних порід, на фоні їх продуктивних та адаптаційних показників, можна зробити висновок про необхідність проведення фундаментальних досліджень, пов'язаних із вивченням генетичних характеристик дослідних популяцій, що цілком відповідає загальній задачі збереження унікальних генетичних ресурсів [28, 29]. Унікальний спадковий матеріал, характерний саме для локальних популяцій курей, потребує виконання досліджень у напрямку паспортизації існуючих порід за сукупністю маркерних генів (генів-кандидатів), оцінки рівня прояву господарсько-корисних ознак тощо [30]. На цей момент проводиться вивчення продуктивних якостей локальних порід та порідних груп курей української селекції [31, 32]. На підставі проведених досліджень доведено економічну доцільність

утримання локальних порід курей різних напрямів продуктивності у племінних господарствах України [33].

Внаслідок своєї невибагливості та високої життєздатності кури локальних порід користуються стійким попитом у населення для утримання на подвір'ї та у невеликих фермерських господарствах. Так, за даними Терещенко О.В. зі співавторами, поголів'я сільськогосподарської птиці різних видів у населення становило близько 93,9 млн. голів [26, 34]. При цьому необхідно приймати до уваги широко розповсюджену в Україні практику «народної» селекції, використання якої призводить до ще більшої розповсюдженості місцевих порід серед населення. Таким чином, вимальовується наступна картина. При розподілі, що маємо, поголів'я всіх видів сільськогосподарської птиці у населення й у промислових птахівничих підприємствах (43 та 57 %, відповідно), у першому випадку використовують, як правило, локальні породи, у другому – комерційні лінії. Відповідно, з урахуванням виробництва продукції птахівництва, ринок локальних порід курей займає досить вагоме положення в загальній економічній ситуації, що, в свою чергу, додатково вказує на необхідність проведення селекційно-генетичних заходів щодо підтримання та поліпшення племінного ядра саме місцевих порід. Задача збереження генофонду місцевих порід та популяцій птиці призводить до необхідності проведення досліджень, спрямованих на вивчення особливостей генетичної структури дослідних популяцій, оцінки рівня спадкової та модифікаційної мінливості, адаптаційних та продуктивних якостей, що дасть змогу, у майбутньому, перейти до використання сучасних селекційних програм, які розраховані на максимально можливу реалізацію продуктивного потенціалу птиці та на збільшення її конкурентоспроможності.

1.2 Маркер-асоційована селекція (MAS) у сучасному птахівництві

Сучасна селекція птиці досягла вражаючих успіхів – отримані різноманітні високопродуктивні лінії та кроси різних напрямів продуктивності,

виведені експериментальні групи тварин, стійких до різних захворювань бактеріальної та вірусної етіології тощо. Однак, не дивлячись на ці успіхи, на сучасному етапі розвитку птахівництва, застосування одних лише методів класичної селекції, що базуються на використанні оцінки особин за фенотипом, багато в чому тільки гальмує ефективність роботи (що можна продемонструвати вираженими відмінностями у показниках продуктивності курей вітчизняних та закордонних порід). Можливість роботи зі спадковим матеріалом безпосередньо постає на порядку денному, а широке розповсюдження методів маркер-асоційованої селекції (MAS) у нашій країні є лише питанням часу. Використання MAS дало змогу закордонним селекціонерам вирішити цілий ряд принципових питань, що, в свою чергу, призвело до утворення високопродуктивних ліній і максимально наблизило до повного розкриття продуктивного потенціалу птиці [35–37]. Вивчення популяційно-генетичних аспектів генофондних (аборигенних) порід курей, поряд з комерційними лініями, відноситься до одного із найактуальніших питань сучасного птахівництва для найрізноманітніших країн [38, 39]. Аналіз генетичної структури дослідних популяцій курей – необхідний елемент у загальній стратегії маркер-асоційованої селекції, що має безпосереднє відношення до проблеми збереження генофонду. Проведення генетико-популяційних досліджень дає змогу оцінити алельне різноманіття за кожним із цільових локусів, виявити поліморфні та мономорфні варіанти різних генів [40, 41]. Також істотним є визначення факту наявності/відсутності відхилень від стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, що, в свою чергу, дає змогу зробити висновок про дію відбору або інших чинників, які впливають на популяційну структуру (тобто визначити напрям селекційної роботи в цілому). Наступний крок у цьому напрямку – вивчення зв'язку різних алельних варіантів цільових генів з господарсько-корисними ознаками курей різних порід та напрямів продуктивності, що має визначити значущі, з точки зору практичного використання в селекції, алелі різних генів [42–44]. У цьому контексті велике значення має факт потенціальної породоспецифічності кожного із

перспективних маркерів, що призводить до варіативності вираженості ефекту конкретного алеля на ту, або іншу ознаку в різних лініях курей. Для кожного із потенційних генів-кандидатів це питання суворо індивідуальне, що визначає необхідність проведення популяційно-генетичних досліджень на значній кількості популяцій курей різних порід та напрямів продуктивності.

В основі маркер-асоційованої селекції (Marker-Assisted Selection, відбір за допомогою маркерів) лежить використання широкого інструментарію, у вигляді різних типів молекулярно-генетичних маркерів, для вирішення задач селекції [45–48].

В першу чергу, для проведення результативної селекційної роботи, при проведенні MAS використовують дані щодо поліморфізму різних цільових генів або фрагментів геному в зв'язку з продуктивними ознаками. Подібний підхід широко застосовується як у птахівництві зокрема, так й у тваринництві в цілому [49].

Загальний підхід для рішення цілої низки завдань, можна, дещо спрощуючи, представити у вигляді наступних положень:

- проведення генетико-популяційних досліджень обраної групи тварин або птиці;
- вивчення зв'язку різних алельних варіантів поліморфних генів з показниками продуктивності тварин;
- підбір особин для схрещування, отримання експериментальних мікроліній із заданими комплексними генотипами за сукупністю перспективних генів-кандидатів;
- аналіз продуктивних якостей експериментальних мікроліній;
- пропозиції виробництву (впровадження у виробництво).

Проведення генетико-популяційних досліджень відноситься до необхідного базисного кроку, що визначає всі подальші дії. При аналізі генетичної структури, в першу чергу, отримують дані щодо поліморфізму кожного із генів-кандидатів, розподілу частот алелів та генотипів, динаміки мікроеволюційних процесів у популяції тощо [40, 50, 51]. На цьому етапі є

потреба у вивченні конкретного поліморфізму певного локусу, оскільки для подальших досліджень значення мають тільки поліморфні маркери, так як у випадку мономорфності локусу провести відбір особин різних генотипів неможливо. У випадку встановлення поліморфності обраного локусу переходять до подальших досліджень.

На наступному етапі проводять вивчення зв'язку поліморфізму за цільовими маркерами з продуктивними ознаками. У цьому контексті має критичне значення факт породоспецифічності молекулярно-генетичних маркерів. Саме вірогідність прояву асоціативного зв'язку з будь-яким показником продуктивності тільки у межах експериментальної популяції конкретної породи призводить до неможливості екстраполяції результатів, отриманих на одній породі, на усі інші. Виходячи із усього вищевикладеного, стає очевидною необхідність проведення досліджень другого етапу для визначення сили впливу (мажорний/мінорний/нейтральний) поліморфного маркеру на продуктивні ознаки курей дослідної групи (популяції).

Результати досліджень можна використати для проведення селекційної роботи з метою отримання нащадків з бажаними генотипами (мікролінії), які характеризуються оптимальними значеннями показників (яєчна та м'ясна продуктивність, якість яйця тощо), що цікавлять дослідника, а також заданими комплексними генотипами за сукупністю поліморфних локусів. У подальшому проводять аналіз продуктивних якостей експериментальних мікроліній в умовах промислового (фермерського) утримання.

Безперечно, що початковою умовою, якій повинен відповідати маркер для можливості його використання у процесі маркер-асоційованої селекції, є поліморфність. Однак, дуже важливою також є й функціональна активність маркерного фрагменту ДНК. У зв'язку з цим до найбільш перспективних мішеней відносяться різні гени, які пов'язані з регуляцією основних фізіологічних функцій організму, що безпосередньо відображається на прояві господарсько-корисних ознак (фенотип).

Гени-кандидати, що використовуються для задач маркер-асоційованої селекції умовно можна розділити на два класи:

функціональні гени-кандидати – безпосередньо пов’язані з проявом господарсько-корисної ознаки;

позиційні гени-кандидати – знаходяться у групі зчеплення з будь-яким геном, що, в свою чергу, на пряму пов’язаний з проявом господарсько-корисної ознаки [52].

Ген-кандидат другого класу може не мати прямого впливу на ознаку, яка проявляється, однак, його знаходження в групі зчеплення з функціональним геном дає змогу його використання для проведення генотипування особин [53, 54]. В ролі позиційного гену також може виступати й просто поліморфний фрагмент геному, що дає змогу інтерпретувати дану ділянку ДНК не як позиційний ген, а як позиційний маркер. Головна умова – однакова група зчеплення.

Поряд із цим у ролі функціонального гену-кандидату в групі зчеплення з позиційним маркером може заходитись анонімний ген, або фрагмент геному, що особливо часто спостерігається у випадку відсутності детальної інформації про повну нуклеотидну структуру геному виду тварини, яка аналізується. У будь-якому випадку, з поступовим розвитком методів секвенування та проведенням повної розшифровки геномів сільськогосподарських тварин, ідентифікації усіх можливих функцій кожного із генів, використання потенційних генів-кандидатів буде обмежуватися лише маркерами першого класу. Однак, на цьому етапі розвитку генетики сільськогосподарських тварин, застосування позиційних молекулярно-генетичних маркерів, цілком виправдано.

Використання позиційних маркерів призводить до необхідності проведення досліджень з визначення різних груп зчеплення, а також аналізу на наявність нерівноваги за зчепленням (LD, **L**inkage **D**isequilibrium) між різними поліморфними маркерами [55]. Визначення гаплотипу, який характеризується нерівноважним станом за зчепленням, дає змогу у подальшому проводити типування тварин за допомогою аналізу алельного стану тільки одного із

структурних елементів групи зчеплення, що, в свою чергу, істотно зменшує витрати при проведенні доволі масштабних генотипувань. Аналіз нерівноваги за зчепленням також перспективний й у випадку з функціональними генами-кандидатами, що знаходяться в одній хромосомі у безпосередній близькості один до одного [56, 57]. Він широко використовується при типуванні різних поліморфних сайтів у межах окремого гену. У такому випадку можна охарактеризувати найбільш перспективний комплексний гаплотип за одним дослідним геном, що дасть змогу максимально ефективно використовувати його у подальшій селекційній роботі. Вірогідність «розриву» різних поліморфних сайтів, що знаходяться на незначній відстані один до одного практично мінімальна, що й визначає їх зчеплений стан у ряду поколінь.

Повна розшифровка нуклеотидної послідовності геномів різних видів сільськогосподарських тварин та ідентифікація функцій різних генів зумовить проведення селекції безпосередньо на рівні одного функціонального гену, тобто ген-асоційована селекція (**GAS, Gene-Associated Selection**), що особливо актуально у випадку якісних ознак [58, 59].

До ефективних різновидів маркер-асоційованої селекції також відноситься лінійна селекція на основі MAS з одноразовим генотипуванням (**SLS-MAS – Single-Large Scale Marker-Assisted Selection**) [60]. Суть методу полягає у проведенні генотипувань особин за одним або декількома (комплекс) маркерами на етапі формування мікроліній (прабатьківські форми), що дасть змогу елімінувати небажані алелі та генотипи із популяції. При цьому отримані наступні генерації будуть мати виключно задані генотипи за сукупністю таргетних маркерів, що, у випадку відповідного контролю, дає змогу запобігти необхідності поголівного типування особин кожної генерації. Використання подібного підходу сприяє, поряд з усім іншим, істотно знизити матеріальні витрати на проведення досліджень. Найчастіше подібний підхід використовують у селекції рослин [61].

Наступний різновид MAS – створення пірамід генів (**MAR – Marker-Assisted Pyramiding**) [62, 63]. З використання цього методу генотипують

особини за сукупністю маркерів (генів), що пов'язані з проявом схожих господарсько-корисних ознак (показники продуктивності птиці, резистентність до захворювань тощо). Використання сукупності поліморфних локусів є особливо перспективним при аналізі нативних (аборигенних) популяцій тварин. Також важливим є факт різного ступеня «впливу» окремих локусів на фенотип у випадку кількісних ознак (QTL). Використання сукупності різних генів дає змогу охопити більшу кількість потенційно значущих варіантів, що, в свою чергу, посилює загальну ефективність виконуваної селекційної роботи.

Практичну реалізацію вирішення однієї із конкретних задач птахівництва за використання вищезазначених методичних підходів можна проілюструвати на прикладі проблеми рибного запаху харчових яєць.

Наявність рибного запаху (також відомого як крабовий запах) у харчових яйцях та м'ясі бройлерів відноситься до однієї із суттєвих проблем промислового птахівництва. Запах гнилої риби у харчових курячих яйцях викликається накопиченням триметиламіну (ТМА) у жовтку яйця [64, 65]. Триметиламін відноситься до третинних амінів, утворюється внаслідок бактеріальної ферментації холіну в сліпому відділі кишківнику птиці. У свою чергу в печінці міститься фермент флавін-монооксигеназа-3 (flavin-containing monooxygenase 3, FMO3; ТМА оксидаза), який перетворює триметиламін у позбавлений запаху триметиламіноксид [66]. Як джерело для утворення триметиламіну виступають сполуки холіну, синапину, карнітину, лецитину тощо. У птахівництві появі рибного запаху сприяє використання в годівлі птиці рапсового шроту, а також різних вітамінних добавок, що містять холін [67–69]. Використання рапсового шроту в годівлі птиці призводить до збільшення кількості синтезованого кишковою мікрофлорою триметиламіну, який, в умовах зниженої активності FMO3 накопичується у тканинах (м'язова тканина бройлерів) та у жовтку яйця (яєчні кури), що й супроводжується негативними наслідками. Спроби корегувати раціон у цьому контексті не дуже ефективні, внаслідок збільшення трудових та матеріальних витрат на утримання птиці.

Для вирішення цього питання, розпочинаючи з 90-х років минулого століття, було проведено кропітку роботу, як результат якої доведено залежність вмісту триметиламіну в яєчному жовтку від функціональної активності FMO3. В свою чергу, після вивчення біохімічних особливостей роботи FMO3 акцент досліджень був зміщений на генетичну складову.

Так, у роботах різних авторів було встановлено зв'язок різних мутантних форм гену FMO3 (алельних варіантів) з рівнем накопичення ТМА в яєчному жовтку [70-72]. На підставі виявленого поліморфізму в нуклеотидних послідовностях гену FMO3 розроблені методи детекції ключових алелів (PCR-RFLP тощо), що дають змогу проводити досить масові генетико-популяційні дослідження [73, 74]. На цьому етапі дослідження з розподілу алелів FMO3 проводять не тільки серед комерційних ліній курей, але й на локальних (аборигенних) породах.

Розроблені методи детекції дають змогу проводити масове генотипування особин, які складають племінне ядро різних порід яєчних та м'ясних курей, на підставі результатів якого можна повністю елімінувати носіїв небажаних алелів із стада, що сприятиме у подальшому використанню лінії без необхідності корекції раціонів годівлі. Визначення дефектних варіантів гену FMO3 дало змогу фірмі A Hendrix Genetics Company отримати відповідний патент та повністю елімінувати із популяцій курей породи Isa Brown носіїв дефектного алелю, що супроводжувалось практичним позбавленням від цього небажаного феномену (у межах цієї комерційної породи курей).

Вищенаведений приклад чітко ілюструє увесь потенціал маркер-асоційованої селекції, який дає в руки дослідникам важливий інструмент, що дає змогу аналізувати спадковий матеріал безпосередньо на рівні ДНК та позбавлений недоліків класичних методів селекції за фенотипом.

У теперішній час в контексті світової практики маркер-асоційована селекція відноситься до категорії загальноприйнятих інструментів роботи з тваринами в цілому та з птицею, зокрема. В Україні використання сучасних підходів, що базуються на досягненнях молекулярної генетики, розпочинає

активно просуватися в селекційній роботі з різними видами сільськогосподарських тварин, таких як велика рогата худоба, свині, вівці тощо: [75–79]. При цьому проводяться дослідження як поліморфізму локусів кількісних ознак (QTL), так і мікросателітної мінливості [80–84]. Досить широко розгорнута робота й в галузі бджільництва [85, 86]. Поряд із геномною ДНК виконуються дослідження мітохондріальної ДНК для проведення генетичної паспортизації, видової ідентифікації та задач контролю походження тварин [85, 87]. Аналіз сучасного стану селекційної роботи в тваринництві, а також перспективи розвитку галузі саме вказують на необхідність використання сучасних молекулярно-генетичних методів досліджень у загальному контексті роботи [88, 89].

У цілому подібна тенденція розповсюджується на весь пострадянський простір [90–92]. У дослідженнях використовують широкий спектр різноманітних типів молекулярно-генетичних маркерів для вивчення різних видів сільськогосподарських тварин [93–95]. Проводяться роботи з аналізу популяційно-генетичних характеристик низки порід та видів, на підставі яких створюється необхідний фундамент для проведення у подальшому ефективної селекційної роботи [96–100]. Однак, відносно птахівництва, у цьому напрямку кількість досліджень набагато менша, ніж у інших галузях тваринництва. Щодо України, то у цьому випадку кількість робіт з молекулярної генетики птиці зовсім обмежена, що, ймовірно, пояснюється недостатнім фінансуванням вітчизняного птахівництва в цілому, та, з урахуванням зазначеного, призводить до необхідності проведення фундаментальних досліджень у напрямку вивчення сучасних основ генетичної мінливості сільськогосподарської птиці різних ліній та порід саме вітчизняної, української селекції.

1.3 Поліморфізм ДНК як основа генетичної мінливості

Мінливість (спадкова та модифікаційна) є однією із основних характеристик живого [101–103]. Поряд із спадковістю вона відноситься до

чинників, що визначають вихідний матеріал для еволюційних змін. Частина мінливості обумовлена генетичною складовою, інша – факторами довкілля [104, 105]. Трохи спрощуючи, мінливість можна представити на різних рівнях організації живої матерії – фенотипічному та генетичному. Однак слід відмітити, що відмінності у наведених типах мінливості носять дещо умовний характер, оскільки їх неможливо ізолювати один від одного. Фенотипічна мінливість (модифікаційна) виникає внаслідок взаємодії генотипу з чинниками довкілля. Більш того, мінімальний рівень мінливості вкрай необхідний популяції для виживання в умовах змін довкілля, що й визначає ефективність еволюційних процесів. Підтримання достатньо високого рівня біологічного різноманіття також відноситься до необхідних умов проведення селекційної роботи у конкретних напрямках у штучних популяціях [106]. Звуження генетичного різноманіття часто призводить до неможливості подальшої роботи з обраними лініями та перешкоджає передбачуваному розвитку продуктивного потенціалу різних порід у тому чи іншому напрямку [107]. Саме тому збереження біорізноманіття (генофонду) рослин, тварин та птахів відноситься до однієї із найактуальніших задач сучасної науки у багатьох країнах світу [108–112].

Різні варіації в нуклеотидних послідовностях ДНК є основою генетичної мінливості [113]. Мутації в ДНК, в цілому, можна розділити на три великі групи – точкові мутації (**SNP**), інсерції/делеції (**Indel**) та варіації кількості мотивів, що повторюються (**VNTR**). Розглянемо кожен із цих типів варіацій у структурі ДНК більш докладно.

SNP (**S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism, однонуклеотидний поліморфізм) представляє собою точкову мутацію, тобто заміну азотистої основи в ДНК. По суті є транзицією (заміна у межах класу азотистих основ ДНК – пурин на пурин або піримідин на піримідин) або трансверсією (заміна між класами азотистих основ) [114]. Відноситься до одного із найрозповсюдженіших та перспективних для вивчення типів поліморфізму, частота зустрічальності якого становить близько 1 на 1000 нуклеотидів [115].

SNP можна умовно розділити на декілька типів:

1. Анонімний SNP (aSNP) – SNP, який не здійснює відомого ефекту на функціонування гену. Це найбільш розповсюджений тип.

2. Кодуючий SNP (cSNP) – однонуклеотидний поліморфізм у кодуючих ділянках гену. Наявність цього типу SNP може призводити до зміни структури білку, шляхом заміни однієї із амінокислот (місенс мутація).

3. Регуляторний SNP (rSNP) – однонуклеотидний поліморфізм у регуляторних ділянках гену. Наявність цього SNP може призводити до зміни характеру експресії гену та, як наслідок, здійснювати вплив на ступінь прояву ознаки.

4. Синонімічний SNP (sSNP) – відноситься до того ж типу, що й cSNP, однак зміна нуклеотиду в триплеті не призводить до зміни кодуваної амінокислоти внаслідок виродженості генетичного коду.

У випадку, якщо однонуклеотидний поліморфізм може здійснювати передбачуваний функціональний ефект, використовують термін «кандидатний» SNP (за аналогією з генами-кандидатами). Також можлива наявність SNP у 5' та 3' ділянках гену, що не транлюється (5'UTR та 3'UTR).

В генетиці птиці зустрічаються усі вищеперераховані варіанти, кожен із яких може впливати на фенотипічний прояв тієї або іншої ознаки, та, з цієї точки зору, бути використаним у селекційній роботі [116].

Слід відмітити, що характер зустрічальності точкових мутацій у геномі відображає основні закономірності еволюційного процесу, що відбувається. Так, наприклад, однонуклеотидний поліморфізм набагато більше розповсюджений в інтронах, ніж у екзонних частинах генів. Цей факт безпосередньо пов'язаний з тиском відбору. Будь-які зміни у структурі білкової молекули, що кодується певним геном, з високою вірогідністю відображаються на її біологічній активності (ступінь вираженості змін може бути різним залежно від положення зміненої амінокислоти в молекулі білку), що особливо важливо у випадку з молекулами гормонів та ферментів [117, 118]. Зміни активності можуть призводити до відмінностей у функціонуванні різних, пов'язаних з цими білками, фізіологічних процесів, що знаходить своє

відображення в загальній активності (у першу чергу в ефективності адаптаційних процесів). Відповідно, тиск природного добору в цих випадках досить виражений та часто призводить до елімінування мутантних варіантів із популяції. В свою чергу, зміни в структурі інтронів, як правило, не відображаються на структурі кодуваного геном білку (може змінюватися характер експресії, спосіб сплайсингу тощо). Відповідно зміни нуклеотидних послідовностей інтронів залишаються непоміченими для природного добору, що дає змогу цим мутаціям уникнути елімінування та розповсюдитися в популяції (нейтральна еволюція) [119]. Більш того, сукупність різних мутацій в інтронних ділянках генів, може корелювати з варіаціями у вираженості кількісних ознак більшою або меншою мірою, що додатково згладжує ефект від їх прояву (мажорні та мінорні компоненти). Зміни в екзонах або регуляторних фрагментах генів (промоторах, енхансерах тощо) можуть призводити до значного ефекту, однак й у цьому випадку існують свої варіації, що дають змогу точковій мутації уникнути впливу чинників відбору. У цьому випадку мова йде про виродженість генетичного коду. Виродженість генетичного коду полягає в тому, що, як правило, для кодування будь-якої амінокислоти використовується більш ніж одна комбінація нуклеотидних залишків у триплеті (кодоні). Зазвичай варіює третій у триплеті (кодоні) нуклеотид. Тому, як слідує із усього вищенаведеного, варіації, що захоплюють останній у триплеті нуклеотид можуть також уникнути дії добору (та, внаслідок цього, розповсюдитися у популяції).

Крім того, розповсюдженість точкових мутацій (SNP) у геномі визначається, у першу чергу, їх положенням (фрагмент гену, міжгенний простір) та відповідним тиском добору, або фактором дрейфу генів.

Indel (**I**n**s**ertion/**D**eletion) – є вставкою (інсерція) або делецією (втрата, випадіння) декількох нуклеотидних пар у молекулі ДНК [120]. У деяких випадках точкові мутації, що призводять до переміщення рамки зчитування, відносять до інсерцій/делецій, що пов'язано з фактом загальної зміни довжини фрагменту геному (при «класичному» SNP відбувається зміна основи без

варіацій у довжині фрагменту). У зв'язку з тим, що розмір інсерції/делеції варіативний, можна припустити, що ступінь фенотипічної вираженості цього типу мутації може значно перевищувати таку в SNP.

VNTR (**V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats; варіації кількості повторюваних мотивів) – ділянки ДНК, дисперговані по всьому геному, які утримують варіативні за кількістю й складом тандемні повтори (мотиви) [121, 122]. Базуючись на кількості повторів (мотивів) VNTR розподіляють на мінісателіти та мікросателіти [123, 124]. Для мікросателітів розмір повторів становить, як правило, 1–10 п.н., в той час як для мінісателітів – 9–65 п.н. [125, 126]. Для VNTR характерний гіперваріабельний поліморфізм, який полягає в варіюванні кількості елементів у загальній структурі алелів (як для мікросателітів, так і для мінісателітів). Гіперваріабельність цих фрагментів геному дає змогу використовувати цю особливість для проведення маркування особин у контексті вивчення генетико-популяційних параметрів у багатьох галузях науки.

На основі особливостей описаних вище варіацій у структурі ДНК створено різні типи молекулярно-генетичних маркерів, а також методи їх детекції, що широко використовуються для вирішення конкретних задач молекулярної та прикладної генетики. Розпочинаючи з середини 80-х років ХХ сторіччя, після того, як Кері Мюліс винайшов метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), розпочалося широкомасштабне застосування в найрізноманітніших галузях людської діяльності технології молекулярних маркерів, що дають змогу вивчати феномен генетичної мінливості на принципово новому рівні – за допомогою безпосереднього аналізу структури ДНК, як носія спадкової інформації.

Отже, саме дослідження особливостей організації спадкового матеріалу дослідних об'єктів (тварини, рослини, мікроорганізми та інше) на рівні ДНК, є одним з сучасних та актуальних завдань світової науки в цілому, та також української наукової спільноти зокрема, що безпосередньо відноситься й до галузі вітчизняного птахівництва.

1.4 Молекулярно-генетичні маркери – інструмент дослідження генетичної мінливості популяцій

На сучасному етапі розвитку науки молекулярно-генетичні методи досліджень займають провідне місце у загальному арсеналі генетики тварин. Можливість аналізувати спадковий матеріал безпосередньо на рівні ДНК призвела до розширення різних методичних підходів, так або інакше пов'язаних з аналізом нуклеотидних послідовностей геному [127]. До недавнього часу, будучи своєрідною екзотикою, молекулярно-генетичні методи досліджень, що основані на полімеразній ланцюговій реакції, стали вже рутинним інструментом для вирішення значної кількості різних проблем селекції [128, 129]. Використання різних молекулярно-генетичних маркерів як мультилокусних (що мають множинну локалізацію у геномі, таких як RAPD, ISSR), так і монолокусних (що характеризують одну конкретну ділянку геному, таких як SSR, SNP, PCR-RFLP) дає змогу оцінювати генетичну мінливість не за фенотипом, а безпосередньо на рівні спадкового матеріалу (ДНК). Детальний аналіз дослідних популяцій на рівні ДНК сприяє високому ступеню точності, порівняно з іншими методами, визначати зміни рівня інбридингу в поколіннях, простежувати динаміку основних генетичних параметрів у розрізі поколінь, оцінювати «чистоту» лінії тощо [130, 131]. Проведення досліджень генетичної структури з використанням ДНК-маркерів зумовлює більш вірогідну ідентифікацію породної належності тварин порівняно з методами, що ґрунтуються на оцінці за фенотипом. Використання монолокусних та мультилокусних молекулярно-генетичних маркерів у генетико-популяційних дослідженнях дає змогу визначити «спектр» унікальних алелів (фрагментів), властивих тільки конкретній породі, що, у свою чергу, сприяє їх безпосередньої ідентифікації [132–135]. Зрештою, вивчення генетико-популяційних параметрів різних порід тварин та птиці з використанням низки ДНК-маркерів зумовлює проведення генетичної паспортизації порід, яка є необхідним елементом контролю проведення селекційної роботи [3, 136–139].

Існує досить багато різних класифікацій молекулярно-генетичних маркерів [127, 140, 141]. При цьому як клас розглядаються ДНК-маркери, що засновані на методі полімеразної ланцюгової реакції [3]. У контексті дисертаційної роботи при обговоренні питання щодо класифікації ДНК-маркерів розглядаються тільки ті, що базуються на використанні ПЛР, як найбільш розповсюджені в області практичної генетики птиці. До таких маркерів відносяться RAPD, SCAR, ISSR, SSR, SNP, PCR-RFLP, Indel. Розглянемо кожний із них детальніше.

RAPD. Поряд з вивченням поліморфізму цільових генів, значну цікавість для птахівництва представляє аналіз генетичної мінливості популяцій за використання маркерів, що дають змогу «оцінити» геном в цілому. Для цього є необхідним інструмент, використання якого дозволяло б охопити досить значну кількість різних фрагментів геному одночасно (полілокусний або мультилокусний маркер). Таку можливість надає RAPD-аналіз. Метод RAPD (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) – довільно ампліфікована поліморфна ДНК (метод випадкової ампліфікації поліморфної ДНК) – ґрунтується на використанні олігонуклеотидів (праймерів) невеликого розміру (як правило, у межах 10 п.н.), довільної структури [142]. Ампліфіковані фрагменти є ділянками геномної ДНК, обмежені RAPD-праймерами. Кількість ампліфікованих фрагментів широко варіює залежно від виду, породи, лінії, популяції тощо, що робить цей тип маркерів досить ефективним інструментом вивчення генетичного різноманіття дослідних об'єктів. Поліморфізм RAPD-маркерів визначається різною довжиною фрагментів, що фланкуються відповідним олігонуклеотидом, а також мутаціями (замінами азотистих основ) у ділянках гібридизації праймерів, що може призводити до неможливості успішної «посадки» праймера на ДНК-мішень (та, відповідно, до відсутності ампліфікованого фрагменту на електрофореграмі). В цілому, використання різних RAPD-маркерів дає змогу отримати загальний «штрих-код» геному дослідного організму, тобто характерний тільки для особини/лінії/породи набір фрагментів. Як результат використання декількох RAPD-маркерів можна

отримати профіль ампліфікованих фрагментів, характерний для кожної окремої лінії/породи, та, що досить важливо, оцінити рівень внутрішньопопуляційного поліморфізму [143–148]. RAPD-маркери були одними із перших молекулярних маркерів, заснованих на ПЛР, які дали змогу при відсутності даних про нуклеотидну структуру геному дослідних видів вивчити генетичну мінливість, а також вирішити ряд окремих питань, таких як визначення статі страусів тощо. Метод ефективно використовується для диференціювання ліній різних порід сільськогосподарської птиці: проаналізовано різноманітні породи курей різних напрямів продуктивності, в тому числі й аборигені популяції [149–151].

З початку 90-х років XX століття метод RAPD активно застосовувався в генетиці рослин та тварин, зокрема птиці. Не дивлячись на те, що RAPD відноситься до одного із самих перших типів ДНК-маркерів, він ефективно використовується для вирішення питань практичної генетики птиці й досі [149, 152, 153]. Важливий аспект використання RAPD-маркерів, який дещо відхиляється від широко розповсюджених галузей застосування – проведення RAPD-аналізу разом з дослідженням генів мітохондріальної ДНК [154]. Також RAPD-аналіз досить широко застосовується як інструмент для проведення диференціювання штамів бактерій [155, 156]. В останні роки з'явилися роботи, присвячені вивченню генетико-популяційних характеристик популяцій сільськогосподарської птиці вітчизняної (української) селекції [157, 158].

Порівняно з іншими класами молекулярно-генетичних маркерів RAPD-аналіз має свої характерні переваги, яким властиви відносно низька собівартість аналізу, відсутність необхідності у наявності інформації про нуклеотидну послідовність геному, можливість оцінки сукупності геномної ДНК в цілому. В першу чергу основна перевага полягає у відсутності необхідності попереднього отримання даних про структуру геному досліджуваних об'єктів, а також загальна універсальність методу (одні й ті ж RAPD-маркери (праймери) підходять для аналізу найрізноманітніших видів тварин та рослин). Все це робить RAPD-аналіз незамінним інструментом для первинного визначення генетичного різноманіття дослідних об'єктів. Однак, не дивлячись на усі

переваги, RAPD-маркери мають і цілий ряд недоліків – підвищена чутливість до умов реакції (особливо до якості виділення ДНК); домінантний тип успадкування, що в свою чергу визначає неможливість визначення гомозигот/гетерозигот; анонімність маркеру; низька відтворюваність (у вигляді підвищеної вибагливості до умов проведення реакції); наявність досить значної кількості мінорних фрагментів на електрофореграмах, які істотним чином ускладнюють інтерпретацію результатів досліджень.

SCAR. Своєрідним «похідним» від RAPD-маркерів слугує наступний клас молекулярно-генетичних маркерів – SCAR [159]. SCAR (Sequence Characterised Amplified Region; секвенований ампліфікований фрагмент; ампліфікаційна область, охарактеризована нуклеотидною послідовністю) представляє собою вирізаний із гелю й згодом секвенований фрагмент (бенд, смужка) RAPD-профілю, до якого із застосуванням відповідного програмного забезпечення підбирають праймери (що фланкують цю ділянку). У подальшому, використання розроблених олігонуклеотидів дає змогу ампліфікувати суворо конкретну область ДНК-мішені [160]. Більш того, секвенування вирізаного з гелю фрагменту ДНК сприяє ідентифікації (за допомогою інструментарію BLAST) його положення в геномі у тому випадку, якщо загальна структура геному виду дослідної особини відома. Взагалі SCAR-маркери можна отримати на основі вищеприписаної схеми не тільки за використання RAPD, але й AFLP або ISSR [161]. У будь-якому разі цей підхід дає змогу охарактеризувати початково анонімну ділянку ДНК, з можливістю її специфічної ампліфікації у наступних дослідженнях. Таким чином, основна відмінність SCAR-маркерів від RAPD – точна локалізація у геномі (монолокусний маркер). Однак це реалізується тільки за умови наявності даних про нуклеотидну структуру загального геному. У випадку відсутності таких даних використання SCAR-маркерів дає змогу лише ампліфікувати конкретний фрагмент ДНК. У практичній генетиці птиці SCAR-маркери успішно були застосовані для вирішення задачі визначення статі видів птиці з невираженим статевим диморфізмом (страусів).

Основна складність сексування страусів за використання полімеразної ланцюгової реакції полягає у відсутності даних про послідовності ДНК, специфічних тільки для чітко визначеної статі [162]. Тому спочатку пошук подібних послідовностей здійснювався за допомогою RAPD-аналізу [163]. Застосування широкого спектру різних RAPD-праймерів забезпечило, врешті решт, отримання фрагменту ДНК, сурово специфічного для самиць. Фрагмент було секвеновано, після чого на підставі відомої нуклеотидної послідовності підібрано відповідні олігонуклеотиди (праймери P1/P2), які у подальшому були покладені в основу створення методу визначення статі. Цей приклад ілюструє своєрідне перетворення різних типів молекулярно-генетичних маркерів один в одного. Так, первинним маркером є RAPD, потім, після секвенування фрагменту, він перетворюється в SCAR, який є вже безпосередньо локус-специфічним маркером [163]. Увесь подальший розвиток методів визначення статі страусів за використання локус-специфічних праймерів базується саме на цьому «маркерному перетворенні». Так, за використання цього підходу в роботі бразильських вчених було запропоновано метод визначення статі страусів на основі мультиплексної ПЛР [164]. Було підібрано декілька пар олігонуклеотидів, певні комбінації яких давали змогу ефективно сексувати птицю. Також в іншій роботі автори пропонують систему праймерів OstSexOPAJ13, що фланкують специфічний тільки для самиць фрагмент ДНК (амплікон розміром 760 п.н.) [165]. У всіх описаних випадках спочатку анонімний фрагмент було ідентифіковано як специфічну для самиць ділянку ДНК, що й дало змогу успішно застосувати отримані результати на практиці.

ISSR. Недоліки RAPD-маркерів призвели до необхідності розробки маркерної системи іншого типу, яка сприяла б ефективній характеристиці геному в цілому (мультилокусний маркер), однак, при цьому, була позбавлена вищеперерахованих недоліків. Цій умові відповідають ISSR-маркери. ISSR-маркери (**I**nter-**S**imple **S**equence **R**epeat) представляють собою послідовності геномної ДНК, фланковані інвертованими мікросателітними повторами [166, 167]. Тобто це, свого роду, міжмікросателітні послідовності. Завдяки широкій

розповсюдженості мікросателітних мотивів у геномі, вони відносяться до мультилокусних маркерів. На відміну від RAPD для проведення досліджень використовують олігонуклеотиди стандартного розміру (15–25 п.н.), що й визначає більшу відтворюваність результатів. За результатами ампліфікації дають картину у вигляді сукупності фрагментів на електрофореграмі для одиначної особини. Відносяться до маркерів доміантного типу, що робить неможливим визначення рівня гетерозиготності та, відповідно, дещо обмежує область застосування. Як і у випадку з RAPD, для проведення ампліфікації немає необхідності в інформації про нуклеотидну структуру. Ампліфікований фрагмент у цілому анонімний, хоча й утримує інвертовані мікросателітні повтори (комплементарні праймерам). Однак, на відміну від RAPD, ISSR-маркери більш зручний інструмент досліджень. Результати аналізу набагато більш відтворювані, ефективність генотипування вище такої у RAPD.

Завдяки достатньо простим умовам проведення досліджень, ISSR-маркери досить широко використовуються для вивчення генетичної структури популяцій значної кількості видів рослин та тварин [167–169]. Однак, не дивлячись на це, у генетиці птиці дослідження на основі даного класу молекулярно-генетичних маркерів досить мало розповсюджені у порівнянні з іншими типами маркерних систем (RAPD, SNP тощо) та представлені практично одиначними роботами [170, 171].

SSR. До одного із самих розповсюджених монолокусних маркерів відносяться мікросателіти (SSR, **S**imple **S**equence **R**epeats; також відомі як STR, **S**hort **T**andem **R**epeats) [172, 173]. Мікросателіти – короткі тандемні повтори, що складаються із декількох (як правило, від 2 до 6) нуклеотидів у певній послідовності, широко розповсюджені по всьому геному різних видів рослин та тварин [174–176]. Можуть міститися як у межах самих генів (інтрони, екзони тощо), так і в некодуючих ділянках геному [177, 178]. Мікросателіти різняться як структурою повторів, так і їх кількістю [179]. Алелі мікросателітного локусу різняться за кількістю елементів повтору, структура якого, у випадку одного локусу, однакова для усіх алелів. Мікросателіти можуть бути динуклеотидними

– складаються із двох нуклеотидів; тринуклеотидними – із трьох і т.д. Один із найбільш розповсюджених типів мікросателітів – динуклеотидний повтор CG. Кількість алелів у цьому мікросателітному локусі досить широко варіює та може досягати декількох десятків [180]. Алелі різняться між собою, як правило, на одиницю мотиву, тобто у тому випадку, якщо мікросателіт утримує динуклеотидний повтор, то алелі різняться на 2 нуклеотиди; якщо тринуклеотидний – то на 3. Унікальність мікросателітних локусів забезпечується специфічними послідовностями ДНК, що фланкують безпосередньо сам мотив. Праймери строго систематизовані та відповідають певним ділянкам геному [181, 182].

Основна перевага мікросателітів як інструментів дослідження полягає, окрім факту їх точної локалізації, в їх найвищому рівні поліморфності, що дає змогу з високою часткою вірогідності типувати як різні лінії, так й окремих особин. Аналіз за мікросателітами – це, по суті, специфічні «відбитки пальців», що ідентифікують їх власника та сприяють успішному визначенню його походження. Для проведення мікросателітного аналізу, як правило, використовують електрофорез у поліакриламідному гелі, найчастіше у денатуруючих умовах. Це пов'язано з необхідністю визначати відмінності буквально в два нуклеотиди між різними алелями, для чого й застосовуються системи з високою роздільною здатністю. Однак в окремих випадках використовують й електрофорез у агарозному гелі, що, з нашої точки зору, цілком неприпустимо, оскільки призводить до невірної інтерпретації результатів досліджень, внаслідок неможливості розрізнення алелів.

Сфера застосування мікросателітних маркерів досить широка – проводяться дослідження значної кількості видів рослин та тварин [183–186]. Слід відзначити й роботи вітчизняних вчених у галузі вивчення мікросателітної мінливості в популяціях різних видів сільськогосподарських тварин [187–190]. При цьому, на відміну від ISSR, мікросателітні маркери активно використовують і для вирішення широкого кола завдань у птахівництві [191–194]. Окрім, власне, генетико-популяційних досліджень, проводять пошук

різних алелів мікросателітних локусів, пов'язаних із проявом кількісних ознак [195, 196]. Особливу увагу в цьому контексті заслуговують роботи, спрямовані на пошук асоціативного зв'язку різних алелів мікросателітних локусів з резистентністю птиці до вірусних захворювань, зокрема до хвороби Марека [197, 198]. У випадку з локусами кількісних ознак та резистентністю до захворювань мікросателіти можуть бути задіяні опосередковано, за допомогою групи зчеплення. Однак вищенаведені дослідження відносяться скоріше до винятків із правил, основний наголос при використанні мікросателітів – генетико-популяційна характеристика дослідних груп, філогенетичний аналіз, генетична диференціація популяцій, контроль за проведенням селекційної роботи, ідентифікація та паспортизація різних порід та ліній [194].

SNP. Для визначення SNP використовують цілий ряд різних методів. До найбільш розповсюджених відноситься ПЛР з наступним рестрикційним аналізом (PCR-RFLP) та одноланцюговий конформаційний поліморфізм (SSCP).

PCR-RFLP. Сутність методу PCR-RFLP (**P**olymerase **C**hain **R**eaction – **R**estriction **F**ragments **L**ength **P**olymorphism, полімеразна ланцюгова реакція – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів) полягає у використанні специфічного ферменту, ендонуклеази рестрикції, після проведення ПЛР. Ендонуклеази рестрикції – особливий клас ензимів, що розщеплюють ДНК у конкретних ділянках [199]. У загальних рисах метод складається із трьох етапів. На першому етапі ампліфікують обрану ділянку ДНК. На другому – проводять безпосередньо рестрикційний аналіз, тобто обробку ампліфікованих фрагментів обраною ендонуклеазою рестрикції згідно протоколу виробника реагентів. На третьому етапі виконують електрофоретичний розділ продуктів рестрикції [200]. Метод дає змогу ідентифікувати алелі різних локусів, що різняться за однією точковою заміною азотистої основи (SNP) за умови, що мутація знаходиться у сайті рестрикції.

До основних переваг методу належать: відносна простота проведення аналізу; висока відтворюваність результатів; доволі низька вартість витратних матеріалів (залежить, у першу чергу, від використаної ендонуклеази

рестрикції). За допомогою PCR-RFLP можна проводити пошук різних алельних варіантів функціональних генів, що пов'язані з господарсько-корисними ознаками. Саме простота та зручність методу слугували чинником його широкого розповсюдження – від генетики людини до рішення практичних аспектів мікробіології (типування мікроорганізмів тощо) [201, 202].

Однак, не дивлячись на усі переваги, рестрикційний аналіз має ряд недоліків, що дещо обмежує сферу його застосування. Основний недолік – неможливість розрізнити тип SNP у межах поліморфного сайту рестрикції. Сайт рестрикції складається із 4–6 п.н. [203, 204]. Мутація у будь-якому положенні у межах сайту призведе до «втрати» сайту, тобто до неможливості розрізання ДНК у цій ділянці. Тому при використанні методу PCR-RFLP коректно говорити не про одонуклеотидний поліморфізм (SNP), а про поліморфізм за використаною рестриктазою у цільовому фрагменті – MspI- та HindIII-поліморфізм тощо. У більшості випадків ці тонкощі можна проігнорувати, однак при аналізі поліморфізму в екзонах це питання необхідно враховувати. Наявність мутацій у різних положеннях сайту розпізнавання для будь-якої рестриктази в екзоні може спричинити заміну амінокислотних залишків у кодованому білку, що, в свою чергу, призведе до відмінностей у первинній структурі поліпептиду. Тому однакові алелі, виявлені за використання PCR-RFLP, будуть при цьому характеризувати фактично різні алельні варіанти. Однак, не дивлячись на це обмеження, метод PCR-RFLP успішно застосовується для вирішення найрізноманітніших завдань сучасної генетики.

SSCP. Рестрикційний аналіз дає змогу визначити певну кількість мутацій (у сайтах рестрикції) будь-якого таргетного фрагменту ДНК. Однак в окремих випадках, особливо для визначення нових мутацій у різних генах (таргетних фрагментах геному), доцільно розрізняти алелі, варіації нуклеотидного складу яких не займають області сайтів рестрикції. У такому випадку використовують метод SSCP (**S**ingle-**S**trand **C**onformation **P**olymorphism; одноланцюговий конформаційний поліморфізм) [205]. Цей підхід використовують при аналізі

різних генів у самих різних видів тварин [206–208]. Виявлені поліморфні варіанти потім секвенують, що вже безпосередньо дає інформацію про нуклеотидні заміни в обраній ділянці геному [209].

Сутність методу полягає у визначенні відмінностей конформаційної структури одноланцюгових фрагментів ампліфікованої ДНК при використанні нативних поліакриламідних гелів (при цьому обов'язково проводять денатурацію дослідних проб). Відмінностей навіть у декілька нуклеотидів вже достатньо для ефективного розрізнення SSCP-алелів у різних особин на електрофореграмах [210–212]. Як правило, використовують фарбування нітратом срібла, оскільки інтеркалюючі барвники (етидіум бромід) мають низьку спорідненість до одноланцюгових фрагментів.

У найбільш поширеному варіанті метод SSCP використовують наступним чином. На першому етапі ампліфікують цільовий фрагмент геному (гену) від декількох особин. Далі проводять аналіз одноланцюгового конформаційного поліморфізму (SSCP) ампліфікованих фрагментів. У випадку виявлення поліморфних варіантів виконують секвенування дослідних зразків (різних SSCP-алелів), для визначення конкретних мутацій (SNP). Після цього за використання відповідного програмного забезпечення будують рестрикційні карти. Якщо SNP розташований у сайті рестрикції для будь-якого ферменту (ендонуклеази рестрикції), обирають рестриктазу, а також умови проведення ампліфікації (підбирають розмір потенційних рестрикційних фрагментів таким чином, щоб, за можливості, можна було використати агарозний гель). Врешті решт отримують PCR-RFLP-маркер, за допомогою якого й проводять подальше вивчення генетичної структури популяції за цим поліморфізмом. Таким чином, як слідує із усього вищевикладеного, SSCP-маркери займають свого роду ключове положення в контексті пошуку мутацій (алелів) та представляють собою незамінний інструмент для визначення нових поліморфних варіантів різних генів (цільових фрагментів геному).

INDEL. Як вже було відмічено, інсерції/делеції (Indel) досить широко розповсюджені по всьому геному різноманітних видів тварин та рослин, що дає

зможу використовувати цей тип поліморфізму як молекулярно-генетичний маркер для вирішення різних питань сучасної генетики [213–215]. Порівняно з PCR-RFLP застосування Indel-маркерів обмежується проведенням ампліфікації цільових фрагментів з наступним електрофоретичним розподілом ампліконів, що робить цей тип маркерів більш простим у технічному виконанні. Для інсерцій/делецій розміром від 8-10 п.н. можливо використання агарозного гелю, що багато в чому спрощує проведення досліджень. Для інсерцій/делецій меншого розміру необхідно використовувати електрофорез у поліакриламідному гелі, що має більшу роздільну здатність. Indel-маркери можуть міститися у найрізноманітніших частинах геному або генів (екзони, інтрони тощо) та здійснювати виражений вплив на прояв будь-якої ознаки [216–219].

Поряд із традиційними завданнями, що пов'язані в першу чергу з питаннями селекційної роботи, у сучасному птахівництві Indel-маркери використовуються й для вирішення приватних (специфічних) проблем. Один із найбільш показових прикладів у цьому контексті – визначення статі птиці з невираженим статевим диморфізмом.

Ефективний метод визначення статі птиці з невираженим статевим диморфізмом за допомогою методів сучасної молекулярної генетики був запропонований у середині 90-х років Griffiths R. зі співавторами [220]. Метод ґрунтується на поліморфізмі гену CHD (Chromo-Helicase DNA), варіанти якого відрізняються в Z- та W-хромосомах. Відмінності у довжинах ампліфікованих фрагментів CHD-Z та CHD-W варіюють у межах різних видів птиці та визначаються з використанням агарозних або поліакриламідних гелів різних концентрацій [221, 222]. Поряд з Griffiths R. зі співавторами іншими дослідниками також були запропоновані різні праймерні системи, які, так чи інакше, ґрунтуються на відмінностях у розмірах ампліфікованих фрагментів зі статевих хромосом птиці [223–225]. Вищеописана методика є прекрасним прикладом ефективного використання сучасних ДНК-технологій (зокрема Indel-маркерів) для вирішення актуальних задач птахівництва.

Отже, приймаючи до уваги той факт, що використання цілої низки різних класів молекулярно-генетичних маркерів призвело до суттєвого прогресу у вирішенні різноманітних проблем світового птахівництва, вибір напряму досліджень, що пов'язаний з використанням сучасних ДНК-технологій в умовах науково-дослідних установ України з питань генетики та селекції тварин є цілком обґрунтованим.

1.5 Функціональний поліморфізм генів, що пов'язані з проявом господарсько-корисних ознак курей

Одна із основних задач маркер-асоційованої селекції, від успішного виконання якої залежить ефективність роботи в цілому, – визначення відповідних генів-кандидатів для вивчення їх поліморфних варіацій у дослідних популяціях (лініях, породах), з наступним аналізом зв'язку алельних варіантів з продуктивними ознаками. В зв'язку з цим до найбільш перспективних мішеней відносяться гени, продукти яких беруть участь у регуляції різних функцій, перш за все, пов'язаних із забезпеченням процесів росту та диференціації. До таких об'єктів відносяться гени, що кодують регуляторні білки, зокрема гормони. В свою чергу, фізіологічний ефект будь-якого гормону безпосередньо залежить від його рецептору, що визначає також доцільність вивчення поліморфізму генів, що кодують як самі гормони, так й їх рецептори. Розглянемо більш детально одні із найбільш перспективних об'єктів досліджень у практичній генетиці птиці.

Ген гормону росту. Ген гормону росту (*GH*) – є одним із найперспективніших генів, алельні варіанти яких пов'язані з продуктивними ознаками курей різних порід та напрямів продуктивності [226–228]. Гормон росту (соматотропін, соматотропний гормон) належить до класу пептидних гормонів, синтезується аденогіпофізом [229]. Характеризується широким спектром фізіологічних функцій, таких як ріст та диференціювання різних тканин та органів організму, зокрема впливає на синтез білку, метаболізм

вуглеводів, ліпідів тощо [230]. Гормон росту тісно пов'язаний із регуляцією активності інших гормонів, так, наприклад, він стимулює синтез та секрецію інсуліноподібного фактору росту I (*IGF-I*) клітинами печінки, що, в свою чергу, визначає ростові функції соматотропіну [231, 232].

Ген гормону росту містить у своєму складі 5 екзонів, 4 інтрони; загальна довжина ~ 3,5 т.п.н. Знаходиться у 27 хромосомі. Характеризується високим рівнем поліморфності [229]. Виявлено різноманітні мутації у різних ділянках гену.

Вивчення зв'язку алельних варіантів гену гормону росту з показниками продуктивності дало змогу не тільки встановити продуктивні та контрпродуктивні алелі в різних лініях курей, але й зв'язок з резистентністю до низки захворювань. Так, у роботах Kuhnlein U. зі співавторами показано *MspI*-та *SacI*-поліморфізми в інтронах гену гормону росту в лініях курей породи білий леггорн [233]. У роботах різних авторів виявлений зв'язок деяких алельних варіантів *GH* з показниками продуктивності, а також зі стійкістю до хвороби Марека та лейкозу [234–236]. Виявлено поліморфні варіанти *GH*, що пов'язані з варіативністю різних фрагментів гену. Так, наприклад, показано наявність декількох алелів за *MspI*-поліморфізмом у першому інтроні гену [237, 238]. В свою чергу в роботі Feng X.P. зі співавторами виявлено той же поліморфізм у гені гормону росту, також у лініях білого леггорну [234]. Встановлено зв'язок з показниками продуктивності курей (вік знесення першого яйця та загальна яєчна продуктивність).

Поряд з комерційними лініями курей вивчали також й нативні (аборигенні) популяції. Так, Ip S.C.Y. зі співавторами дослідили *MspI*-поліморфізм у першому інтроні *GH* у 28 популяціях курей аборигенних порід Китаю [237]. У цій роботі було вперше описано новий *MspI*-поліморфізм у першому інтроні гену. Виявлено три алелі за цим поліморфізмом у популяціях курей нативних порід. В той же час у комерційних лініях курей виявлено тільки два алеля. В свою чергу, роботи Nie Q. зі співавторами, були спрямовані на вивчення *MspI*-поліморфізму в четвертому інтроні [239]. Ці автори

проаналізували 20 популяцій різних порід курей (вивчали китайські нативні популяції, бройлерів та яєчні лінії курей). В цій роботі виявлено нові алельні варіанти, в цілому 5 алелів у четвертому інтроні *GH*, при цьому з'ясовано, що дві нові мутації характерні тільки для нативних популяцій Китаю.

В іншій роботі, Yan B. зі співавторами, також проілюстровано *MspI*-поліморфізм у четвертому інтроні *GH* у бройлерів, однак виявлено тільки два алеля [240]. Додатково проаналізовано *EcoRV*-поліморфізм у третьому інтроні гену. Встановлено зв'язок різних алельних варіантів з показниками м'ясної продуктивності птиці, в першу чергу, з показниками живої маси, маси грудних м'язів та стегна, кількістю абдомінального жиру тощо.

У 2005 році Nie Q. зі співавторами вивчили поліморфізм 12 генів-кандидатів у декількох дослідних популяціях курей методом денатуруючої вискоєфективної рідкої хроматографії (DHPLC) [241]. За використання цього методу в локусі гормону росту виявлено наявність 46 SNP, при цьому 4 з них у 5'UTR, 5 – в екзонах, 36 – в інтронах та 1 – у 3'UTR. У цій роботі була продемонстрована дуже широка варіабельність гену гормону росту, що дало змогу в подальшому, підбирати нові поліморфні маркери для рішення різних задач.

Так, на основі вищеприписаної роботи, Nie Q. зі співавторами, підібрали маркери PCR-RFLP для різних фрагментів *GH* (*PagI*-поліморфізм у 5'UTR, *MspI* – у першому, *AvaIII* – у другому, *EcoRV* – у третьому, *Bsh1236I* – у четвертому інтронах, відповідно) [238]. Як результат досліджень було доведено асоціативний зв'язок різних алелів за кожним із вищеперерахованих маркерів з показниками м'ясної продуктивності птиці.

У подальшому, окрім локальних популяцій курей Китаю вивчати генетичну структуру різних генофондних порід почали й у інших країнах. У 2006 році Thakur M.S. зі співавторами дослідили *MspI*-поліморфізм у першому інтроні *GH* у популяціях індійських курей (*Kadaknath chicken*) [242]. При цьому в дослідних популяціях авторами знайдено два алеля за цим поліморфізмом. В свою чергу Zhang X.L. зі співавторами у 2007 році встановили два нових *AvaI*-

поліморфізми у третьому інтроні гену гормону росту курей [243]. За результатами проведених досліджень ними з'ясовано зв'язок різних алелів з показниками живої маси, маси грудних м'язів та кількістю абдомінального жиру у курей локальних популяцій Китаю. Автори пропонують використовувати *GH* як маркер кількості абдомінального жиру. Результати цих досліджень також підтверджуються у роботі Lei M. зі співавторами [244].

У роботі Epaуatі В. зі співавторами вивчено *SacI*-поліморфізм у четвертому інтроні *GH* у нативних популяціях курей Ірану [245]. Виявлено наявність двох алелів за даним поліморфізмом. Також вивчено *MspI*-поліморфізм у першому інтроні гену гормону росту в популяції іранських курей [246]. За цим поліморфізмом також визначено наявність двох алелів.

Однак у роботі Jafari A. зі співавторами доведено наявність трьох алелів також у нативних іранських популяціях, але інших провінцій, що може свідчить про різне походження кожної із порід або на результат селекційної роботи, що проводиться [247]. Зокрема, у високопродуктивних синтетичних лініях яєчних курей повністю відсутній алель С за *MspI*-поліморфізмом у першому інтроні, який присутній лише у нативних (аборигенних) порід та, імовірно, корелює з низькими значеннями яєчної продуктивності птиці. Цей факт свідчить на користь наявності вираженого селективного тиску проти цього алелю в комерційних лініях яєчних курей (що також пояснює його наявність у нативних популяціях).

У роботі Ghormade V. зі співавторами виявлений зв'язок алелів *GH* за даним поліморфізмом з показниками живої маси курей [248]. В свою чергу в роботі Makhsous S.G. вивчено *MspI*- та *SacI*-поліморфізм у четвертому інтроні *GH*, встановлено зв'язок алелів за *SacI*-поліморфізмом з показниками яєчної продуктивності птиці [249]. За *MspI*-поліморфізмом асоціативного зв'язку не виявлено.

Дослідження з вивчення поліморфізму гену гормону росту в популяціях курей азіатського регіону продовжуються й у теперішній час. Так, у роботі Su Y.J. виявлено зв'язок поліморфізму в різних інтронах гену гормону росту з

показниками продуктивності (жива маса, маса яйця, яєчна продуктивність) у нативних порід курей Китаю [250]. Встановлено зв'язок EcoRV-поліморфізму в третьому інтроні з показниками м'ясної продуктивності (жива маса, швидкість приросту) в лініях бройлерів Таїланду [251]. Досліджено SacI-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту в локальних популяціях курей В'єтнаму [252]. Проводяться дослідження з вивчення зв'язку MspI-поліморфізму в першому інтроні *GH* з показниками м'ясної продуктивності бройлерів у Ірані [253]. Також проводять дослідження одонуклеотидного поліморфізму в сайтах для MspI у четвертому інтроні *GH* у локальних популяціях курей Єгипту [254].

Окрім використання маркерів PCR-RFLP для вивчення поліморфізму *GH* також застосовують і метод SSCP, однак це вже скоріше виняток, ніж правило, внаслідок виражених недоліків цього типу маркерів для проведення масових генетико-популяційних досліджень [255].

Ген рецептору гормону росту. Рецептор гормону росту – це поліпептидний ланцюг, що складається із 608 амінокислотних залишків [256]. Поряд із гормоном росту рецептор гормону росту (GHR) відіграє найважливішу роль у регуляції проліферації та диференціювання різних типів клітин та тканин організму [257]. Більш того, на фізіологічному рівні функціонування гормону росту невід'ємно пов'язано з GHR, оскільки функціональна активність будь-якого гормону безпосередньо залежить від його рецептору. Зміни структури та характеру експресії GHR тісно пов'язані з цілим рядом продуктивних ознак птиці – живою масою, несучістю (в цілому, можна сказати, з усім спектром опосередкованих гормоном росту ознак) [258]. Також можна стверджувати, що функціонування рецептору гормону росту опосередковано пов'язано й з функціями системи інсуліноподібних факторів росту [259, 260]. Взаємодія гормону росту з GHR призводить до активації синтезу та секреції інсуліноподібних факторів росту, які безпосередньо беруть участь у ініціації проліферації та диференціювання м'язових клітин.

Рецептор гормону росту належить до складних трансмембранних білків, основна функція яких – «перенесення інформації» крізь плазматичну мембрану

клітини. Молекула гормону росту пов'язує дві молекули GHR, що призводить до активації тирозинкінази (внутрішньоклітинної) з наступним фосфорилуванням GHR, що, в свою чергу, через ряд проміжних стадій, активує різні вторинні посередники (STAT, IRSs, ATF-2 etc.), які викликають фізіологічну відповідь клітини-мішені [261, 262]. Активація цього механізму супроводжується у таргетних клітинах ініціюванням транскрипції різних генів, або моделюванням метаболічних процесів.

Ген рецептору гормону росту (*GHR*) містить у своєму складі 9 екзонів та 8 інтронів; загальна довжина $\sim 80,12$ т.п.н.; розміщується у Z хромосомі, що визначає гемізиготний стан цього гену у самиць птиці.

В локусі *GHR* виявлено декілька різних типів SNP (однонуклеотидний поліморфізм), що займають частини інтронів та екзонів, а також 5'UTR- і 3'UTR-ділянки [256, 263, 264].

Участь *GHR* у забезпеченні множинності різних фізіологічних функцій організму робить його оптимальним кандидатом для вивчення зв'язку різних алельних варіантів з продуктивними ознаками птиці [265]. Зокрема, у роботі Li Н. зі співавторами встановлено, що підвищена частота алеля В за NspI-поліморфізмом у п'ятому інтроні гену в популяції аборигенних курей Китаю позитивно корелює з товщиною шкаралупи [266]. В той же час є дані про зв'язок поліморфізму *GHR* з феноменом «карликовості» у курей [267, 268]. Також виявлено зв'язок алелів за HindIII-поліморфізмом у другому інтроні гену *GHR* з продуктивними ознаками курей породи білий леггорн [269]. Беручи до уваги важливу роль, яку відіграє рецептор гормону росту у забезпеченні функціонування ланцюгу GH-IGF-I, досить очевидно, що у першу чергу, дослідження поліморфізму будуть спрямовані на виявлення різних алельних варіантів, що пов'язані, так чи інакше, з показниками м'ясної продуктивності птиці [270].

В цілому за останні 10–15 років у зарубіжних країнах проводились досить масштабні дослідження генетичної структури популяцій за локусом гену

рецептору гормону росту не тільки комерційних ліній, але й локальних (аборигенних) порід [245, 263, 271].

Ген інсуліноподібного ростового фактору I. Інсуліноподібний ростовий фактор I (IGF-I) виконує цілу низку фізіологічних функцій, які пов'язані з ростом та диференціюванням різних типів тканин, що робить його цікавою мішенню для потреб практичної генетики [272]. Він входить до складу родини інсуліноподібних ростових факторів [273].

Функціонування IGF тісно пов'язано з гормоном росту. Мітогенний ефект IGF опосередкований його зв'язуванням зі спеціальним рецептором клітинної поверхні (рецептор для IGF класу I), що має тирозинкіназну активність, функціонально схожу з рецептором для інсуліну. В біологічних рідинах IGF циркулює у комплексі з транспортним білком (IGFBP – IGF Binding Protein). В цілому система інсуліноподібних факторів росту містить у своєму складі інсуліноподібні фактори росту I (IGF-I) і II (IGF-II), рецептор для IGF та транспортний білок для IGF [274, 275]. IGF-I та IGF-II є одноланцюговими пептидними молекулами. Синтезуються клітинами багатьох тканин, головним чином у печінці. Виявляють ендо-, пара- та аутокринні ефекти, при цьому ендокринний ефект більш виражений. У кровообіг секретуються при зв'язуванні гормону росту з рецепторами на поверхні гепатоцитів. IGF-I та IGF-II стимулюють проліферацію, диференціювання та метаболізм м'язових тканин. IGF-I є одним із головних регуляторів постнатального розвитку, що приймає активну участь у рості та розвитку ембріону [276].

Ген інсуліноподібного ростового фактору I (*IGF-I*) містить у своєму складі 4 екзони та 3 інтрони; загальна довжина ~ 48,43 т.п.н., розміщується у 1 хромосомі. Кодує білок довжиною ~ 153 а.з.

Поліморфізм локусу інсуліноподібного ростового фактору I у популяціях курей різних порід та напрямів продуктивності досить широко вивчено [277-280]. Доведено зв'язок різних алельних варіантів IGF-I з показниками м'ясної та ячної продуктивності курей різних порід [281]. Виявлено бажані, для потреб селекції, алелі. За результатами досліджень, що проведено у зарубіжних

країнах, встановлено високий (для вивчених популяцій) рівень поліморфізму за 5' та 3' нетранслюємими ділянками (5'UTR та 3'UTR), а також інтронною та екзонною частинами гену IGF-I. Однонуклеотидний поліморфізм (SNP) гену IGF-I у 5'UTR ділянці, а також в інтронах, зараховується до класу некодуючих однонуклеотидних поліморфізмів, оскільки не призводить до безпосередньої зміни первинної структури білку, що синтезується (тобто не займає екзонну частину гену). Однак подібний тип SNP у некодуючих фрагментах гену може призводити до змін у характері експресії *IGF-I*, та, тим самим, опосередковано впливати на фенотип.

Так, у роботах Li H.F. зі співавторами, а також Li W. зі співавторами продемонстровано, що PstI-поліморфізм у 5'UTR гену IGF-I пов'язаний з показниками ячної та м'ясної продуктивності птиці [282, 283]. Особини генотипу C₂C₂ характеризуються вищою ячною продуктивністю за 300 та 400 діб. У той же час особини генотипу C₁C₁ характеризуються більшими значеннями живої маси (ефект виражений залежно від породи – породоспецифічність маркеру). Також і в роботі Kim M.H. зі співавторами встановлено вищу ячну продуктивність особин генотипу C₂C₂ порівняно з C₁C₁ тепер вже у корейських нативних популяціях [284].

Стосовно HinfI-поліморфізму в промоторі *IGF-I* у роботі Мое Н.Н. зі співавторами виявлено, що цей поліморфізм пов'язаний, у першу чергу, з м'ясними якостями курей [285]. Так, наприклад, генотип AA корелює з підвищеною живою масою птиці. Проведені дослідження генетичної структури популяцій курей різних порід за HinfI-поліморфізмом у промоторі *IGF-I* довели, що у бройлерів цей локус є мономорфним (наявні тільки особини генотипу AA), у «Кобб 500» істотним чином превалюють особини гомозиготні за алелем А. В той же час у більшості ячних курей картина прямо протилежна – у популяціях переважають особини з генотипом СС. Представники білого леггорну та білого плімутроку займають проміжне положення – у популяціях зустрічаються особини усіх можливих генотипів.

Поряд зі всіма вищеописаними мутаціями виявлено SNP різних типів, що займають як регуляторні, так і кодуючі області молекули, що безпосередньо пов'язані з живою масою птиці, масою яйця, якістю шкаралупи та несучістю взагалі [281, 286, 287]. Зазначені дослідження проводились за кордоном на птиці комерційних ліній, а також локальних популяцій [288–292].

Усе вищеперераховане робить локус інсуліноподібного ростового фактору I одним із найперспективніших для вивчення у генетиці птиці, у контексті можливості його використання для потреб маркер-асоційованої селекції [274].

Ген пролактину. Пролактин (PRL) поряд із гормоном росту охоплює найширший спектр фізіологічних функцій [293–295]. Ген пролактину (*PRL*) містить у своєму складі 5 екзонів, 4 інтрони; загальна довжина ~ 6,16 т.п.н. Розміщений у другій хромосомі. У птиці пролактин відіграє одну із ключових ролей у регуляції унікального для цього класу тварин процесу – насиджування [296–299]. Насиджування у сільськогосподарської птиці тісно пов'язано з показниками загальної продуктивності птиці (птиця, схильна до прояву насиджування, характеризується досить низькою несучістю), що й визначає пролактин як перспективний об'єкт для вивчення [300]. У певних концентраціях та на різних стадіях репродуктивного циклу пролактин відіграє ключові функції у регуляції несучості різних видів сільськогосподарської птиці, у зв'язку з чим він досить добре вивчений.

Важлива роль пролактину в регуляції репродуктивних функцій птиці визначила детальне вивчення його генетичних особливостей – у першу чергу дослідження генетико-популяційних параметрів різних ліній та порід, а також пошук зв'язку різних алельних варіантів гену пролактину з господарсько-корисними ознаками. При цьому, як й у випадку з геном гормону росту, дослідження проводять як на комерційних лініях, так й на локальних популяціях курей.

Так, у роботах різних авторів встановлена висока варіабельність 5' фланкуючої ділянки, а також промоторного фрагменту *PRL* [301–304]. У

працях Bhattacharya T.K. зі співавторами вивчено зв'язок різних алельних варіантів та гаплотипів у локусі пролактину з продуктивними якостями курей породи білий леггорн [303, 305–308]. При цьому частина алелів була визначена за використання методу SSCP.

У той же час до однієї із найперспективніших мутацій відноситься інсерція розміром 24 п.н. у промоторі *PRL*. У цьому випадку такий тип поліморфізму відноситься до Indel-маркерів. Виявлено поліморфізм за 24 indel для курей самих різних порід та напрямів продуктивності в цілому ряді публікацій різних авторів [309–315]. Так, наприклад, доведено, що наявність інсерції розміром 24 п.н. позитивно корелює з підвищеною несучістю курей та негативно – з проявом насиджування.

Окрім 24 indel до перспективних для вивчення мутацій відноситься транзиція цитозину в тимін у положенні -2402 гену пролактину, для якої встановлено позитивний зв'язок генотипу СС з несучістю у популяціях різних порід та регіонів [302, 311, 316–318].

Окрім курей значну увагу до вивчення поліморфних варіантів гену пролактину приділяють і при дослідженні інших видів сільськогосподарської птиці – індичок, качок, гусей, перепелів тощо [319–322].

В цілому, беручи до уваги важливу роль пролактину в регуляції репродуктивного циклу птахів, можна відмітити особливі перспективи вивчення поліморфізму даного гену, в першу чергу, в зв'язку з яєчною продуктивністю.

Ген рецептору пролактину. Рецептор пролактину (PRLR) – трансмембранний поліпептид розміром 831 а.з. Є одним із ключових вузлів у ієрархії дії пролактину на клітини-мішені [323]. Належить до класу трансмембранних молекул-рецепторів для гормонів, що й визначає усю важливість виконуваних ним функцій. Очевидно, що будь-які зміни у структурі молекул-рецепторів або в характері експресії генів, які їх кодують, можуть призводити до досить виражених наслідків, які мають істотне значення у контексті продуктивних показників птиці. Беручи до уваги широкий спектр

функцій пролактину у птахів, слід враховувати всю важливість ефективного функціонування рецептору пролактину для успішного здійснення функцій його ліганду (в якості якого виступає пролактин). Фізіологічна дія рецептору пролактину здійснюється після зв'язування ліганду за допомогою активації різних вторинних посередників (AK/Stat, Shc-МАРК, Fyn), що, зрештою, і призводить до фізіологічної реакції клітини-мішені [324].

Ген рецептору пролактину (*PRLR*) містить у своєму складі 14 екзонів та 13 інтронів; загальна довжина становить ~ 30,80 т.п.н. Як і рецептор гормону росту, ген рецептору пролактину розміщений у Z-хромосомі, що визначає його гемізіготний стан у самиць птиці.

Беручи до уваги виняткову важливість рецептору пролактину в регуляції репродуктивних процесів у птиці, увага дослідників зосереджена в першу чергу на зв'язку поліморфізму *PRLR* з проявом насиджування, а також з основними параметрами несучості [299, 325].

За результатами проведених досліджень виявлено різні варіативні фрагменти гену, показано зв'язок алельних варіантів *PRLR* з показниками продуктивності птиці. Так, у роботі Rashidi H. зі співавторами виявлено SSCP-поліморфізм у другому, а також BamHI-поліморфізм у п'ятому екзоні гену *PRLR* [326]. Встановлено асоціативні зв'язки між алельними варіантами за другим екзоном гену з показниками живої маси і віком знесення першого яйця. У той же час виявлено кореляцію між алелями за BamHI-поліморфізмом у п'ятому екзоні з показниками яєчної продуктивності в цілому (загальною кількістю знесених яєць). Доведено перевагу особин з генотипом BamHI+. Дослідження проведені на популяціях аборигенних іранських курей.

У роботі Jiang R.S. зі співавторами, проведеної на комерційних лініях курей, а також на локальних китайських породах, виявлено поліморфізм у 3 та 6 екзонах *PRLR*, однак асоціативних зв'язків з проявом насиджування та показниками продуктивності не було встановлено [309].

У той же час у роботах Liu L.B. і Li D.Y. зі співавторами, виконаних на аборигенній китайській породі курей (Erlang Mountainous chicken), за

використання методів SSCP та секвенування, визначено різні типи точкових мутацій (транзицій та трансверсій) у окремих ділянках гену [327, 328]. На підставі отриманих даних, авторами було визначено поширені в дослідній популяції курей гаплотипи, з'ясовано їх асоціативний зв'язок з показниками яєчної продуктивності (маса першого яйця, загальна кількість знесених яєць тощо).

Зв'язок SSCP-алелів у різних частинах гену з показниками яєчної продуктивності курей китайських аборигенних порід також була підтверджена у роботі Zhang L. зі співавторами [329].

В цілому, перспективи використання низки поліморфних варіантів гену рецептору пролактину, з урахуванням його значущості у процесах регуляції репродуктивних функцій птиці, дають змогу рекомендувати *PRLR* як один з основних генів-кандидатів у молекулярні маркери продуктивності курей в програмах маркер-асоційованої селекції [294].

Ген Mx. На сучасному етапі розвитку птахівництва до однієї з найбільш актуальних проблем, поряд з питаннями щодо параметрів продуктивності птиці, відноситься генетична резистентність до захворювань. Розвиток сучасних молекулярно-генетичних технологій дав змогу оцінювати генетичну структуру ліній та порід птиці безпосередньо на рівні ДНК, що, в свою чергу, призвело до інтенсифікації селекційної роботи в цілому. Особливо актуальним є, у цьому контексті, використання методів маркер-асоційованої селекції для вирішення питань, пов'язаних із генетичною стійкістю до вірусних захворювань птиці. До одного з найбільш перспективних об'єктів у цьому напрямку відноситься білок Mx [330, 331].

Білок Mx є одним із ключових компонентів, що беруть участь в інгібуванні реплікації РНК-утримуючих вірусів [332]. Відноситься до інтерферон-індукованих білків (експресія індукується інтерфероном I) [333, 334]. Білок Mx є специфічним до РНК-утримуючих вірусів, найбільш відомими представниками яких є віруси грипу та хвороби Ньюкасла, що мають особливе значення для птахівництва [335–339].

Існують різні поліморфні варіанти білку Mx, окремі з яких мають пріоритетне значення. Зокрема наявність серину (S) у положенні 631 білку Mx (Ser631) призводить до пригнічення противірусної активності, в той час як присутність аспарагину (N, Asn631) корелює з вираженою противірусною активністю [340]. З'ясовано, що вищеописана мутація (S631N) у білку Mx безпосередньо викликана транзицією гуаніну в аденін у положенні 2032 (G2032A) Mx-гену. Як свідчать результати досліджень, зазначена транзиція розміщена у сайті рестрикції для RsaI, що дало змогу розробити досить простий та зручний метод її визначення, як це описано у роботі Sironi L. зі співавторами [340].

Mx-ген (*Mx*) містить в своєму складі 14 екзонів та 13 інтронів; загальна довжина становить ~ 2671 п.н. Розміщений у 1 хромосомі. Кодує білок розміром 705 амінокислотних залишків. Структура білку досить високо консервативна у хребетних. У курей білок Mx міститься переважно у цитоплазмі. Саме безпосередня взаємодія молекули з компонентами інфекційного агенту й лежить в основі противірусної активності протеїну [341].

У зв'язку з значним пріоритетом досліджень у галузі генетичної резистентності до вірусних захворювань, у першу чергу до вірусу грипу, в різних країнах були проведені дослідження з моніторингу мутації S631N у різних порід курей – від комерційних високопродуктивних ліній до нативних популяцій [342–345]. Доведено високу варіабельність Mx-гену за цією мутацією у популяціях курей ряду порід різних напрямів продуктивності [346–348]. Визначення частоти зустрічальності мутації S631N дає змогу вивчення зв'язку алелів Asn631 та Ser631 з показниками продуктивності й, безпосередньо, резистентності до захворювань, проведення спрямованої селекційної роботи з метою отримання нащадків з бажаними генотипами. Подібні роботи виконуються й на інших видах птиці, що додатково підкреслює актуальність проведення досліджень у цьому напрямку [206, 349].

Ген гіпофізарного фактору транскрипції 1. Гіпофізарний фактор транскрипції 1 (PIT-1, також відомий як POU1F1) –тканиноспецифічний білок,

експресується, головним чином, у передній частці гіпофізу [350]. Безпосередньо бере участь у регуляції експресії генів гормону росту, пролактину, тиреотропного гормону [351–353]. Належить до так званої «вищої ланки» регуляції соматотропної осі, визначаючи тим самим функції гормону росту. Поряд із залученням до регуляції експресії генів вищенаведених гормонів PИT-1 бере участь у процесах проліферації та диференціювання гормон-секретуючих клітин гіпофізу (лактотропні, соматотропні та тиреотропні клітини) [354]. Участь PИT-1 у регуляції активності генів здійснюється за допомогою взаємодії білку з ділянкою ДНК-мішені, шляхом утворення димерів [355]. Однак, незважаючи на досить значну кількість досліджень, питання про всі тонкощі механізму взаємодії PИT-1 з генами-мішенями у різних видів тварин все ще залишаються відкритими [356].

Як наслідок з широкого спектру виконуваних функцій, зміни у характері експресії PИT-1 можуть призводити до варіацій експресії вищеперелічених генів, що, у свою чергу, може відбитися на прояві будь-якої ознаки. Функції гіпофізарного фактору транскрипції безпосередньо пов'язані з функціонуванням контрольованих генів (гормон росту, пролактин), і, опосередковано, з усіма обумовленими ними ознаками, що робить PИT-1 перспективним для вивчення взаємозв'язку різних алельних варіантів з продуктивними ознаками тварин [357].

У курей ген гіпофізарного фактору транскрипції 1 (PИT-1) містить у своєму складі 6 екзонів та 5 інтронів; загальна довжина становить ~ 13,42 т.п.н. Розміщений у 1 хромосомі. Кодує білок розміром 327 амінокислотних залишків.

У роботі Nie Q. зі співавторами виявлено 23 SNP у гені PИT-1, з них 16 у інтронах та 3 у 3'UTR [241]. Також з'ясовано 2 синонімічні та 2 несинонімічні мутації, що призводять до заміни амінокислотних залишків у білку – метіонін на валін у положенні 167 (M167V) та аспарагін на серин у положенні 254 (N254S). Поряд із одонуклеотидними поліморфізмами встановлено також інсерцію розміром 57 п.н. у другому інтроні гену.

Разом із пошуком нових алельних варіантів гену PIT-1 проводяться дослідження з вивчення зв'язку різних алелів з показниками продуктивності птиці. Так, у роботі Jiang R. зі співавторами, за допомогою методу SSCP з подальшим секвенуванням виявлено новий одонуклеотидний поліморфізм у положенні 980, що призводить до заміни аспарагіну на ізолейцин в активній частини кодованого білку [358]. У свою чергу, розподіл алелів *PIT-1* за виявленим поліморфізмом вірогідно відрізнявся у популяціях курей різних напрямів продуктивності. Так, для м'ясних курей характерним є превалювання частоти алеля А порівняно з яєчними. Як результат проведених досліджень доведено зв'язок алеля А з показниками м'ясної продуктивності. Роботу було виконано на бройлерах, білому леггорні та аборигенних китайських популяціях курей.

Результати проведених досліджень були підтверджені також й у роботі Nie Q. зі співавторами, в якій розглядалося вже декілька різних типів поліморфізмів (SNP і Indel) у контексті їх зв'язку з показниками яєчної продуктивності [359].

У свою чергу, у роботі Bhattacharya T.K. зі співавторами, встановлено зв'язок поліморфізму в промоторі та екзонній ділянці гену PIT-1 з показниками резистентності птиці (дослідження проведені за використання методу SSCP) [360]. Можливий зв'язок з гуморальним імунітетом – через гормон росту, певні алельні варіанти якого пов'язані зі стійкістю до хвороби Марека (більш докладно описано у відповідному розділі). Також у роботах Bhattacharya T.K. зі співавторами детально досліджено поліморфізм PIT-1 у нативних індійських популяціях курей, виявлено зв'язок різних алельних варіантів гену з показниками м'ясної продуктивності бройлерів [361, 362].

Підтвердження результатів про зв'язок поліморфних варіантів PIT-1 з м'ясною продуктивністю, окрім того, було отримано у роботі Rodbari Z. зі співавторами, проведеної на курях м'ясних порід Ірану [363].

Поряд з дослідженнями на курях також проводяться аналогічні роботи й на інших видах птиці, зокрема на качках та гусях [364, 365].

Родина трансформуючих ростових факторів бета. Родина трансформуючих ростових факторів-бета (TGF- β) належить до однієї з найбільш важливих груп білків, що беруть участь у регуляції основних фізіологічних функцій організму [366, 367]. Члени родини TGF- β зараховуються до мультифункціональних сигнальних протеїнів, що відіграють важливу роль у підтримці тканинного гомеостазу, рості та диференціюванні різних типів клітин, формуванні міжклітинного матриксу, є індукторами апоптозу, беруть участь у регуляції імунної системи тощо [368–370]. Поряд з усім перерахованим вище, показана їх роль у регуляції функцій репродуктивної системи у ссавців [371]. Їм властива як паракринна, так й аутокринна активність. Незважаючи на наявність різних типів трансформуючих факторів росту β (TGF- β 1, TGF- β 2 та TGF- β 3), механізм їх дії (сигнальний каскад) багато в чому збігається [372, 373]. Біологічні функції кодованих цими генами білків дуже різноманітні та охоплюють різні системи органів і тканин, при цьому широкий спектр їх фізіологічних функцій характерний для багатьох видів тварин [374].

Довгий час вважалося, що, на відміну від ссавців, у птиці є 4 ізоформи трансформуючих ростових факторів бета – TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 та TGF- β 4 [375–377]. Однак у роботі Halper J. зі співавторами виявлено, що амінокислотні послідовності TGF- β 4 птиці та TGF- β 1 ссавців збігаються на 82 % [378]. При цьому TGF- β 1 як такого у птиці не ідентифіковано. Більш того, функціональна активність TGF- β 4 у птиці подібна до TGF- β 1 у ссавців. Внаслідок усього вищевикладеного автори роблять висновок, що TGF- β 4 птиці є ортологом людського TGF- β 1. Таким чином, еволюційно існують тільки три ізоформи TGF β як у ссавців, так й у птиці, TGF- β 4 як такого не існує, та є саме TGF- β 1 [378]. Однак, незважаючи на це, досі у деяких публікаціях вказують наявність чотирьох ізоформ TGF- β у птиці [379].

Кожен із членів родини TGF- β кодується окремим геном. Так, ген TGF- β 1 локалізований у курей у 13 хромосомі, містить у своєму складі 9 екзонів та 8 інтронів; загальна довжина становить $\sim 4,69$ т.п.н. Кодує білок розміром 393 а.з.

Ген TGF- β 2 локалізований у 3-й хромосомі, містить у своєму складі 7 екзонів та 6 інтронів. Найбільший зі складових усієї родини TGF- β . Загальна довжина $\sim 62,87$ т.п.н. Кодує білок розміром 412 а.з.

Ген TGF- β 3 – розташований у 5-й хромосомі. Містить в своєму складі 7 екзонів та 6 інтронів. Загальна довжина становить $\sim 13,94$ т.п.н. Кодує білок, що складається з 412 амінокислотних залишків.

Завдяки широкому спектру фізіологічних функцій гени родини трансформуючих ростових факторів бета належать до пріоритетних об'єктів досліджень у напрямку вивчення зв'язку їх алельних варіантів з продуктивними ознаками птиці, що робить родину TGF- β перспективною для використання у програмах маркер-асоційованої селекції. У різних роботах виявлено поліморфні варіанти кожного зі складових родини.

Так, у роботі Li H. зі співавторами, виявлено поліморфізм у всіх трьох складових родини TGF- β , вивчено зв'язок різних алельних варіантів генів з показниками продуктивності птиці [376]. З'ясовано поліморфізм у гені TGF- β 1 (у наведеній роботі його позначають як TGF- β 4) – трансверсія С/А у положенні 632, місенс мутація, що призводить до заміни Glu/Asp у кодованому білку. Ген TGF- β 2 – визначено транзицію Т/С у положенні -640. Ген TGF- β 3 – виявлено трансверсію С/А у положенні 2833 у четвертому інтроні. За кожним з поліморфізмів проведено аналіз зв'язку з продуктивними ознаками курей, у першу чергу, м'ясними. За результатами досліджень встановлено перспективні алелі за кожним з генів, асоційовані з показниками живої маси, приросту, маси внутрішніх органів, рівнем мінералізації кісткової тканини тощо. Проведеними авторами дослідженнями доведено широкий спектр передбачуваних асоціативних зв'язків з різними продуктивними ознаками курей, що робить систему TGF- β перспективною для проведення подальших досліджень у контексті можливості використання результатів у програмах маркер-асоційованої селекції.

Також виявлено зв'язок поліморфізму в системі TGF- β з параметрами імунної системи організму. У роботах Malek M. та Zhou H. зі співавторами досліджено зв'язок різних алельних варіантів генів TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 з

показниками гуморального імунітету, бактеріального навантаження на селезінку та сліпу кишку щодо впливу *Salmonella enteritidis* на організм птиці [380, 381].

Зв'язок поліморфізму *TGF-β3* з показниками м'ясної продуктивності бройлерів було також відзначено Ye X. зі співавторами [382]. Необхідно зауважити, що у цій роботі вираженість ефекту варіювала залежно від лінії птиці, що може вказувати на породоспецифічність цього маркеру.

Зв'язок поліморфізму генів трансформуючих факторів росту бета з м'ясною продуктивністю птиці був доведений також й у роботах Saxena V.K. та Jin S. зі співавторами [226, 383]. У роботі Chen S. зі співавторами виявлено кореляцію між алелями *TGF-β1*, *TGF-β2*, *TGF-β3* та показником діаметру м'язових волокон у бройлерів [384].

Окрім того, проводяться дослідження з пошуку нових, перспективних мутацій у генній родині трансформуючих факторів росту бета. Так, у роботі Tang S. зі співавторами встановлено раніше не описаний Indel-поліморфізм у промоторному фрагменті гену (інсерція розміром 62 п.н.) [385]. З'ясовано асоціативний зв'язок генотипу g.-851_-790wt / wt (гомозигота за інсерцією) з показниками живої маси. Дослідження проведені на китайській породі курей (Beijing You chickens).

Беручи до уваги наявність різних алельних варіантів кожного зі складових родини *TGF-β*, асоційованих з показниками резистентності до захворювань бактеріальної етіології, в першу чергу до сальмонельозу, слід зазначити особливу актуальність проведених досліджень через важливість цього захворювання для людини. У роботах різних вчених виявлено зв'язки алельних варіантів генів родини *TGF-β* з показниками резистентності до сальмонельозу (в першу чергу до *Salmonella enteritidis*) у курей як комерційних ліній, так і нативних порід [386, 387].

Як правило, з урахуванням фізіологічних функцій *TGF-β*, дослідження проводять у першу чергу в напрямі покращення м'ясних ознак або показників резистентності птиці. Однак, беручи до уваги наявність порід та ліній курей комбінованого напрямку продуктивності, необхідно вивчати також і показники

несучості та якість яєць, у тому числі й на нативних популяціях. Проведені Ghosh A. зі співавторами дослідження BslI-поліморфізму в четвертому інтроні *TGF-β3* у синтетичній популяції білого леггорну виявили мономорфний характер цього маркера, що може бути наслідком інтенсивної селекційної роботи у напрямку підвищення яєчної продуктивності птиці [377].

Поряд із вивченням генетико-популяційних параметрів бройлерів та інших представників комерційних ліній та порід курей, проводяться дослідження й на аборигенних породах різних регіонів світу. Так у роботі Enayati B. зі співавторами вивчено поліморфізм у четвертому інтроні *TGF-β3* у нативних популяціях іранських курей [245]. Аналіз того ж поліморфізму *TGF-β3* у локальній популяції курей Таїланду проведений у роботі Vuasook T. зі співавторами [388].

Ґрунтовні дослідження, які показують зв'язок між різними функціональними регуляторними системами організму птиці, були виконані Pandey N.K. зі співавторами на популяції індійських бройлерів [389]. Виявлено асоціації між генотипом за локусом інсуліноподібного ростового фактору I та рівнем експресії різних генів, у тому числі й *TGF-β2*, що, в свою чергу, відбивалося на прояві господарсько-корисних ознак у курей дослідної популяції. Проведені цими авторами дослідження вказують на необхідність комплексного підходу при вивченні генетико-популяційних особливостей дослідних ліній та порід, а також при аналізі зв'язку різних алельних варіантів функціональних генів з продуктивними ознаками птиці.

Таким чином, в багатьох країнах з розвинутим птахівництвом, проведено чисельні фундаментальні дослідження щодо виявлення особливостей генетичної структури різноманітних популяцій курей як комерційних, так і нативних порід за використання різних типів ДНК-маркерів. З'ясовано зв'язки алельних варіантів різних функціональних генів з проявом господарсько-корисних ознак курей, що дало змогу суттєво підвищити загальну ефективність селекційної роботи, створити нові високопродуктивні лінії та збільшити економічну привабливість галузі в цілому. В Україні, нажаль, подібні дослідження практично не виконували,

що багато в чому й визначає необхідність проведення заходів щодо вивчення поліморфізму локусів кількісних ознак у популяціях курей різних порід саме вітчизняної селекції та пошуку зв'язку різних алельних варіантів генів з показниками господарсько-корисних ознак.

1.6 Обґрунтування напрямку власних досліджень

На початку 90-х років минулого століття в Інституті птахівництва Української академії аграрних наук (провідної науково-дослідної установи з птахівництва в Україні) нараховувались десятки порід та ліній сільськогосподарської птиці різних напрямів продуктивності (серед яких були такі рідкісні породи як юрлівські голосисті, італійські куріпчасті, голошийні кури, міні-кури тощо) [390]. На теперішній час у Державній дослідній станції птахівництва (правонаступниці вищеназваного Інституту птахівництва) у наявності лише обмежена кількість порід курей української селекції, які представлені декількома лініями. До найбільш розповсюджених представників цього «генофондного ядра» належать породи курей яєчного напрямку продуктивності – бірківська барвіста (лінія А); м'ясо-яєчні кури – плімутрок білий (лінія Г-2); яєчно-м'ясні кури – породи полтавська глиняста (лінія 14) та род-айленд червоний (лінія 38 та лінія 02). Однак ці породи курей не мають значення у контексті промислового птахівництва та реалізуються лише для потреб невеликих фермерських господарств, що багато в чому визначається підвищеними адаптивними здібностями курей української селекції при їх утриманні на подвір'ї. Відсутність вираженої державної підтримки та зацікавленості крупних виробників продукції птахівництва на Україні ставлять під загрозу існування генофондних порід у цілому, що, у випадку їх зникнення, призведе до безповоротної втрати унікального генетичного матеріалу (адаптованого до умов утримання в цій геокліматичній зоні). Вивчення генетично обумовлених особливостей різних порід птиці відноситься до однієї з пріоритетних задач проблеми збереження генофонду [391]. Тому питання

визначення особливостей генетичної структури популяцій українських локальних порід курей, поряд з проблемами збереження генофонду в цілому, набуває риси першочергової задачі для птахівництва України. Нині вивчення генетичних особливостей та алельного різноманіття порід та ліній локальних популяцій сільськогосподарської птиці за сукупністю різних типів молекулярно-генетичних маркерів проводиться у цілій низці зарубіжних країн, однак в Україні, нажаль, такі роботи практично не проводяться. З урахуванням вираженої загрози невірної втрати популяцій унікальних локальних порід та породних груп курей української селекції, необхідність дослідження їх генетичної складової виходить на першочерговий план. Більш того, виявлення особливостей генетичної структури дослідних популяцій за сукупністю перспективних генів-кандидатів створюють необхідні передумови для проведення маркер-асоційованої селекції (MAS) у подальшому, що, очікувано, дасть змогу для максимальної реалізації продуктивного потенціалу вітчизняної птиці та істотно збільшить її конкурентоздатність відносно зарубіжних порід та ліній. Тому саме зазначені невирішені питання зумовили загальну ідею та методологічну концепцію виконаної дисертаційної роботи.

РОЗДІЛ 2

ЗАГАЛЬНА МЕТОДИКА ТА ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріал досліджень

Експериментальну частину робіт виконували у період з 2010 по 2017 рік: з 2010 по 2012 р. – у лабораторії генетичного контролю та молекулярної діагностики Інституту птахівництва НААН; з 2012 по 2014 р. – у лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Інституту тваринництва НААН; з 2014 по 2015 р. – у лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Державної дослідної станції птахівництва НААН; з 2015 по 2018 р. – у лабораторії молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН. Дослідні популяції курей утримували у віварії лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики та на експериментальній фермі «Збереження державного генофонду птиці» Державної дослідної станції птахівництва НААН.

Для проведення досліджень використовували птицю української селекції: кури яєчного напрямку продуктивності – лінія А породи бірківська барвистая (n=500; популяції 2011 – 2015 р.); яєчно-м'ясного напрямку продуктивності – лінія 14 породи полтавська глиняста (n=380; популяції 2012, 2013 та 2015 р.) та лінія 38 породи род-айленд червоний (n=180; популяції 2012 та 2015 р.); м'ясо-яєчного напрямку продуктивності – лінія Г-2 породи плімутрок білий (n=400; популяції 2011 – 2014 р.). Для визначення генетичної диференціації дослідних популяцій за мікросателітними маркерами додатково вивчали лінію 02 породи род-айленд червоний, а також субпопуляції Г-1, Г-3, Г-4 та С українських м'ясо-яєчних курей (n=30 у кожній із дослідних популяцій).

М'ясо-яєчні кури (кольоровий геркулес) представлені 5 субпопуляціями, що різняться за забарвленням оперення та за продуктивними ознаками. До

субпопуляцій м'ясо-яєчних курей належать: Г-1 – зозулясті; Г-2 – білі (плімутрок білий); Г-3 – золотисті; Г-4 – барвисті; С – сріблясті [392, 393].

Всі дослідні субпопуляції курей характеризуються вираженою комбінованою продуктивністю та доброю пристосованістю до умов розведення у фермерських та присадибних господарствах [394]. Жива маса курей на 48 тиждень життя за субпопуляціями становить 2,46 – 3,11 кг; маса яйця на 40 – 48 тиждень життя – від 60,2 г до 62,8 г; несучість на середню несучку за 40 тижнів життя – від 74,2 яєць до 89,6 яєць; збереженість – від 79,7 % до 92,6 % [32].

Кури яєчного напрямку продуктивності – порода бірківська барвиста лінія А (сріблястий леггорн). Характеризується високим рівнем виводимості (88–94 %) та несучості (81,3 яйця за 40 тижнів життя на середню несучку) [395, 396].

Кури яєчно-м'ясного напрямку продуктивності представлені двома породами – полтавською глинястою та род-айлендом червоним.

Порода полтавська глиняста представлена лінією 14. Для неї характерні високі значення показників комбінованої продуктивності, адаптаційних якостей, а також стійкість до неопластичних захворювань, у першу чергу, до хвороби Марека [397, 398]. Характеризується наступними показниками продуктивності: несучість – 235–240 яєць; маса яйця – 59,5–60,5 г; жива маса курей – 2,2–2,3 кг; збереженість – 93–95 [399].

Порода род-айленд червоний представлена двома лініями – 02 та 38 [400, 401]. Лінія 02 характеризується наступними показниками продуктивності: несучість – 230–240 яєць; маса яйця – 61,0–62,5 г; жива маса курей – 2,1–2,4 кг; збереженість – 94–96 %. Лінія 02 використовується як резервна.

Лінія 38 добре пристосована до різних умов утримання та характеризується наступними показниками продуктивності: несучість – 240–245 яєць; маса яйця – 59,0–61,0 г; жива маса курей – 2,0–2,1 кг; збереженість – 95–97 % [390].

Роботу проводили згідно загальної схеми досліджень, що представлена на рис. 2.1.

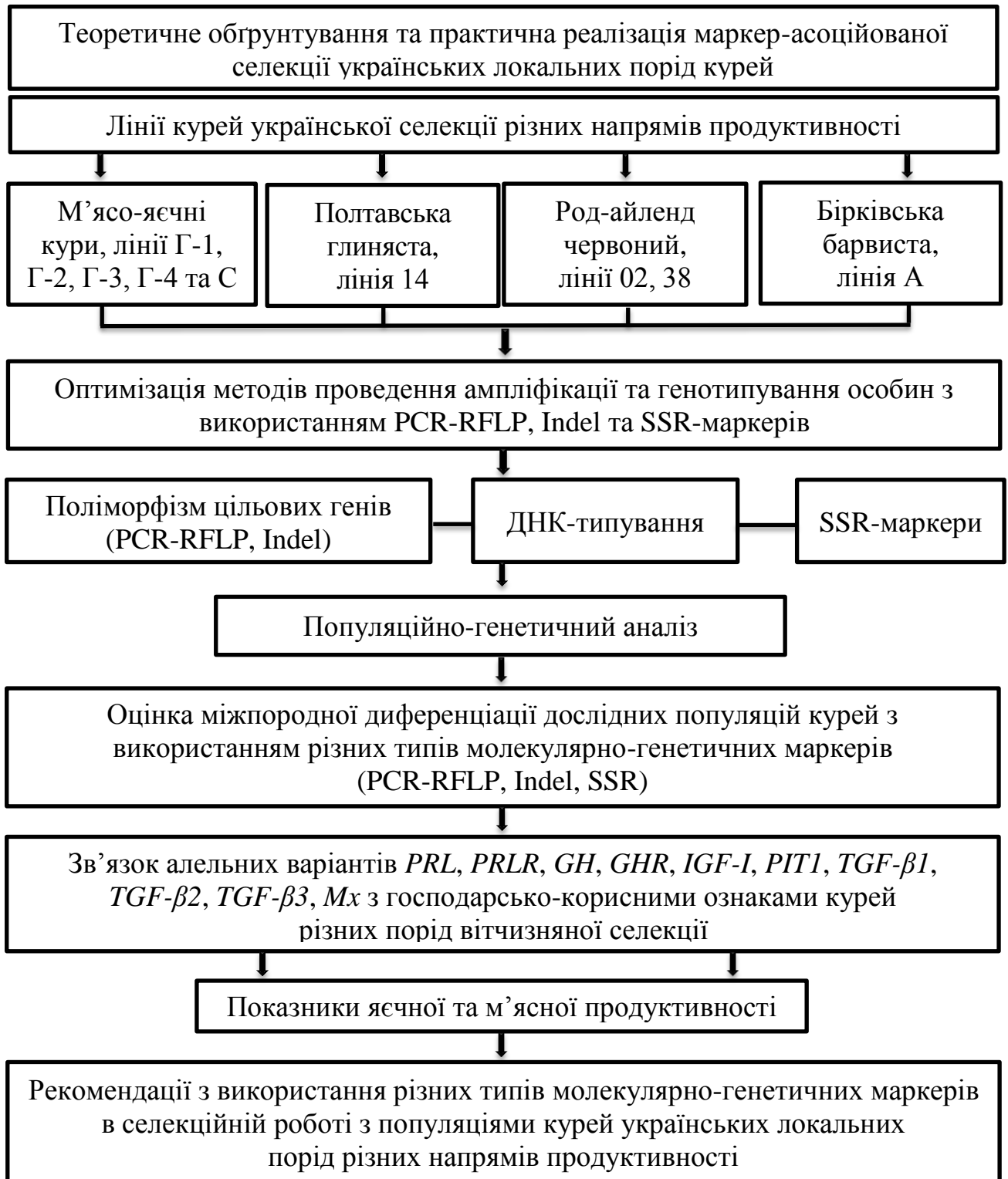


Рис. 2.1 Загальна схема досліджень

Згідно зі схемою дослідження умовно розподілили на декілька етапів, результати яких представлено у відповідних розділах виконаної роботи. На першому етапі проводили дослідження з оптимізації методів проведення

ампліфікації та генотипування особин з використанням різних типів молекулярно-генетичних маркерів. На другому етапі, за методиками, що розроблені у першій частині, проводили дослідження популяційно-генетичних показників дослідних порід та ліній курей за мікросателітними локусами. На третьому етапі вивчали поліморфізм генів кількісних ознак у популяціях курей різних порід та напрямків продуктивності за використанням PCR-RFLP та Indel маркерів. На четвертому етапі проводили дослідження з вивчення асоціативного зв'язку виявлених поліморфних локусів з показниками господарсько-корисних ознак курей.

2.2 Обладнання, що використане в роботі

В процесі виконання досліджень використовували: програмовані термоциклери «Терцик» («ДНК-технологія», Російська Федерація) та AMPLY 4 Bioson (Російська Федерація); твердотільний термостат; настільну мікроцентрифугу; мікроцентрифугу типу вортекс; настільну центрифугу; набір автоматичних дозаторів змінного об'єму; блок живлення «ЕЛЬФ»; блок живлення «Cleaver Scientific»; камеру для горизонтального електрофорезу Helicon; камеру для вертикального електрофорезу Helicon (розмір гелю 20 × 20); камеру для вертикального електрофорезу Cleaver Scientific max Omni (розмір гелю 20 × 20); транслюмінатор; холодильну камеру NORD, Zanussi; цифрову дзеркальну фотокамеру DSRL Sony α330.

2.3 Методики та методи досліджень

Відбір біологічного матеріалу для проведення ДНК-типування. Як джерело біологічного матеріалу обирали пір'я або кров птиці. Для проведення досліджень застосовували тільки висмикнуті пір'я (з області шиї або грудей), які містять у своєму складі очин. Для виділення ДНК використовували по 3 пір'їни від кожної особини окремо. Кров відбирали за допомогою

скарифікатора на стерильний фільтрувальний папір. Кожний зразок підсушували та індивідуально упаковували для попередження контамінації.

Виділення ДНК. Виділення ДНК з дослідних зразків проводили за використання комерційного набору реагентів «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Російська Федерація), а також набору реагентів «Ускоренная пробоподготовка» («Компания Биоком», Російська Федерація), згідно з інструкціями фірми виробника. Ефективність виділення ДНК визначали за допомогою електрофорезу у 0,7 % агарозному гелі при 200 V протягом 5 хв. Проби візуалізували за використання бромистого етидію в ультрафіолетовому спектрі.

Проведення ампліфікації, параметри полімеразної ланцюгової реакції. ПЛР проводили за використання програмованих термоциклерів.

В дисертаційній роботі вивчали наступні мутації в цільових генах:

Ген пролактину (*PRL*):

- Інсерція розміром 24 п.н. у промоторному фрагменті гену (24 Indel);
- Однонуклеотидний поліморфізм (транзиція цитозину у тимін) в положенні -2402 (C-2402T) (ендонуклеаза рестрикції AluI).

Ген рецептору пролактину (*PRLR*) – Val¹¹¹-поліморфізм у п'ятому екзоні.

Ген гормону росту (*GH*):

- MspI-поліморфізм у першому інtronі;
- MspI-поліморфізму у четвертому інtronі;
- SacI-поліморфізм у четвертому інtronі;
- AluI-поліморфізм у четвертому інtronі.

Ген рецептору гормону росту (*GHR*):

- HindIII-поліморфізм у другому інtronі;
- NspI-поліморфізм у п'ятому інtronі.

Ген трансформуючого ростового фактору $\beta 1$ (*TGF- $\beta 1$*) – трансверсія цитозину в аденін у положенні 632;

Ген трансформуючого ростового фактору $\beta 2$ (*TGF- $\beta 2$*) – транзиція тиміну в цитозин в положенні -640;

Ген трансформуючого ростового фактору $\beta 3$ (*TGF- $\beta 3$*) – трансверсія цитозину в аденін у положенні 2833 у четвертому інтроні.

Ген гіпофізарного фактору транскрипції 1 (*PIT-1*) – інсерція розміром 57 п.н. у другому інтроні;

Ген інсуліноподібного ростового фактору I (*IGF-I*):

- PstI-поліморфізм в 5'UTR;
- HinfI-поліморфізм у промоторному фрагменті гену.

Mx-ген (*Mx*) – транзиція гуаніну в аденін у положенні 2032 (G2032A).

Для ампліфікації таргетних фрагментів обраних генів застосовували відповідні праймери (табл. 2.1.).

Таблиця 2.1

Нуклеотидні послідовності праймерів (поліморфізм QTL)

Локус	Нуклеотидна послідовність
<i>PRL</i> (24 indel)	tttaatattggtgggtgaagagaca; atgccactgatcctcgaaaactc [302]
<i>PRL</i> (C-2402T)	agaggcagcccaggcattttac; cctgggtctggtttgaaattg [316]
<i>GH</i> (1 інтрон)	atccccaggcaaacatcctc; cctcgacatccagctcacat [237]
<i>GH</i> (4 інтрон)	ctaaaggacctggaagaaggg; aactgtcgtaggtgggtctg [234]
<i>PIT-1</i> (57 indel)	gtcaaggcaaatattctgtacc; tgcattgtaattggctctg [359]
<i>TGF-$\beta 1$</i>	ggggtcttcaagctgagcgt; ttggcaatgctctgcatgctc [376]
<i>TGF-$\beta 2$</i>	gccataggttcagtgcaag; tgacagaagctctcaagcc [376]
<i>TGF-$\beta 3$</i>	tcagggcaggtagagggtgt; gccactggcaggattctcac [376]
<i>IGF-I</i> (5'UTR)	gactatacagaaagaaccac; tactactcaagtggctcaagt [283]
<i>IGF-I</i> (промотор)	cattgcgcaggctctatctg; tcaagagaagccctca [276]
<i>GHR</i> (2 інтрон)	ggctctccatgggtattagga; gctggtgaaccaatctcggtt [234]
<i>GHR</i> (5 інтрон)	acgaaaagtgttccagtgtga; ttatcccgtgttctcttgaca [263]
<i>PRLR</i> (5 екзон)	ttgtctgctttgattcatttcc; tgcatttcattcttccctttt [326]
<i>Mx</i> (G2032A)	cttcagcctgttttctcctttaggaa; cagaggaatctgattgctcaggcgtgta [344]
<i>CHD</i>	ctcccaaggatgagraaytg; tctgcatcgctaaatccttt [220]

Ампліфікований фрагмент гену *CHD* використовували в якості модельного об'єкту при проведенні досліджень з оптимізації ДНК-типування.

Ампліфікацію здійснювали за відповідними для кожного локусу програмами: 1 цикл – денатурація 94 °С 3 хв; 35 циклів – денатурація 94 °С 45 с, відпал 45 с (54 °С – для 24 indel; 62 °С – для *C-2402T*; 55 °С – для *GH*, перший інтрон; 61 °С – для *GH*, четвертий інтрон; 58 °С – для *PIT-1*; 65 °С – для *TGF-β1*; 52 °С – для *TGF-β2*; 64 °С для *TGF-β3*; 53 °С для *IGF-I*, 5'UTR; 55 °С для *IGF-I*, промотор; 60 °С – для *GHR*, другий інтрон; 56 °С – для *GHR*, п'ятий інтрон; 59 °С – для *PRLR*; 60 °С – для *Mx*-гену), елонгація 72 °С 45 с; 1 цикл – фінальна елонгація 72 °С 10 хв. Об'єм кінцевої суміші становив 20 μL, концентрація праймерів – 0,2 μM у кожному випадку.

При типуванні за мікросателітними маркерами використовували два набори олігонуклеотидів. У першому випадку застосовували мікросателіти, які рекомендовані ISAG-FAO для типування птиці (курей). Нуклеотидна структура праймерів представлено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Нуклеотидні послідовності праймерів для мікросателітних локусів

Локус	Послідовність	Розмір алелів, п.н.
MCW0081 ⁵	gttgctgagagcctggtgcag; cctgtatgtggaattacttctc	112–135
MCW0034 ²	tgccttccaattacattcatggg; tgcacgcactacatacttagaga	212–246
LEI0192 ⁶	tgccagagcttcagtctgt; gtcattactgttatgtttattgc	244–370
MCW0104 ¹³	tagcacaactcaagctgtgag; agacttgcacagctgtgacc	190–234
ADL0268 ¹	ctccaccctctcagaacta; caacttcccatctacctact	102–116
LEI0166 ³	tatcccctggctgggagttt; ctctgccttagctacgca	248–364
ADL0278 ⁸	ccagcagtctaccttctat; tgcatccaagaacagtgtg	114–126
LEI0094 ⁴	gatctcaccagtatgagctgc; tctcacactgtaacacagtgc	247–287
MCW0330 ¹⁷	tggacctcatcagtctgacag; aatgttctcatagagttcctgc	256–300
MCW0123 ¹⁴	ссactаgааааgаасатсctc; ggctgatgтааgаagggatga	76–100

Примітка: надрядкове число після назви локусу вказує на номер хромосоми

У наведеній таблиці просумовано дані з нуклеотидної структури, номеру хромосоми, на якій міститься мікросателітний локус та межі значень розмірів відповідних алелів згідно з літературними даними [181]. Температура відпалу для кожного локусу становила 60 °С.

У другому випадку виконували аналіз мікросателітної мінливості за сукупністю локусів, пов'язаних (група зчеплення) з показниками стійкості до хвороби Марека згідно з джерелами літератури [197, 402]. Кожен із локусів розміщений у другій хромосомі. Температура відпалу становила 52 °С – для локусів MCW0245 та MCW0282; 56 °С – для MCW0257 та 59 °С для MCW0288.

Ампліфікацію мікросателітних локусів проводили за використання відповідної програми: 1 цикл – денатурація 94 °С 3 хв; 35 циклів – денатурація 94 °С 45 с, відпал 45 с (температура залежно від локусу), елонгація 72 °С 45 с; 1 цикл – фінальна елонгація 72 °С 10 хв. Об'єм кінцевої суміші становив 20 μ L, концентрація праймерів – 0,2 мкМ/ μ M (для єдинообразия) у кожному випадку.

Нуклеотидні послідовності праймерів для відповідних локусів приведено у табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Нуклеотидні послідовності праймерів для мікросателітних локусів, що є асоційованими з резистентністю до хвороби Марека

Локус	Послідовність	Розмір алелів, п.н.
MCW0257	agtccatcatcagatgcttgс; tcttgagtгattctgtagagg	290–301
MCW0288	gatctgcttctctgccccatg; ggtactgtcaccagaatgagc	117–122
MCW0245	gatctgtgctgaacacagcag; atctatggccacctcaaactg	290–293
MCW0282	gatcctaaggттtactacag; agtatttсactagtgaactacc	290–308

Проведення рестрикції ампліфікованих фрагментів. Обробку ампліфікованих фрагментів здійснювали відповідними ендонуклеазами рестрикції згідно з стандартними методиками фірми виробника (Thermo Scientific).

Перелік та характеристику використаних ендонуклеаз рестрикції наведено у табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Характеристика використаних ендонуклеаз рестрикції

№	Ендонуклеаза рестрикції	Сайт рестрикції
1	<i>MspI</i>	C↓CGG
2	<i>SacI</i>	GAGCT↓C
3	<i>PstI</i>	CTGCA↓G
4	<i>NspI</i>	RCATG↓Y
5	<i>AluI</i>	AG↓CT
6	<i>BamHI</i>	G↓GATCC
7	<i>RsaI</i>	GT↓AC
8	<i>BstI</i>	CCNNNNN↓NNGG
9	<i>MboII</i>	GAAGA(N) ₈ ↓

Проведення електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації/рестрикції. Продукти ампліфікації/рестрикції розділяли в агарозних гелях різних концентрацій (1–3 %), а також у поліакриламідних гелях різних концентрацій (4–12 %) як нативних, так і денатуруючих. Фарбування гелів здійснювали за використання бромистого етидію або нітрату срібла [403]. Розмір ампліфікованих/рестрикційних фрагментів визначали за використання маркерів молекулярних мас М-10, М-12, М-20, М-50, М-100 (Ізоген, Російська Федерація).

2.4 Методи статистичної обробки результатів досліджень

Популяційно-генетичні дослідження.

Частоти зустрічальності генотипів визначали за формулою 2.1:

$$P_{AA} = \frac{n_{AA}}{N} \quad (2.1)$$

де P_{AA} – частота відповідного генотипу; n_{AA} – кількість особин з відповідним генотипом; N – загальна кількість особин (об'єм вибірки).

2. Частоту алелів поліморфних локусів визначали за формулами максимальної правдоподібності 2.2 та 2.3:

$$P_A = \frac{2n_{AA} + n_{AB}}{2N} \quad (2.2)$$

$$P_B = \frac{2n_{BB} + n_{AB}}{2N} \quad (2.3)$$

де: P_A, P_B – частоти відповідних алелів n_{AA}, n_{BB} – кількість гомозиготних особин; n_{AB} – кількість гетерозиготних особин; $2N$ – кількість алелів (подвоєна кількість особин у дослідній групі) [40].

Помилку частот генотипів оцінювали за формулою 2.4:

$$S_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}} \quad (2.4)$$

де p – частота генотипу; N – об'єм вибірки.

Помилку частот алелів виявляли за формулою 2.5:

$$S_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{2N}} \quad (2.5)$$

де p – частота алеля; N – об'єм вибірки.

Вірогідність показників частот алелів та довірчий інтервал їх варіювання визначали за використання стандартної похибки середньої арифметичної та t -критерію [40]. Відмінності вважали статистично вірогідними при $p < 0,05$.

Генетичну рівновагу встановлювали за формулою Харді-Вайнберга (2.6):

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad (2.6)$$

де p і q – частоти відповідних алелів.

Рівень генетичної рівноваги у розподілі генотипів у групах визначали за критерієм відповідності χ^2 за формулою (2.7):

$$\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E \quad (2.7)$$

де O – фактично виявлена кількість особин відповідного генотипу; E – очікувана кількість особин відповідного генотипу.

Рівень фактичної гетерозиготності (H_o) у відсотках вивчали за формулою 2.8:

$$H_o = \frac{\sum h}{n \cdot N} \cdot 100 \quad (2.8)$$

де $\sum h$ – сума гетерозигот за всіма вивченими локусами; N – кількість протестованих особин у групі; n – кількість локусів, за якими проводиться облік.

Рівень очікуваної гетерозиготності (H_e) виявляли за формулою 2.9:

$$H_e = 2pq \quad (2.9)$$

Коефіцієнти статистик Райту за формулами 2.10, 2.11 і 2.12:

$$F_{is} = \frac{H_s - H_i}{H_s} \quad (2.10)$$

$$F_{st} = \frac{H_t - H_s}{H_t} \quad (2.11)$$

$$F_{it} = \frac{H_t - H_i}{H_t} \quad (2.12)$$

де F_{is} – коефіцієнт інбридингу особин у субпопуляції; F_{st} – коефіцієнт інбридингу субпопуляції відносно всієї загальної популяції; F_{it} – коефіцієнт інбридингу особин у популяції як в цілому; H_i – фактична гетерозиготність у субпопуляціях; H_s – очікувана гетерозиготність у субпопуляціях за умов панміксії (випадковий характер схрещування); H_t – очікувана гетерозиготність в усій популяції за умов панміксії [404].

Ступінь дивергенції між популяціями розраховували за значенням коефіцієнту F_{st} , приймаючи до уваги наступні положення: значення F_{st} 0,00–0,05 – слабка дивергенція; 0,06–0,15 – середня; 0,16–0,25 – велика; $>0,25$ – дуже значний рівень дивергенції [405].

Генетичні дистанції оцінювали за формулами Nei [406]. Генетичну подібність (I) визначали за формулою 2.13:

$$I = \frac{I_{ab}}{\sqrt{I_a \times I_b}} \quad (2.13)$$

$$\text{де } I_{ab} = \sum a_i b_i; \quad I_a = \sum a_i^2.$$

Генетичні дистанції (D) розраховували за формулою 2.14:

$$D = -LnI \quad (2.14)$$

Побудову філогенетичних дерев проводили за допомогою пакетів комп'ютерних програм PHILIP 3.69 (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip/getme-new1.html>) та MEGA 7 (https://www.megasoftware.net/download_form).

Частоти гаплотипів визначали шляхом розрахунку EM-алгоритму за використання програми EH+ [407].

Рівень відхилення за зчепленням від рівноважного стану встановували за формулою 2.15:

$$D_{AB} = p_{AB} - p_A p_B \quad (2.15)$$

де D – коефіцієнт нерівноваги за зчепленням;

p_{AB} – частота гаплотипу AB;

p_A – частота алеля A;

p_B – частота алеля B.

При цьому:

$$D = (p_{AB})(p_{ab}) - (p_{Ab})(p_{aB})$$

Якщо $D = 0$, то локуси знаходяться у стані генетичної рівноваги (за зчепленням).

Якщо $D \neq 0$, то локуси знаходяться у стані відхилення від генетичної рівноваги (за зчепленням).

Для розрахунку стандартизованої міри відхилення за зчепленням від рівноважного стану у випадку двох локусів, кожен з яких представляє систему з двох алелів (D'), використовували формулу 2.16 [408, 409]:

$$D' = \frac{D}{D_{max}} \quad (2.16)$$

де D' – стандартизоване значення міри нерівноваги за зчепленням (D);

D – ступінь нерівноваги за зчепленням;

D_{max} – максимальне значення, яке може приймати параметр D при заданих значеннях частот алелів p_1, q_1, p_2, q_2 .

Якщо $D > 0$, то

$$D_{max} = \min(p_1q_2, q_1p_2).$$

Якщо $D < 0$, то

$$D_{max} = \min(p_1p_2, q_1q_2),$$

При цьому p_1 – частота алеля А локусу 1; q_1 – частота алеля а локусу 1; p_2 – частота алеля В локусу 2; q_2 – частота алеля в локусу 2.

Розрахунки проводили за використання програми 2LD [410].

На основі отриманих даних розраховували значення показників з використанням комп'ютерної програми Popgen32 (https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html).

Обробку результатів секвенування, аналіз хроматограм, проведення вирівнювання нуклеотидних послідовностей, побудування рестрикційних мап та підбір праймерів виконували за допомогою відповідного програмного забезпечення: BioEdit version 7.1.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html#downloads>); Unipro UGENE version 1.14.0 (<http://ugene.net/ru/download.html>); BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>); DNA Baser 4 version 4.16.0.25 (<http://www.dnabaser.com/download/DNA-Baser-sequence-assembler/>) та FastPCR 6.5 (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>).

Статистичний аналіз зв'язку різних генотипів з господарсько-корисними ознаками. У дисертаційній роботі досліджували наступні показники продуктивності курей: En_{12} (Egg number) – кількість яєць за 12 тижнів

несучості; $E_{n_{40}}$ – кількість яєць за 40 тижнів несучості; $E_{w_{30}}$ (Egg weight) – маса яйця на 30-й тиждень життя; $E_{w_{52}}$ – маса яйця на 52-й тиждень життя; жива маса; маса тушки, грудних м'язів, м'язів стегна, м'язів гомілки, маса печінки, серця, м'язового шлунку [411, 412]. Зв'язок різних алельних варіантів та генотипів за кожним з виявлених поліморфних локусів з величинами показників продуктивності курей аналізували шляхом порівняння середніх значень за різними генотипами за використання t-критерію Стьюдента [40, 413]. Для обґрунтування вибору статистичного критерію під час порівняння середніх першочергово проводили перевірку розподілу даних вибірки на нормальність за критерієм Колмогорова-Смирнова (у випадку нормального розподілу застосовували t-критерій). Якщо розподіл даних достовірно відрізнявся від нормального, користувались непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні [414]. Дані обробляли, застосовуючи програми Statistica 8.0 (StatSoft) (<http://statsoft.ru>) та Excel 2010 (Microsoft).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕХНІКИ ДНК-ТИПУВАННЯ

Ефективність визначення генетичної структури популяції безпосередньо визначається точністю генотипування особин за обраними маркерними системами. Різні помилки, допущені на етапі генотипування, можуть призвести до істотних викривлень генетико-популяційних параметрів внаслідок неспівпадання оцінок при ідентифікації алелів і генотипів, та, відповідно, до невірних інтерпретацій у питаннях контролю походження тварин, труднощів у оцінюванні параметрів селекційної роботи, що проводиться тощо. У зв'язку з цим актуальним є вивчення питань стосовно впливу цілого ряду чинників на ефективність генотипування. Не дивлячись на загальну стандартизацію умов проведення типування особин за використання різних класів молекулярно-генетичних маркерів (стандартні методи виділення ДНК, ампліфікації, рестрикції, електрофорезу тощо), існує достатньо висока вірогідність утворення артефактних продуктів в процесі ампліфікації (рестрикції) обраних фрагментів геному. Артефакти проявляються як утворення на електрофореграмах додаткових, тобто ти, що не відповідають цільовим, фрагментів ДНК, наявність яких може призводити до помилок при генотипуванні особин (як наприклад, збільшується ризик плутанини гомозиготних особин з гетерозиготними, що, в свою чергу, призводить до невірної оцінки рівня гетерозиготності зі всіма наслідками, що випливають). Подібне явище особливо широко розповсюджено при проведенні мікросателітного аналізу, що безпосередньо пов'язано з особливостями цього типу молекулярно-генетичних маркерів, про що свідчить детальний аналіз фотографій електрофореграм. Багато із перерахованих артефактів виникають і при генотипуванні за іншими типами ДНК-маркерів (PCR-RFLP, Indel тощо). У цьому розділі дисертаційної роботи акцентували увагу на питаннях оптимізації техніки ДНК-типування за умов використання молекулярно-генетичних маркерів типу SSR та Indel.

3.1 Аналіз конформаційних артефактів ПЛР при вивченні мікросателітної мінливості

Проблема утворення артефактів при проведенні ампліфікації достатньо широко розповсюджена та залежить як від типу застосованих молекулярно-генетичних маркерів, так і від параметрів проведення ПЛР. До найбільш широко розповсюджених артефактів ПЛР при проведенні SSR-аналізу відносяться нуль-алелі, недостатня ампліфікація одного із алелів у випадку гетерозиготних зразків, статери, додавання аденіну до 3' кінця ланцюгу ДНК (особливість Таq-полімерази). У контексті дисертаційної роботи акцентували увагу на утворенні специфічних артефактів ПЛР, які не належать до переліку загальноживаних, однак, на власну думку, значною мірою знижують ефективність генотипування особин. У цьому випадку мова йде про гетеродуплексну ДНК, а також про нелінійну гомодуплексну ДНК.

Оптимізація методики ДНК-типування особин за мікросателітними маркерами проведена на прикладі динуклеотидних тандемних повторів локусів MSW0104 та LEI0094 відповідно.

Для досягнення поставлених задач дослідження були розділені на декілька послідовних етапів. На першому етапі нами була проведена ампліфікація різних зразків за сукупністю мікросателітних локусів (динуклеотидних). Продукти ампліфікації розділяли у нативних поліакриламідних гелях різних концентрацій залежно від дослідного локусу. За результатами досліджень представлено утворення значної кількості різних артефактів гомо(гетеро)дуплексної природи в процесі ПЛР за локусами MSW0104, LEI0094, MSW0123, MSW0245, MSW0034.

Також це явище було підтверджено дослідженнями не тільки на птиці, але й на великій рогатій худобі – маркери RM185 та BM027 (рис. 3.1), що вказує на універсальну природу дослідженого явища, а не на його високоспецифічний (притаманний тільки птиці) характер.

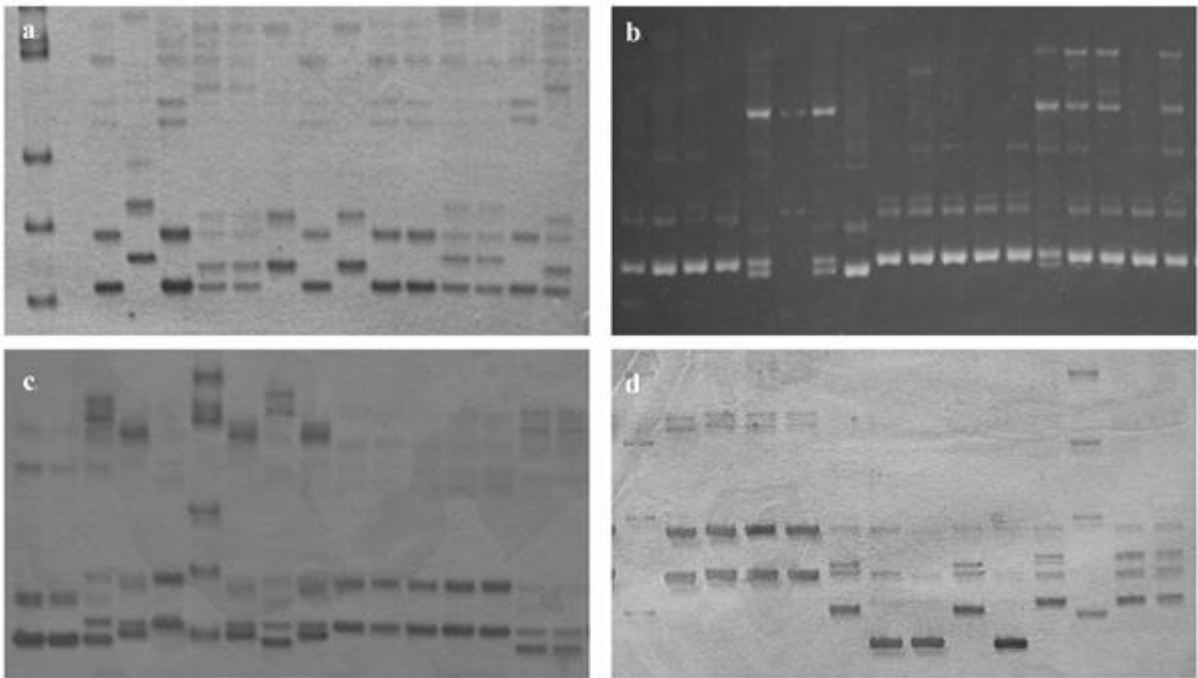


Рис. 3.1 Електрофореграми продуктів ампліфікації різних мікросателітних локусів.

Примітка: a – LEI0094; b – BM027; c – MCW0123; d – MCW0104. a, c, d – забарвлення нітратом срібла; b – забарвлення бромідом етидію.

У кожному випадку при ампліфікації як нативних ДНК-мішеней, так і виділених із гелю окремих цільових фрагментів, після проведення електрофорезу в нативних гелях спостерігали утворення додаткових фрагментів, що суттєво ускладнювало генотипування особин. Ігнорування питання про утворення артефактів у процесі ПЛР могло призвести до невірних висновків та помилок у генетико-популяційному аналізі дослідних груп тварин (у першу чергу за рахунок помилкового збільшення кількості гетерозиготних особин у дослідній популяції).

Як видно на представлених електрофореграмах, при ампліфікації мікросателітних локусів спостерігається достатньо значна кількість додаткових фрагментів (артефактів). У цьому випадку, якщо додаткові фрагменти локалізовано поруч з цільовими, виникають труднощі в точному генотипуванні, тобто часто неможливо відрізнити цільовий фрагмент від артефакту. На

електрофореграмі у наявності більше двох фрагментів практично у кожному із зразків, при цьому варто звернути увагу на наявність трьох та чотирьох алелів у однієї особини, що істотно не різняться за інтенсивністю свічення (кожний із яких відповідає певному фрагменту на електрофореграмі). У окремих випадках у диплоїдних організмів кількість алелів на локус може бути більше двох, як, наприклад, при дуплікації генів тощо. Однак це явище (наявність додаткових фрагментів на електрофореграмах) настільки широко розповсюджене, що пояснити його дуплікацією фрагментів геномної ДНК не представляється можливим.

Чинником виникнення додаткових фрагментів можуть бути гетеродуплекси різних типів (у випадку гетерозиготних зразків), котрі, як наслідок різниці в електрофоретичній рухливості, визначаються як окремі алелі. Для перевірки цього припущення (щоб відрізнити артефактні фрагменти від цільових) були проведені дослідження з вирізання із гелю та наступної ампліфікації фрагментів ДНК (як цільових, так і артефактів). Вирізання фрагментів ДНК із гелю дає змогу використовувати максимально очищені від домішок цільові ділянки ДНК. Також, паралельно дослідним зразкам (батьківські форми), були проаналізовані за локусами MCW0104 та LEI0094 їх нащадки (F1).

На рисунку 3.2 наведена електрофореграма продуктів ампліфікації локусу MCW0104 батьків (самець та самиця), їх нащадків (F1), а також вирізаних фрагментів (як цільових, так і додаткових).

Як видно із представленої електрофореграми, мають місце певні труднощі у генотипуванні кожної із особин. Зокрема, нащадок № 2 (зразок 4) однозначно визначається як гетерозигота, зразки № 1 та 2 вказують на наявність більше двох алелів у диплоїдному організмі, що, якнайменше, потребує особливої уваги. Однак результати ампліфікації кожного із вирізаних фрагментів докорінно змінюють ситуацію в цілому. Так, при ампліфікації вирізаного нижнього фрагменту самця утворюється тільки цільовий фрагмент (зразок 7).

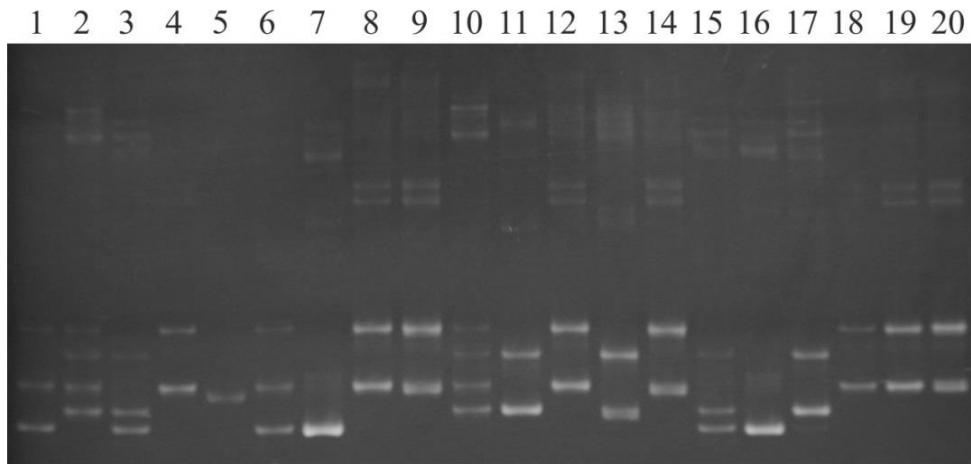


Рис. 3.2 Електрофореграма продуктів ампліфікації мікросателітного локусу MCW0104.

Примітка: 1 – самець; 2 – самиця; 3 – нащадок 1; 4 – нащадок 2; 5 – маркер М-200 (фрагмент 200 п.н.); 6 – самець; 7 – ампліфікат від вирізаного нижнього (№1) фрагменту самця; 8 – ампліфікат від вирізаного середнього (№2) фрагменту самця; 9 – ампліфікат від вирізаного верхнього (№3) фрагменту самця; 10 – самиця; 11 – ампліфікат від вирізаного нижнього (№1) фрагменту самиці; 12 – ампліфікат від вирізаного середнього (№2) фрагменту самиці; 13 – ампліфікат від вирізаного середнього (№3) фрагменту самиці; 14 – ампліфікат від вирізаного верхнього (№4) фрагменту самиці; 15 – нащадок 1; 16 – ампліфікат від вирізаного нижнього (№1) фрагменту нащадку 1; 17 – ампліфікат від вирізаного верхнього (№2) фрагменту нащадку 1; 18 – нащадок 2; 19 – ампліфікат від вирізаного нижнього (№1) фрагменту нащадку 2; 20 ампліфікат від вирізаного верхнього (№2) фрагменту нащадку 2.

Однак, при ампліфікації середнього та верхнього фрагментів, утворюються обидва у кожному випадку (зразки 8 та 9). Аналогічним чином й у випадку із самицею (у наявності 4 фрагменти) – ампліфікація нижнього фрагменту (№ 1) дає як результат фрагмент № 1 та 3 (зразок 11), ампліфікація другого фрагменту – № 2 та 4 (зразок 12); третього – № 3 та 1 (зразок 13); четвертого – № 4 та 2 (зразок 14).

Таким чином, можна зробити висновок, що кількість фрагментів у зразках визначається сумою цільових фрагментів та утворених ними артефактів.

Отримані результати свідчать про необхідність вивчення природи додаткових фрагментів (артефактів), що виникають на етапі ампліфікації, та ускладнюють процедуру ефективного генотипування особин.

Початкове припущення про те, що ці артефакти відносяться до типу гетеродуплексної ДНК, не відповідає дійсності. Гетеродуплекси – гібридні молекули двуланцюгової ДНК, кожний із ланцюгів якої має різне походження. Тому, додатковий фрагмент, що виникає при ампліфікації вирізаного із гелю цільового фрагменту, не може відноситися до типу гетеродуплексної ДНК, так як у зразку відсутні різні алелі. Однак практично у кожному випадку отримуємо декілька (два) фрагментів після ампліфікації. Для пояснення цього феномену припускаємо утворення у пробах у процесі ПЛР особливого типу гомодуплексної ДНК, в якій ланцюги комплементарні один одному не на всьому протязі (не лінійно), при цьому ділянки, що утворені мікросателітними повторами кожного із ланцюгів, утворюють петлеву структуру, стабілізовану взаємодією нуклеотидних основ у межах кожного з ланцюгів (рис. 3.3).

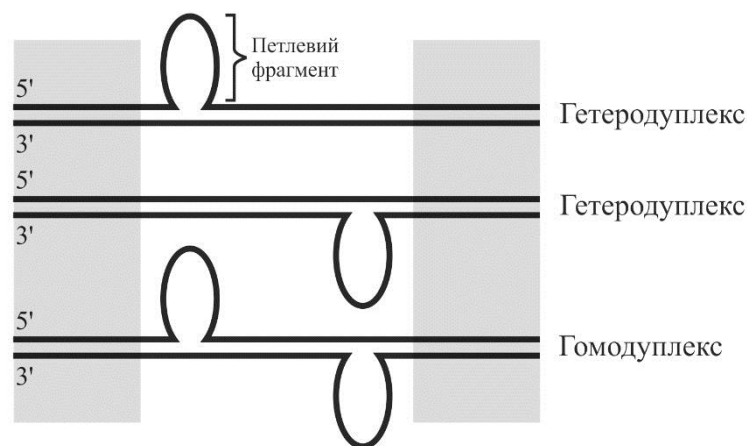


Рис. 3.3 Схематичне зображення різних типів гетеродуплексної та гомодуплексної ДНК у мікросателітних локусах.

Примітка: сірим кольором виділено фрагменти, що фланкують мікросателітні повтори (без дотримання масштабу).

На представленій схемі наведено ймовірну структуру «нелінійних» гомодуплексів (нелінійний – так як антипаралельні ланцюги компліментарні один одному не за всією довжиною молекули). У цьому типі гомодуплексів антипаралельні ланцюги комплементарні один одному у ділянках амплікону, що фланкують мікросателітні повтори, (утримуючі у собі й сайти зв'язування праймерів). У свою чергу класичні «лінійні» гомодуплекси повністю відповідають цільовим фрагментам та на схемі не вказані. Слід відмітити, що петлеві фрагменти можуть бути різного розміру та міститися у різних ділянках мікросателітного повтору, що ймовірно пов'язано зі структурою основного мотиву та загальною кількістю повторів. Гетеродуплекси, структура яких також представлена на рисунку, утворюються тільки у випадку гетерозигот, однак у цьому випадку картина ускладнюється ще й чинником наявності на електрофореграмі «нелінійних» гомодуплексів (кожний із алелів, окрім гетеродуплексної ДНК, утворює й нелінійну гомодуплексну ДНК). Однак гетеродуплексні молекули досить легко відрізнити від «нелінійних» гомодуплексів за місцем на електрофореграмі, так як їм властива набагато більш низька електрофоретична рухливість порівняно з цільовими фрагментами.

Беручи до уваги усе вищенаведене, можна пояснити, яким чином при ампліфікації одного вирізаного із гелю фрагменту утворюються два – цільовий та додатковий (артефакт) (рис. 3.1). У цьому випадку цільовим фрагментом є класичний «лінійний» гомодуплекс, в той же час як додатковим – «нелінійний» гомодуплекс. Слід відзначити, що відтворюваність «нелінійних» гомодуплексів становить 100 відсотків (в ході досліджень не зафіксовано жодного випадку їх відсутності після ампліфікації цільових фрагментів, що вивчаються).

В зазначеному випадку у локусі MCW0104 було виявлено тільки один алель, який не утворював додаткових фрагментів, як у батьків, так й у нащадків (зразки 7 та 16). При цьому цей алель містить найменшу кількість повторів (тобто характеризується мінімальною, із досліджених алелів локусу MCW0104,

довжиною амплікону), що вказує на значення кількості повторів для утворення «нелінійних» гомодуплексів.

Не беручи до уваги те, що виникнення в процесі ампліфікації цільових фрагментів гетеродуплексної ДНК (у випадку гетерозиготних зразків) це широко розповсюджений феномен, характерний для багатьох типів молекулярно-генетичних маркерів (PCR-RFLP, Indel, SSR), утворення «нелінійних» гомодуплексів – особливість саме мікросателітних локусів. Наявність коротких (2–6 п.н.) фрагментів, що повторюються, призводить до можливості утворення достатньо стабільної, відтворюваної вторинної структури з деякими самокомплементарними ділянками ДНК у вигляді петлевих структур.

Аналогічні дослідження були проведені й на прикладі локусу LEI0094 (рис. 3.4).

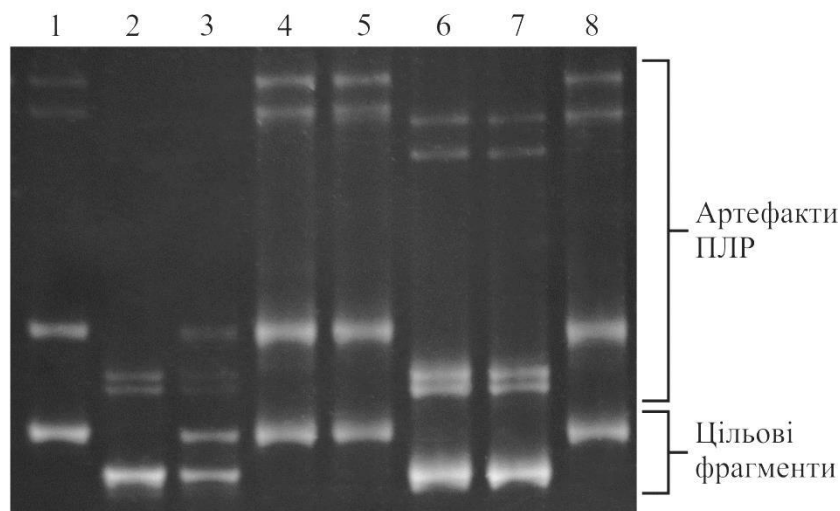


Рис. 3.4 Електрофореграма продуктів ампліфікації LEI0094.

Примітка: 1 – самець; 2 – самиця; 3 – нащадок; 4 – ампліфікат від вирізаного нижнього фрагменту самця; 5 – ампліфікат від вирізаного верхнього фрагменту самця; 6 – ампліфікат від вирізаного нижнього фрагменту самиці; 7 – ампліфікат від вирізаного верхнього фрагменту самиці; 8 – ампліфікат від вирізаного верхнього фрагменту нащадку.

Результати досліджень за локусом LEI0094 свідчать про подібну з MSW0104 картину. Генотипування особин досить ускладнено. Зокрема, зразок 1 на рис. 3.4 на перший погляд відповідає гетерозиготній особині, однак, як було з'ясовано в ході досліджень, це гомозиготний зразок. Верхній фрагмент – це артефакт (зразок 4 та 5). Подібним чином другий із батьків (зразок 2) – гомозиготний зразок, так як додаткові фрагменти ні що інше, як артефакти ампліфікації цільового фрагменту (зразки 6 та 7). Результати досліджень підтверджує також той факт, що всі особини покоління F1 виявились гетерозиготними, що може бути тільки при схрещуванні різних батьківських гомозигот. Отже, генотип потомства (зразок 3) представляє собою комбінацію цільових (що й слід було очікувати) й додаткових фрагментів (артефактів) батьків.

Слід відмітити, що у випадку з гетерозиготними особинами, картина виглядає дещо більш заплутаною. Так, при аналізі гетерозиготних генотипів, кожний із вирізаних із гелю цільових фрагментів після ампліфікації давав як цільовий, так й додатковий (нелінійну гомодуплексну ДНК). Однак, в результаті вирізання із гелю фрагмента ДНК, що відповідає гетеродуплексній молекулі, яка утворюється при взаємодії антипаралельних ланцюгів різних за нуклеотидною структурою мікросателітних алелів, після проведення ампліфікації утворювалися практично всі можливі варіанти – обидва цільові фрагменти, нелінійна гомодуплексна ДНК від кожного із алелів, та, відповідно, гетеродуплексна ДНК. Поява доволі суттєвого спектру фрагментів (полос) на електрофореграмах значно ускладнює генотипування та вказує на наявність двох типів гетеродуплексів, що утворюються в процесі ПЛР.

У першому випадку смисловий ланцюг від першого (умовно) цільового фрагменту, антисмисловий від другого. У другому – смисловий ланцюг від другого фрагменту, в той час як антисмисловий – від першого. Кожний із ланцюгів гетеродуплексної молекули пов'язаний зі своїм комплементарним ланцюгом уотсон-кріківськими взаємодіями за винятком некомплементарних ділянок. На цій ділянці некомплементарний фрагмент ланцюгу формує так

звану петлеву структуру (loop), що змінює конформацію двуланцюгової молекули ДНК в цілому, що, в свою чергу, відображається на її електрофоретичній рухливості, яка призводить до виникнення додаткових фрагментів на електрофореграмі (рис. 3.4). Відмінності в структурі гетеродуплексів полягають у розмірі петлі (loop), розміри петлевої ділянки варіюють залежно від різниці у довжині алелів.

Факт широкого розповсюдження феномену утворення артефактів при типуванні за значною кількістю мікросателітних локусів приводить до наступної задачі досліджень – довести, що безпосереднім джерелом утворення артефактів є конформаційні взаємодії ланцюгів ДНК, а не різні помилки ДНК-полімерази в процесі ампліфікації таргетних фрагментів геному.

Як відомо, використання нативних поліакриламідних гелів дає змогу розділяти молекули за розміром, однак на електрофоретичну рухливість фрагментів, що розділяються, також впливає й конформаційна структура. Для подолання цього ефекту широко застосовують денатуруючі умови електрофорезу в гелі. За умов використання денатуруючого поліакриламідного гелю молекули ДНК розділяються тільки залежно від їх розміру (кількості пар нуклеотидів), конформаційні ефекти зведені до мінімуму. Виходячи із вищенаведеного, в подальшому було поставлено дослід з метою перевірки роздільної здатності денатуруючого поліакриламідного гелю на прикладі ампліфікованих фрагментів з вираженим конформаційним поліморфізмом у нативних умовах.

На рисунку 3.5 представлено фото електрофореграм нативного та, повністю продубльованого за зразками, денатуруючого гелів.

Аналіз наведених електрофореграм свідчить про зникнення додаткових фрагментів у випадку з денатуруючим поліакриламідним гелем. Це доводить, що їх природа пов'язана із конформаційними взаємодіями (розподіл ампліфікованих фрагментів ДНК, відбувається тільки за рахунок різниці у первинній структурі молекули – кількості пар нуклеотидів, що варіює у випадку з різними алелями).

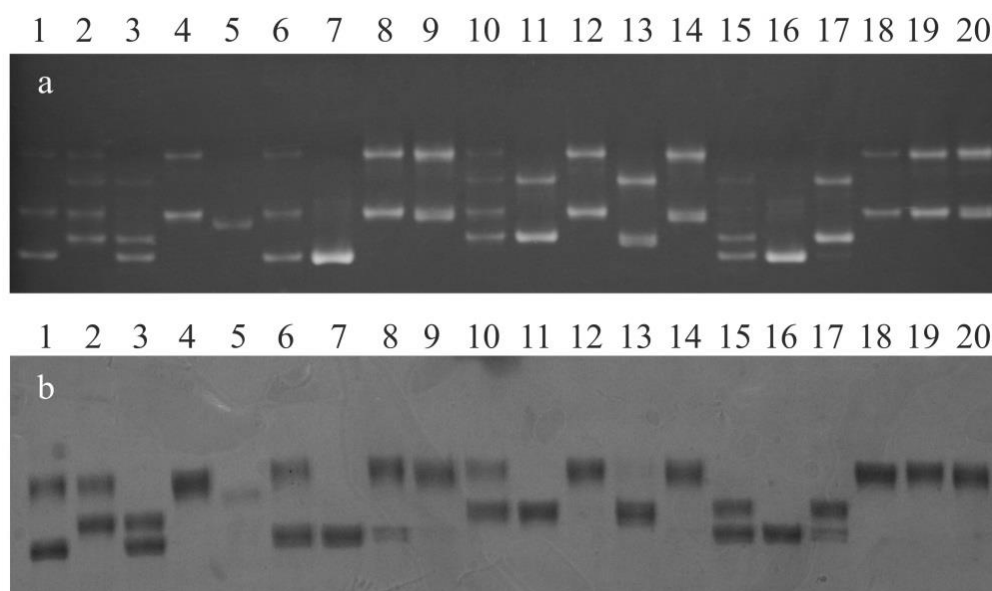


Рис. 3.5 Порівняння нативного (а) та денатуруючого (b) ПААГ.

Примітка: 1–20 – номери зразків; 1–4, 6, 10, 15, 18 – нативні зразки; 7–9, 11–14, 16, 17, 19, 20 – ампліфікат від виділених цільових фрагментів, що відповідають нативним зразкам; 5 – маркер молекулярних мас М-200 (фрагмент 200 п.н.). Гель а пофарбовано бромідом етидію, гель b – нітратом срібла.

Переконливі висновки, що отримані за результатами описаних експериментів, можуть навести на думку, що широке використання денатуруючих гелів замість нативних може повністю вирішити проблему з ефективністю генотипувань за мікросателітними маркерами. Такий висновок є цілком логічним, однак він має ряд недоліків. Так, наприклад, до недоліків використання денатуруючих гелів відноситься необхідність (про яку, проте, досить часто забувають) підтримання постійної температури (як правило, 50 – 60 °С) протягом всього електрофорезу. У випадку недотримання цієї вимоги, повністю денатуруючі умови не будуть досягнуті, незважаючи на весь спектр використаних денатуруючих реагентів, що відображено на рис. 3.6.

Як видно на представлених електрофореграмах, недостатньо висока температура (до 50 °С) не дає змоги позбавитися від конформаційних артефактів. Тому, для проведення ефективних генотипувань у денатуруючих

поліакриламідних гелях, необхідно використання електрофоретичних камер з можливістю рециркуляції буферу (що забезпечує підтримання визначеного температурного режиму), які мають далеко не в усі спеціалізовані лабораторії.

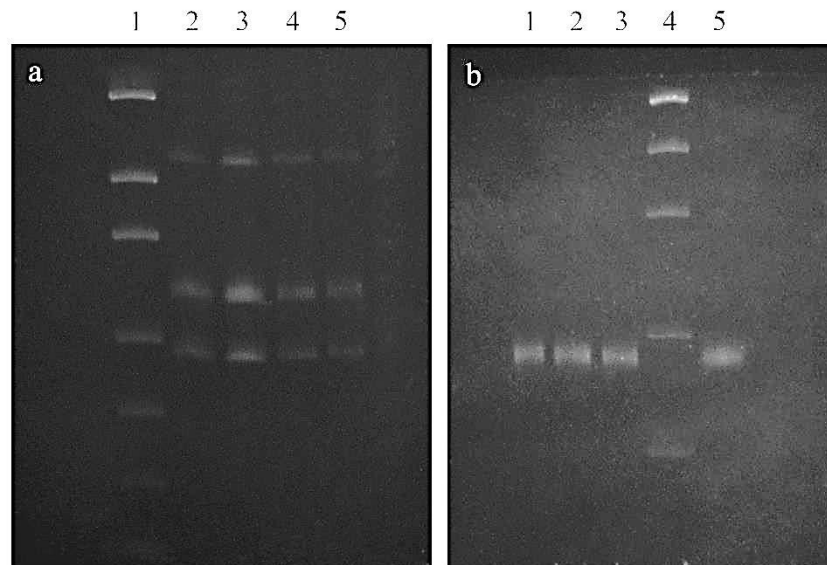


Рис. 3.6 Електрофорез у денатуруючому 7 % ПААГ (8 % сечовина, формамід).

Примітка: а – температура гелю становить 25 °С; б – температура гелю становить 55 °С. 1 – 5 – номери зразків.

При ігноруванні цієї умови не буде досягнуто необхідних параметрів гелю, що сприятимуть повному забезпеченню денатуруючих умов проведення електрофорезу, що, у свою чергу, призведе до появи конформаційних химерних молекул (нелінійної гомодуплексної ДНК) та, відповідно, до помилок генотипування (рис. 3.6). Необхідно також відмітити, що комбінація таких чинників, як висока температура та висока концентрація сечовини в гелі (7–8 М) істотно ускладнює процедуру внесення проб у гель, а також збільшує дифузію ампліфікованих фрагментів. Це є вираженим недоліком для ідентифікації алелів, які різняться на декілька пар основ. Застосування більш концентрованих гелів для посилення розподільчої здатності також є недостатньо ефективним у зв'язку зі збільшенням часу проведення

електрофорезу (посилення дифузії із збільшенням часу прогонки та необхідністю використання збільшених параметрів електричного поля). У зв'язку з цим, повсюдне використання електрофорезу в денатуруючому ПААГ не є панацеєю, а навпаки, найчастіше слугує джерелом значної кількості помилок.

На наступному етапі досліджень була поставлена задача продемонструвати той факт, що джерело утворення нелінійної гомодуплексної ДНК – безпосередня, специфічна взаємодія ланцюгів у двуланцюговій молекулі, а не результат помилок ДНК-полімерази в процесі ампліфікації при проведенні ПЛР. З цією метою були проведені експерименти щодо відтворення артефактів без проведення ПЛР за використання як модельного об'єкту локусу MSW0034. Для цього, після проведення ампліфікації, були вирізані із гелю фрагменти А та В (рис. 3.7) для подальшого виділення ДНК.

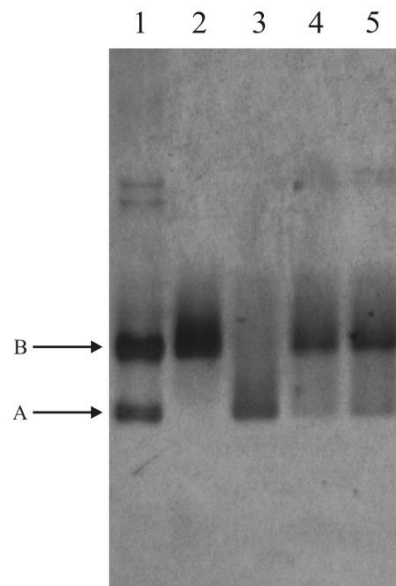


Рис. 3.7 Електрофореграма цільових продуктів ампліфікації та нелінійної гомодуплексної ДНК.

Примітка: 1 – вихідна ампліфікована послідовність; 2 – виділений із гелю фрагмент А (нативний); 3 – виділений із гелю фрагмент В (нативний); 4 – фрагмент А, який було піддано циклу денатурація/ренатурація; 5 – фрагмент В, який було піддано циклу денатурація/ренатурація.

Одна частина (фрагменти А та В) була підготовлена для проведення електрофорезу без змін (зразки 2 та 3), іншу піддали денатурації при 94 °С протягом 5 хв. з подальшим термостатуванням за умов кімнатної температури протягом 20 хв (зразки 4 та 5). Цієї процедури достатньо для забезпечення зворотної денатурації виділеної із гелю ДНК та подальшої гібридизації комплементарних ланцюгів один з одним. Далі всі проби переносилися на електрофорез (нативний ПААГ).

Як видно на електрофореграмі, зразки 2 та 3 представлені у вигляді лише одного цільового фрагменту (А або В). Проведення циклу денатурації/ренатурації привело до появи двох фрагментів (А та В) у зразках 4 та 5. Той факт, що у зразках 4 та 5 у наявності два фрагменти (цільовий та додатковий), переконливо вказує на специфічну взаємодію комплементарних ланцюгів як безпосередній чинник утворення артефактів (нелінійної гомодуплексної ДНК). Так як вищенаведена процедура є, по суті, одним із етапів ПЛР (зі зміненими характеристиками тривалості кожного із процесів), то стає зрозумілим, що практично у кожному циклі ампліфікації можуть утворюватися, поряд із цільовими фрагментами, нелінійні гомодуплексні молекули.

Також, паралельно, провели секвенування вирізаних із гелю ампліфікованих фрагментів. На рисунку 3.8 представлено нуклеотидні послідовності двох вирізаних фрагментів ДНК локусу MCW0034 (фрагменти А та В рисунку 3.7).

```

A 80.....140
   GTATGACASCAATGACACACACACACACACACACACACACACACACACACAGAAAAAA
   ACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC

B 80.....140
   GTATGACASCAATGACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAGAAAAAA
   ACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC

```

Рис. 3.8 Фрагменти нуклеотидних послідовностей мікросателітного локусу MCW0034.

Примітка: А – ампліфікований вирізаний нижній фрагмент; В – ампліфікований вирізаний верхній фрагмент. Підрядковою лінією виділено динуклеотидний мотив.

На приведеному рисунку проілюстровано фрагменти локусу MCW0034, які безпосередньо утримують мікросателітний мотив, так як саме варіації у кількості елементів мотиву й визначають різницю в алелях. У цьому випадку це динуклеотидний мотив CA. Проведення процедури вирівнювання нуклеотидних фрагментів дає змогу зробити висновок про ідентичність двох досліджуваних послідовностей (кількість елементів мотиву співпадає) (рис. 3.8). Той факт, що ідентичні алелі MCW0034 дають різні фрагменти на електрофореграмі після проведення електрофорезу, переконливо доводять правильність припущення щодо виникнення в процесі ампліфікації мікросателітних локусів нелінійної гомодуплексної ДНК, як, свого роду, конформаційної химерної молекули.

Отримані результати узгоджуються з даними, отриманими іншими авторами, щодо вивчення різних конформаційних станів ДНК, що утримують тринуклеотидні повтори [415]. Мова йде про так звану Slipped-stranded DNA. За думкою окремих авторів, ці утворення виникають як результат свого роду «проковзування» (slippage) ланцюгів ДНК один відносно одного, що й призводить до утворення конформаційних химерних молекул [416]. Феномен, що описується, достатньо широко розповсюджений та, по суті, є основою, так званої, «мікросателітної нестабільності», яку пов'язують з різними генетичними захворюваннями [417]. Явище «проковзування» ДНК під час реплікації молекули призводить до утворення статерів – ампліфікованої ДНК, що утримує змінену кількість одиниць повтору мікросателітної послідовності (як інсерції, так і делеції). Це явище може мати місце й при ампліфікації мікросателітних локусів в процесі ПЛР, що призведе до виникнення додаткових фрагментів (по суті – алелів) на електрофореграмах [418]. Однак слід відзначити, що утворення статерів – процес імовірнісний та трапляється далеко не при кожній ампліфікації. В процесі вивчення генетичної структури популяції курей української селекції (4 породи за сукупністю мікросателітних локусів) ми лише один раз виявили утворення статерів при проведенні полімеразної ланцюгової реакції (локус MCW0104). Виявлений ампліфікаційний фрагмент

характеризувався слабкою інтенсивністю свічення на електрофореграмі та різнився від цільового алелю орієнтовно на 2 п.н. (делеція). Достовірність його утворення була підтверджена результатами денатуруючого гель-електрофорезу. Якщо припустити, що процес «проковзування» ДНК-полімерази у мікросателітній послідовності є подією відносно рідкісною, то кількість копій статерів у процесі ампліфікації повинна бути більш низькою порівняно з цільовими фрагментами. Тому при використанні традиційних способів детекції (бромід етидію або азотнокисле срібло) дослідник їх або не помічає, або ж має місце відносно слабе свічення, яке дає змогу приймати їх за хибні алелі. Артефакти, у випадку утворення статерів, є, по суті, гетеродуплексною ДНК, тобто гібридною молекулою, що складається із ланцюгів різної довжини (які розрізняються на одну або декілька одиниць мікросателітного повтору). Такий тип артефактів називається SI-DNA (Slipped Intermediates DNA). Назва даного типу артефактів відображує механізм їх утворення – ефект проковзування (slippage). У випадку відсутності статерів гібридні молекули повністю ідентичні описаній у виконаній роботі нелінійній гомодуплексній ДНК, що доводиться результатами секвенування послідовностей (однакова кількість елементів мікросателітного мотиву вказує на ідентичність алелів і, отже, відсутність статерів) (рис. 3.8). Однак окремі автори називають подібні структури, у випадку з тринуклеотидними повторами, S-DNA, тобто Slipped DNA, що, за власною точкою зору, є дещо недоцільним, так як передбачає феномен «проковзування», як механізм утворення мутантних варіантів вихідного мотиву. Тому використання терміну «нелінійна гомодуплексна ДНК» на авторський погляд більше підходить для цього типу артефактів, так як безпосередньо вказує на конформаційну природу їх утворення.

Припущення про те, що в процесі проведення ПЛР, поряд з цільовими, утворюються фрагменти нелінійної гомодуплексної ДНК, призводить до необхідності вивчення питання про вплив кількості циклів ПЛР на появу неспецифічних продуктів (артефактів).

Для вирішення цієї задачі провели серію ампліфікацій з наступним розділом продуктів у нативному ПААГ. Ампліфікації різнились між собою тільки кількістю циклів – від 5 до 35 з кроком 5. На рисунку 3.9 представлені результати досліду за використання проби ДНК, що відповідає №4 рисунку 3.5.

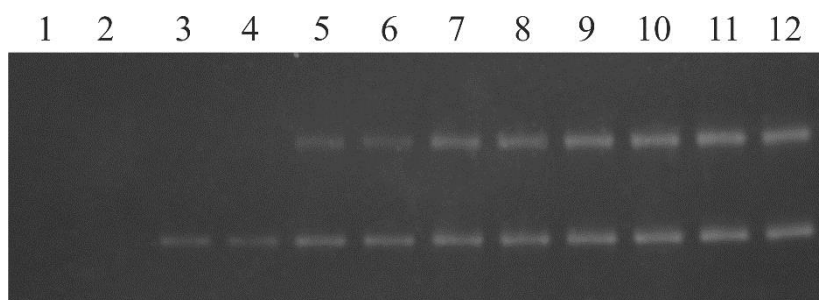


Рис. 3.9 Залежність утворення артефактів (нелінійних гомодуплексів) від кількості циклів ПЛР.

Примітка: 1 – 5 циклів; 2 – 10; 3–4 – 15; 5–6 – 20; 7–8 – 25; 9–10 – 30; 11–12 – 35.

Як видно з рисунку 3.9, артефакти з'являються, розпочинаючи, орієнтовно, з 20-го циклу. У межах перших 15 циклів синтезуються переважно цільові фрагменти. Розпочинаючи з 20–25 циклів інтенсивність свічення артефактів збільшується й наближається до рівня значення цільових фрагментів, що вказує на майже рівний «вихід» продуктів. Зі збільшенням кількості циклів полімеразної ланцюгової реакції відбувається збільшення концентрації продуктів ампліфікації (за умови збігу ефективності реакцій в цілому). Тому поява артефактів після перших 20 циклів вказує на залежність їх утворення від концентрації ампліфікованих фрагментів. Певною мірою на кінцевий результат можуть також впливати такі чинники, як вихідна концентрація матриці ДНК, модель термоциклера та ін., що, у свою чергу, також виражається у варіації ефективності ПЛР та впливає на концентрацію кінцевого продукту. Однак, залежність утворення саме «конформаційних» артефактів від концентрації ампліфікованих продуктів (ампліконів), на власний погляд, очевидна.

Слід відзначити, що змога визначення додаткових фрагментів на електрофореграмі залежить також і від методу забарвлення гелю. У випадку фарбування нітратом срібла (як значно більш чутливого методу) утворення артефактів визначається, в середньому, з 15-ти циклів полімеразної ланцюгової реакції (за умови використання термоциклеру «Терцик»).

На основі всього вищевикладеного можна припустити, що за умов відносно низьких концентрацій ампліфікованої ДНК відбувається утворення переважно цільових фрагментів (лінійної гомодуплексної ДНК), так як у циклах денатурації/ренатурації антипаралельні ланцюги комплементарно зв'язуються один з одним протягом всієї довжини та вірогідність утворення артефактних молекул низька й недостатня для подальшої детекції. У випадку ж, коли концентрація ампліфікованої ДНК перевищує визначене порогове значення, комплементарні взаємодії ланцюгів упродовж всієї дуплексної молекули порушуються, що й призводить до утворення нелінійної гомодуплексної ДНК. Особливої уваги заслуговує той факт, що феномен, який спостерігається, характерний тільки для мікросателітних локусів. Ймовірно, що стабілізація молекули нелінійної гомодуплексної ДНК відбувається саме через взаємодію основ всередині кожного із ланцюгів у ділянці, що утримує мікросателітні повтори.

Беручи до уваги все зазначене, підведемо підсумки. За результатами проведених досліджень доведено, що при ампліфікації SSR-локусів основним типом артефактів ПЛР, що мають близьку до цільових фрагментів електрофоретичну рухливість, є «нелінійні» гомодуплекси (НГД). Передбачається, що в процесі ампліфікації геномної ДНК гомозиготної особини за SSR-локусом (диплоїдний генотип) може утворюватися від 1 до 3 фрагментів залежно від довжини мікросателітного алелю («чисті» гомозиготи з одним ампліфікованим фрагментом частіше за все спостерігаються для самого короткого алелю локусу). У випадку з гетерозиготним генотипом, окрім гетеродуплексної ДНК на електрофореграмі, з'являються додатково 1–2 фрагменти, що мають природу НГД. Необхідно відмітити високу вірогідність

утворення та точну відтворюваність таких нелінійних структур, яку можливо порівняти з лінійними гомодуплексами. Якщо конформація НГД має стабілізовану структуру, то, як правило, вони утворюються завжди при денатурації-ренатурації ланцюгів ДНК у процесі полімеразної ланцюгової реакції. Інтенсивність свічення (насиченість забарвлення) таких смуг на електрофореграмі достатня для прийняття їх за цільові фрагменти. У підсумку ми отримуємо не характерну для цього типу маркерів картину – так званий «множинний алелізм». Алельна драбинка одного генотипу з урахуванням усіх артефактів може бути порівнянна з профілем RAPD. Необхідно також відмітити, що всі ці додаткові фрагменти насправді є похідними цільових ампліконів, конформаційна структура яких змінює їх електрофоретичну рухливість.

Виходячи із стандартних (не денатуруючих, нативних) умов проведення електрофорезу, визначати алельний профіль досліджуваних зразків слід лише на підставі повної картини мікросателітної мінливості за конкретним локусом у межах популяції, що вивчається. Як свідчить практика, швидкість міграції додаткових фрагментів (НГД) нижче цільових. Тому за основу необхідно брати лише нижню пару ампліконів. При цьому необхідно контролювати положення верхнього фрагменту цієї пари (більш важкого), який повинен заходитися у межах міграції найважчого (найдовшого) мікросателіту для цього локусу. Як додаткового критерію для прийняття правильного рішення у випадку гетерозигот можна використовувати аналіз профілю гетеродуплексів, які мають більш низьку електрофоретичну рухливість. У суперечливих ситуаціях, а також при аналізі одиничного зразку, варто провести повторну ампліфікацію вирізаних із гелю фрагментів. Такий підхід, безумовно, допоможе при аналізі даних у денатуруючих умовах. При наявності певного досвіду за допомогою аналізу гомо/гетеродуплексних фрагментів можна успішно генотипувати без проведення денатуруючого гель-електрофорезу, який за умов відсутності спеціального обладнання тяжко відтворюваний та не позбавлений недоліків.

3.2 Гетеродуплексний аналіз поліморфізму цільових генів

Після аналізу утворення артефактних молекул у процесі ампліфікації мікросателітних локусів розглянемо питання про утворення «додаткових» (до цільових) фрагментів при використанні інших типів молекулярно-генетичних маркерів (у першу чергу Indel).

Як свідчать результати досліджень, вірогідність утворення гетеродуплексної ДНК в процесі ПЛР досить значна (за умови збігу нуклеотидних послідовностей фрагментів, що аналізуються, а також у випадку гетерозиготних зразків), тобто при виконанні певних умов гетеродуплекси утворюються практично завжди. Фізична взаємодія *in vitro* між різними алелями одного гену відбувається при дослідженні гетерозиготних особин. Причому, якщо вплив одонуклеотидного поліморфізму на утворення гетеродуплексів нами проаналізовано у відповідному розділі (поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту), то вплив інсерцій розглянемо докладніше.

У випадку з двома інсерціями – розміром 24 п.н. та 57 п.н., також виявлено утворення гетеродуплексів (рис. 3.10).

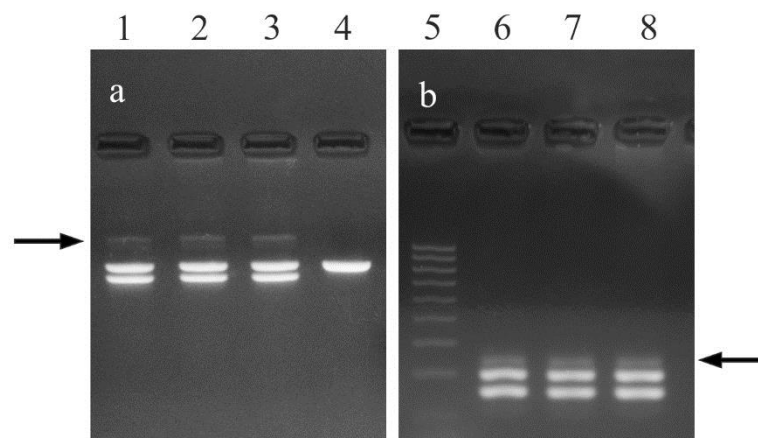


Рис. 3.10 Утворення гетеродуплексів при ампліфікації гетерозиготних зразків.

Примітка: а – інсерція розміром 57 п.н. в гені PRL-1; б – інсерція розміром 24 п.н. в гені PRL; 1-3, 6-8 – генотип I/D; 4 – I/I; 5 – маркер молекулярних мас M-50; стрілками відмічена гетеродуплексна ДНК.

Як видно на представленій електрофореграмі, у випадку з інсерціями досить більшого розміру, для візуалізації гетеродуплексів цілком достатньо використання 3 % агарозного гелю. При цьому різниця в розмірах інсерційних фрагментів у цьому випадку (57 та 24 п.н.) неістотна для ефективності утворення гібридних молекул, тобто гетеродуплексна ДНК утворюється з однаковою вірогідністю (100 %) у кожному із вищеписаних випадків. На представленій електрофореграмі зображено гетеродуплекси, що утворюються при ампліфікації гетерозигот. У свою чергу, при змішуванні гомозиготних зразків I/I з D/D та термостатуванні суміші за температури 94 °C протягом 5 хвилин та за температури 20 °C протягом 5 хвилин, також утворювались гетеродуплексні молекули. Вирізання із гелю фрагменту, що утримує гетеродуплексну ДНК з її наступною ампліфікацією, повністю підтверджує зроблене припущення про гібридну природу цих фрагментів – як результат синтезуються як вихідні цільові фрагменти (що відповідають алелям), так і фрагменти характерні для гібридних молекул. Отже, утворення гетеродуплексної ДНК при ампліфікації гетерозиготних зразків є скоріш за все правилом, ніж виключенням, що призводить до необхідності врахування впливу цього феномену на ефективність генотипування в цілому.

При проведенні генотипування особин за поколіннями, аналізі родоводів, паспортизації, контролі походження тварин, проблемі утворення гетеродуплексів у випадку аналізу гетерозигот слід приділити максимальну увагу, щоб уникнути невірної інтерпретації чинників виникнення додаткових фрагментів на електрофореграмі (так звані non-parental bands).

Отримані результати, що ілюструють необхідність аналізу гетеродуплексної ДНК, яка утворюється в процесі ПЛР, дали змогу вирішити також й окрему проблему, що стосується визначення статі птиці з невираженим статевим диморфізмом.

Визначення статі птиці з невираженим статевим диморфізмом за використання методу полімеразної ланцюгової реакції – задача досить не

тривіальна, однак, не дивлячись на усі складнощі, не має альтернативних варіантів. В основі молекулярно-генетичних методів визначення статі лежать особливості нуклеотидної структури гену CHD (chromo-helicase DNA binding protein) у самиць та самців. Встановлено, що гени CHD, які локалізовані на Z та W хромосомах (алелі CHD-Z та CHD-W), різняться за довжиною, так як вміщують інсерцію у своєму складі. Рекомбінації між CHD-Z та CHD-W не спостерігаються, аутосомні аналоги відсутні. Різниця за довжиною алелів дає змогу їх детектувати при проведенні електрофорезу цільових фрагментів, що, в свою чергу, сприяє ефективному сексуванню птахів. Однак, існує низка проблем, що істотним чином ускладнюють сексування. До однієї із основних проблем відноситься варіативний розмір інсерції в гені CHD у різних видів птахів. Зокрема, різниця у довжині ампліконів CHD-Z та CHD-W у представників виду *Psittacus erithacus* досить виражена, що дозволяє безпомилково сексувати особин з використанням 1,5 % агарозних гелів (рис. 3.11).

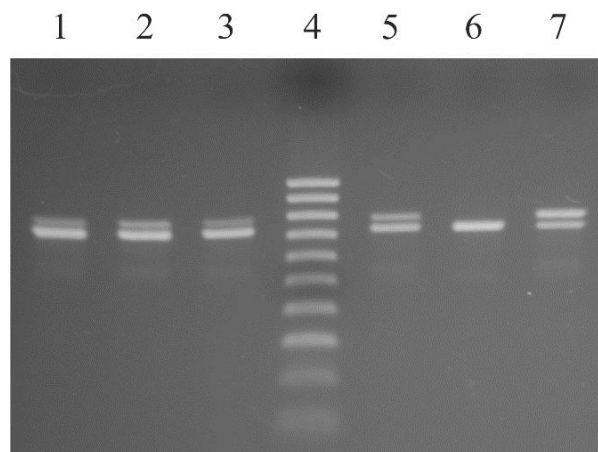


Рис. 3.11 Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагменту гену CHD у представників виду *Psittacus erithacus*.

Примітка: 1–3, 5, 7 – CHD-Z/CHD-W; 6 – CHD-Z/CHD-Z; 4 – маркер молекулярних мас.

Використання електрофорезу в агарозному гелі дало змогу успішно сексувати представників видів *Numida meleagris*, *Phasianus colchicus*, *Lophura nycthemerus*, *Larus argentatus*, *Ciconia ciconia*, *Melopsittacus undulatus*, *Aprosmictus erythropterus*, *Nymphicus hollandicus*, *Aratinga solstitialis*, *Aratinga jendaya*, *Aratinga canicularis*, *Amazona aestiva*, *Amazona amazonica*, *Psittacus erithacus*, *Psittacula alexandri*, *Deropteryx accipitrinus*, *Ara nobilis*, *Ara chloroptera*, *Ara ararauna*, *Cacatua moluccensis*, *Tauraco persa*, *Tauraco violacea*.

Однак відмінності між ампліконами у представників сімейства *Musophagidae* менш виражені, що приводить до необхідності використання концентрованих до 4–5 % агарозних гелів. Також представників виду *Cacatua galerita* можна успішно сексувати лише за умов використання поліакриламідних гелів. Отже, успішне сексування особин різних видів можливе при застосуванні досить широкого арсеналу методів електрофорезу в гелі. Однак, не дивлячись на високу розрізняючу здатність ПААГ у окремих випадках, при наявності мінімальних відмінностей між ампліконами, інтерпретація результатів електрофорезу дещо ускладнена, внаслідок «злиття» фрагментів ДНК один з одним. Як результат з'являється досить висока вірогідність помилкового сексування, так як розрізнити фрагменти CHD-Z та CHD-W у цьому випадку не представляється можливим. Виходом із ситуації, що склалася, може слугувати аналіз гетеродуплексної ДНК, яка утворюється, в процесі ампліфікації.

Генотип CHD-Z/CHD-W функціонально можна представити як гетерозиготу, тому гетеродуплекси, що утворюються, містять у своєму складі ланцюги CHD-Z та CHD-W. Причому гетеродуплекси утворюються двох типів – у першому випадку смисловий ланцюг гетеродуплексу – CHD-Z; антисмисловий – CHD-W. У другому випадку смисловий ланцюг гетеродуплексу – CHD-W; антисмисловий – CHD-Z. Відмінності в електрофоретичній рухливості гетеродуплексів та цільових фрагментів дають змогу досить просто їх розрізнити.

Для підтвердження природи гетеродуплексів як гібридних молекул, що складаються із ланцюгів CHD-Z та CHD-W, провели вирізання із гелю цих фрагментів з їх подальшою ампліфікацією. Як результат були отримані цільові фрагменти та гетеродуплекси, що однозначно підтверджують наведене вище припущення (рис. 3.12).

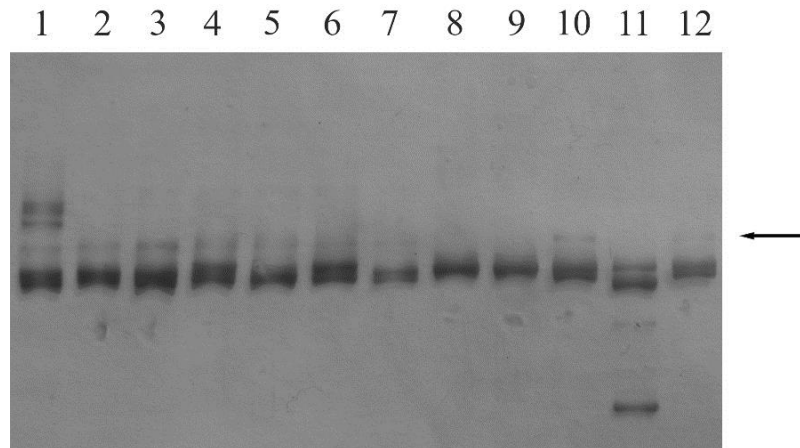


Рис. 3.12 Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагменту гену CHD у представників різних видів птиці (стрілкою вказані гетеродуплекси).

Примітка: 1–7, 10–12 – CHD-Z/CHD-W; 8, 9 – CHD-Z/CHD-Z.

Наявність гетеродуплексів на електрофореграмі можна використовувати як додаткове підтвердження генотипу CHD-Z/CHD-W (самиця), що особливо актуально у випадку «злиття» ампліфікованих фрагментів.

За урахування всього вищенаведеного, проведемо порівняльний аналіз декількох робіт, в яких артефакти полімеразної ланцюгової реакції, зокрема гетеродуплекси, привели до невірних висновків та помилок генотипування. Так, у роботі Долматової І. Ю. встановлено, що при проведенні ампліфікації з праймером NM13 батьків та їх нащадків F1 при повній ідентичності батьківських геномів у всіх особин F1 відмічено додаткові фрагменти [419]. Поява додаткових фрагментів у особин F1 призводить до збільшення рівня внутрішньогеномної гетерогенності. Автор пояснює появу додаткових

фрагментів процесами реорганізації геному, а також наявністю одиничних точкових мутацій у місцях гібридизації праймерів з ДНК-мішенню. Однак це припущення порушує принцип бритви Оккама – *Entia non sunt multiplicanda praeter necessitatem* (сутності не слід помножувати без необхідності), чого в наукових дослідженнях слід всіляко уникати. При цьому, беручи до уваги результати власних досліджень, що описані раніше, можна припустити, як чинник появи додаткових фрагментів ДНК при RAPD-аналізі у особин F1 утворення артефактних молекул різних типів. Більш того, збільшення внутригеномної гетерогенності, яке виявлено у 2 із 6 використаних у роботі Долматової І. Ю. маркерів, не дає змоги в цілому проводити типування порід та ліній птиці, так як приводить до найвищого рівня мінливості в популяції, загальної нестабільності та низької відтворюваності результатів RAPD-аналізу в цілому. В свою чергу, припущення про утворення гетеродуплексів у процесі полімеразної ланцюгової реакції при проведенні RAPD-аналізу, дає змогу пояснити картину, що спостерігається, та позбавитися від необхідності постулювати наявність різних процесів реорганізації геному (додаткових сутностей). Про небезпеку невірної інтерпретації результатів RAPD-аналізу внаслідок утворення гетеродуплексної ДНК вказано також й в дослідженнях Ayliffe A. зі співавторами [420]. В цій роботі з'ясовано, що утворення додаткового фрагменту у особин F1 при проведенні RAPD-аналізу відбувається внаслідок фізичної взаємодії між різними алелями.

Таким чином, поряд з особливостями генотипування особин за PCR-RFLP та Indel-маркерами (MspI-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту, а також генотипування за локусом TGF- β 2 – що описано у відповідних розділах дисертаційної роботи), аналіз гетеродуплексної ДНК, що утворюється в процесі ПЛР, забезпечує істотне підвищення ефективності досліджень і при вирішенні задач визначення статі птиці за геном CHD.

Матеріали досліджень розділу викладено у наукових публікаціях [421–432].

РОЗДІЛ 4

МІКРОСАТЕЛІТНА МІНЛИВІСТЬ У ПОПУЛЯЦІЯХ КУРЕЙ РІЗНИХ ПОРІД УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

У генетико-селекційних дослідженнях сільськогосподарських тварин використання молекулярно-генетичних маркерів суттєво розширює можливості генетичного аналізу, що, у свою чергу, дає змогу встановити між- та внутрішньопородну (лінійну, популяційну) варіабельність окремих частин геному, вивчити особливості генетичної структури дослідних популяцій, простежити динаміку мінливості у ряді генерацій. Для вирішення цілої низки завдань, що пов'язані з науковим забезпеченням селекційної роботи, зокрема для рішення питань стосовно паспортизації порід та ліній птиці, оцінці чистоти розведення дослідних ліній, визначення рівня консолідації створюваних груп та ступеня генетичної диференціації популяцій широко використовують окремий клас молекулярно-генетичних маркерів – мікросателіти. Завдяки високому рівню поліморфності мікросателітних маркерів, що відображається в більшій, відносно класичних біалельних систем, кількості алелів на локус, мікросателіти можна використовувати як досить тонкий та ефективний інструмент вивчення генетичної мінливості, що дає змогу успішно вирішувати весь спектр зазначених питань.

У цьому розділі дисертаційної роботи акцентовано увагу на вивченні генетичної диференціації різних порід та ліній курей української селекції яєчного й комбінованого напрямків продуктивності. Як правило, в генетико-популяційних дослідженнях використовують мікросателіти, що відносяться до селективно-нейтральних маркерів, тобто до таких, на які відсутня дія відбору. Однак мікросателітні маркери пов'язані також із проявом господарсько-корисних ознак у тварин. Як результат низки досліджень виявлено зв'язок деяких мікросателітних локусів з показниками продуктивності та стійкістю до захворювань, що, у свою чергу, істотно розширює сферу їх застосування.

Для проведення досліджень використовували як селективно-нейтральні, так й асоціативно-зв'язані маркери. Для визначення популяційної диференціації використовували мікросателітні локуси, що рекомендовані ISAG-FAO, до яких відносяться MCW0081, MCW0034, LEI0192, MCW0104, ADL0268, LEI0166, ADL0278, LEI0094, MCW0330 та MCW0123. Також, додатково до цієї групи маркерів, у дослідженнях з диференціації окремих порід курей української селекції використовували мікросателітні локуси, які асоціативно-зв'язані (через групу зчеплення) з показниками резистентності до неопластичних захворювань, зокрема до хвороби Марека, що, перш за все, відноситься до однієї з найбільш актуальних характеристик курей породи полтавська глиняста (лінія 14). У цьому контексті використовували локуси MCW0245, MCW0257, MCW0282 та MCW0288. Генотипування особин за кожним з мікросателітних локусів проводили за використання вищевикладеної методики, яка включає аналіз додаткових артефактних фрагментів ДНК, що утворюються впродовж ампліфікації цільових локусів (розділ 3.1).

4.1 Мікросателітна мінливість у популяціях курей різних порід яєчного та комбінованого напрямів продуктивності

Як результат проведених досліджень у дослідних популяціях курей порід бірківська барвиста (лінія А), полтавська глиняста (лінія 14), плімутрок білий (лінія Г-2) та род-айленд червоний (лінія 38) виявлено поліморфізм за кожним із обраних мікросателітних маркерів (кількість поліморфних локусів становила 100 %). Кількість алелів на локус коливалась від 2 до 9.

Мінімальна кількість алелів на локус встановлена для MCW0257 (2), максимальна – для LEI0192 (9). Загальний пул за всіма вивченими маркерами становив 66 алелів. Для популяції курей породи плімутрок білий кількість окремих алелів за всіма локусами становила 64; для бірківської барвистої – 50; для род-айленду червоного – 50; для полтавської глинястої – 52 (рис. 4.1).

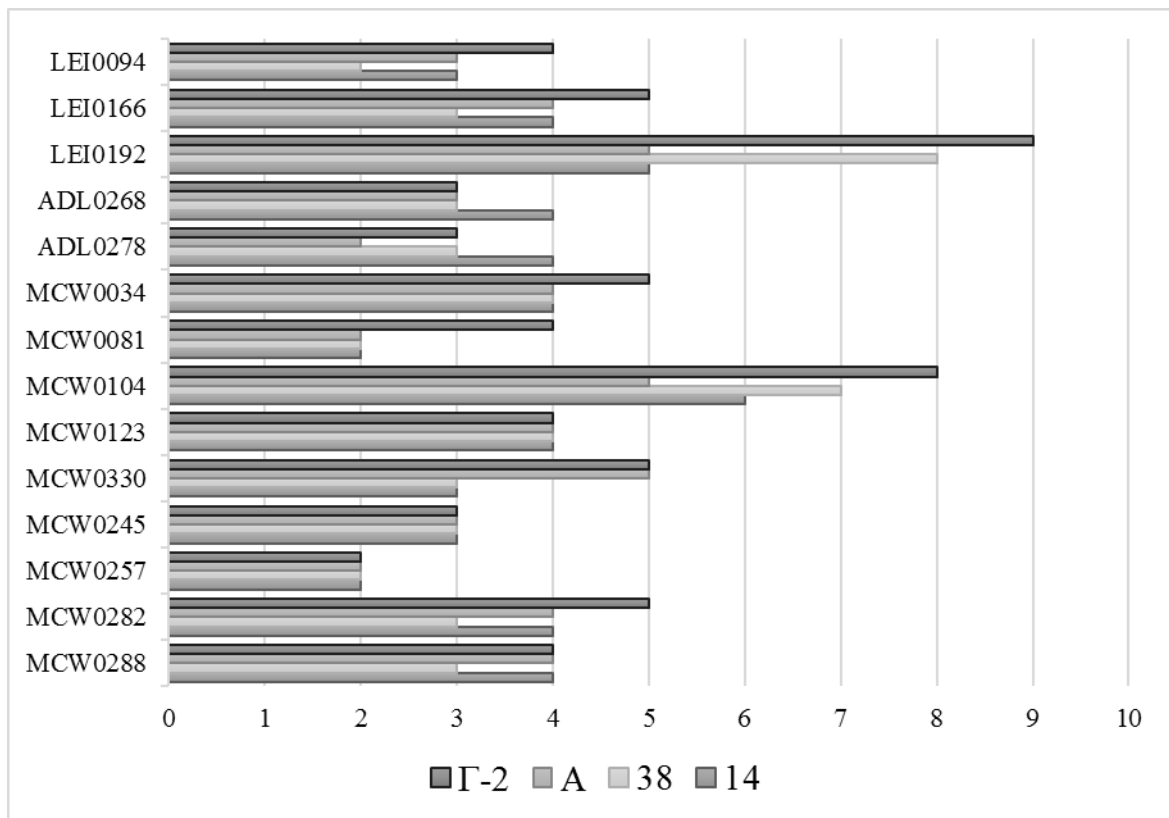
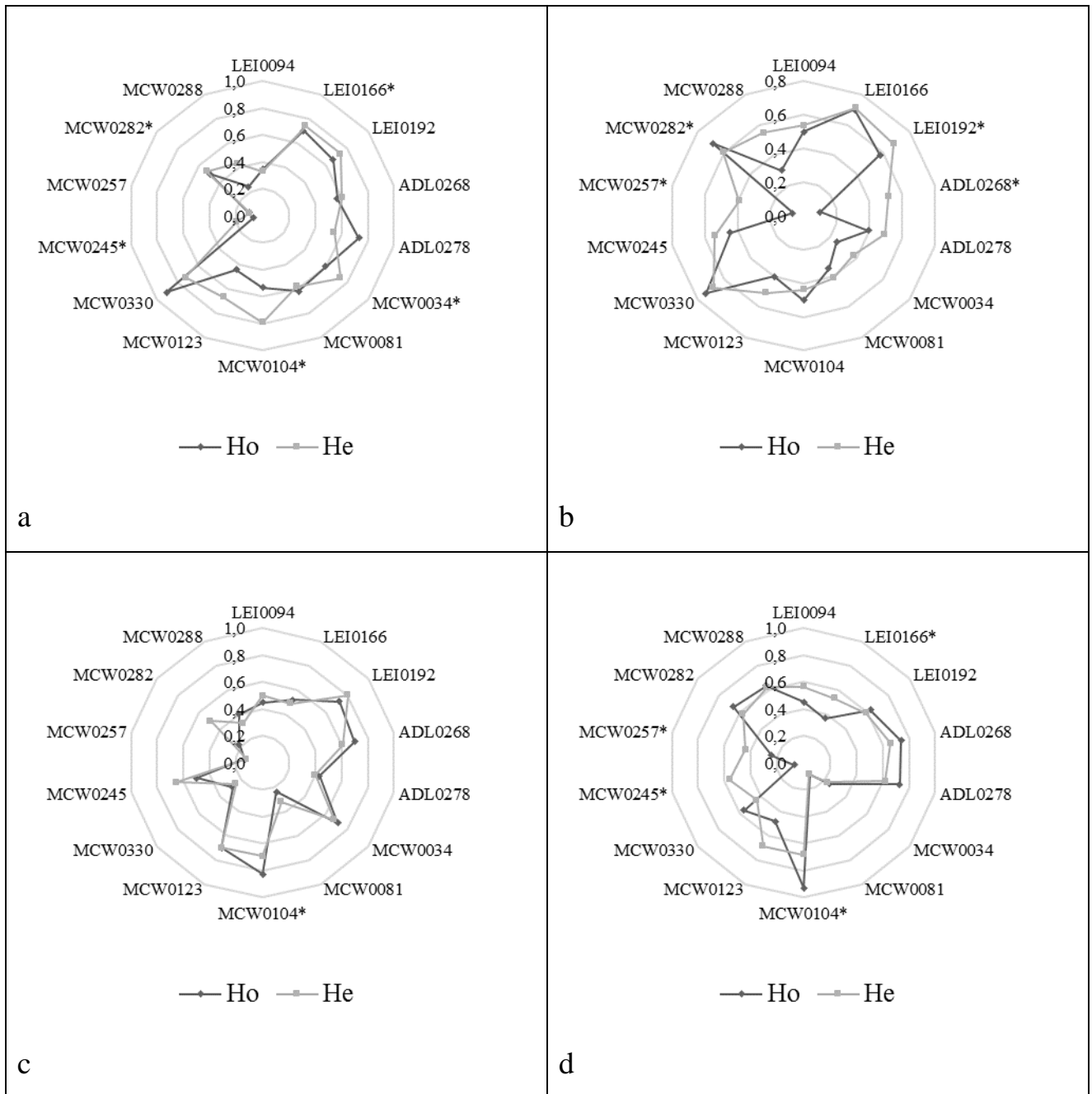


Рис. 4.1 Співвідношення кількості алелів за визначеними мікросателітними локусами в дослідних популяціях курей

За визначення середньої кількості алелів на локус в усіх дослідних популяціях курей найменше значення відмічено для локусу MCW0257 (2), найбільше – для LEI0192 (6,75).

За значеннями показнику інформаційного поліморфізму (PIC) загальна кількість високоінформативних маркерів становила ~ 45 % від загальної кількості, при цьому їх розподіл за дослідними лініями різнився. В цілому за значенням PIC до високоінформативних маркерів відносяться LEI0166 (лінії Г-2 та А), LEI0192 (усі дослідні популяції), ADL0268 (за винятком лінії А), ADL0278 (лінія 14), MCW0034 (Г-2 та 38), MCW0081 (Г-2), MCW0104 та MCW0123 (окрім лінії А в обох випадках), MCW0330 (за винятком лінії 14), MCW0245 (лінія 38), MCW0282 (лінії А та 14), MCW0288 (лінія 14).

За співвідношенням значень показників фактичної (H_o) та очікуваної (H_e) гетерозиготності дослідні лінії курей виражено різняться між собою (рис. 4.2).



Примітка: * – достовірність відмінностей між показниками, $p_{\chi^2} < 0,05$

Рис. 4.2 Показники очікуваної (H_e) та фактичної (H_o) гетерозиготності в дослідних популяціях курей. а – лінія Г-2; б – лінія А; с – лінія 38; д – лінія 14

Серед значущих відхилень від стану генетичної рівноваги Харді-Вайнберга для популяції курей лінії Г-2 слід відмітити виражений ексцес гомозигот за локусами MCW0034, MCW0104 та MCW0245 ($F_{is} = 0,189; 0,325;$

0,636 та 0,440, відповідно). В свою чергу в популяції курей породи бірківська барвиста переважання гетерозиготних особин спостерігалось лише для локусу MCW0282 ($F_{is} = -0,138$). Для усіх інших, за винятком MCW0104 та MCW0330, виявлено тенденція до надлишку гомозигот, що досягає свого максимального значення у локусах ADL0268 та MCW0257 ($F_{is} = 0,806$ та $0,830$; $p_{\chi^2} < 0,05$).

Серед усіх дослідних популяцій порода род-айленд червоний за значеннями показників фактичної та очікуваної гетерозиготності характеризується найбільш подібними значеннями.

Переважання кількості гетерозиготних особин виявлено тільки для локусу MCW0104 ($F_{is} = -0,194$). За іншими локусами відхилення показників знаходились у межах статистичної похибки. Для популяції курей породи полтавська глиняста співвідношення дослідних показників гетерозиготності більш чітко виражені, ніж у попередній лінії. У 9 із 14 локусів лінії 14 спостерігалась тенденція до ексцесу гетерозигот з максимумом для MCW0104 ($F_{is} = -0,357$; $p_{\chi^2} < 0,001$). У інших п'яти – надлишок гомозигот із істотними відхиленнями для локусів LEI0166, MCW0257 та MCW0245 ($F_{is} = 0,307$; $0,452$ та $0,877$, відповідно).

Аналіз показників F-статистики (F_{st}) за середніми значеннями для різних локусів вказує на те, що 19,5 % загальної генетичної мінливості розподілено між популяціями (породами) та 80,5 % припадає на внутрішньопопуляційну (внутрішньопородну) складову, що вказує на значну дивергенцію дослідних ліній курей.

Серед усіх вивчених локусів середній рівень дивергенції (значення F_{st} у межах від 0,06 до 0,15) характерний для 29 % від загальної кількості мікросателітних маркерів; значно виражена дивергенція (від 0,16 до 0,25) – для 57 % та дуже значно ($> 0,25$) – для 14 % (локуси MCW0257 та MCW0288).

За середніми значеннями F_{is} негативні величини (ексцес гетерозигот) встановлено тільки для 21 % від усіх вивчених локусів.

Середнє значення показнику F_{it} вказує на істотний (27,5 %) надлишок гомозиготних особин, що ймовірно свідчить про досить виражений інбридинг у

дослідних популяціях курей, який досягає свого максимального значення в локусах MCW0245 та MCW0257 (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

**Показники F-статистики за 14 мікросателітними локусами
у дослідних популяціях курей**

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}
LEI0094	0,095	0,234	0,154
LEI0166	0,072	0,220	0,159
LEI0192	0,076	0,204	0,139
ADL0268	0,118	0,286	0,190
ADL0278	-0,111	0,121	0,209
MCW0034	0,104	0,291	0,209
MCW0081	0,070	0,150	0,086
MCW0104	-0,070	0,089	0,149
MCW0123	0,209	0,305	0,121
MCW0330	-0,183	0,028	0,178
MCW0245	0,444	0,554	0,199
MCW0257	0,483	0,727	0,472
MCW0282	0,057	0,241	0,195
MCW0288	0,181	0,401	0,268
У середньому ($M \pm m$)	$0,110 \pm 0,049$	$0,275 \pm 0,049$	$0,195 \pm 0,024$

У подальшому проаналізували значення генетичних дистанцій за N_{ei} між дослідними популяціями курей. Значення генетичної подібності та генетичних дистанцій представлені в табл. 4.2.

Генетичні дистанції та генетична подібність дослідних популяцій курей

Популяції	Г-2	А	38	14
Г-2	***	0,328	0,659	0,323
А	0,721	***	0,588	0,379
38	0,517	0,555	***	0,359
14	0,724	0,684	0,699	***

Примітка: генетичні дистанції зображені над діагоналлю; генетична подібність – під діагоналлю.

За результатами досліджень встановлено, що найбільші генетичні відмінності спостерігались між породами плімутрок білий та род-айленд червоний (65,9 % відмінностей), найменші – між породами плімутрок білий та полтавська глиняста (32,3 %). Між лініями 14 та 38 (яєчно-м'ясного напрямку продуктивності) виявлено 35,9 % відмінностей. При порівнянні популяції яєчних курей (лінія А) визначені максимальні відмінності з породою род-айленд червоний (58,8 %), в той час як з лінією Г-2 та 14 спостерігається подібна вираженість відмінностей (32,8 та 37,9 %).

За результатами аналізу генетичних дистанцій побудували філогенетичне дерево за використання методу незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA).

У цілому, топологія дерева відображає виявлені закономірності, що ґрунтуються на аналізі розподілу алельних частот за 14 мікросателітними локусами. Популяції м'ясо-яєчних курей породи плімутрок білий лінії Г-2 формують окремий кластер з популяцією курей яєчно-м'ясного напрямку продуктивності породи полтавська глиняста лінії 14, що вказує на наявність менш виражених відмінностей від інших порід. Далі, до цього кластеру приєднується гілка популяції яєчних курей породи бірківська барвиста лінії А.

В свою чергу, популяція курей яєчно-м'ясного напрямку продуктивності породи род-айленд червоний формує окремий кластер, відображаючи максимальні відмінності з іншими дослідними лініями курей (рис. 4.3).

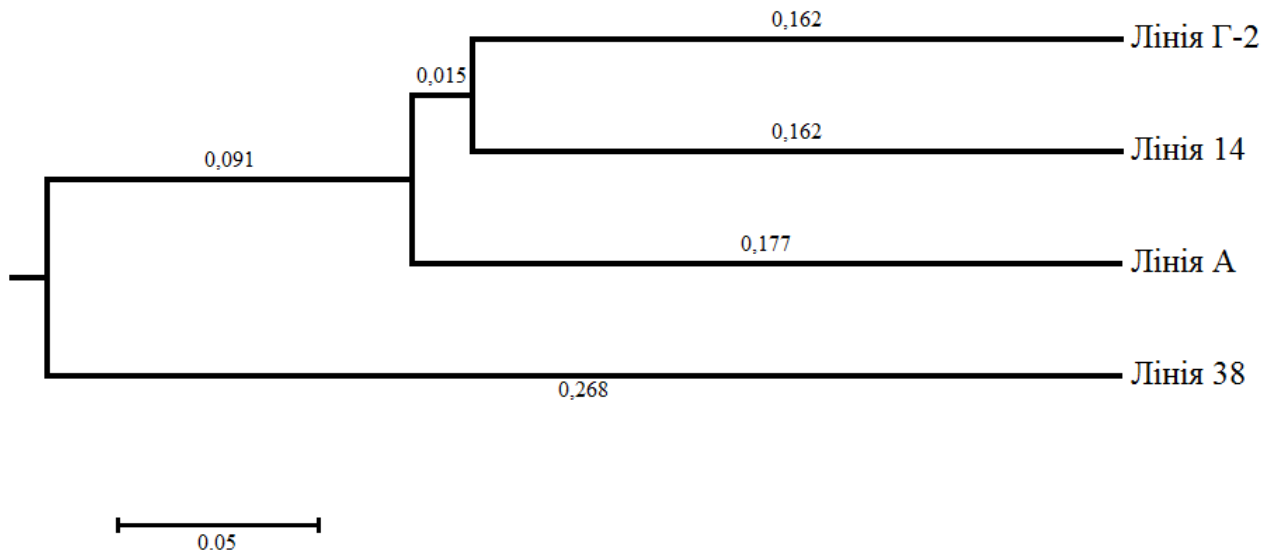


Рис. 4.3 Дендрограма міжпопуляційних взаємин, побудована на основі аналізу генетичних дистанцій за Nei методом незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA)

Однак використання методу UPGMA для побудови дендрограми базується на постулаті правильності гіпотези про молекулярний годинник (однакова швидкість еволюції у поколіннях), що, у випадку проведення селекційної роботи, може не виконуватися. Тому, альтернативним підходом побудови філогенетичного дерева слугує використання методу приєднання сусідів (NJ, Neighbor-Joining), для якого немає необхідності відповідно моделі молекулярного годинника. На рисунку 4.4 представлена дендрограма, побудована за використання методу NJ.

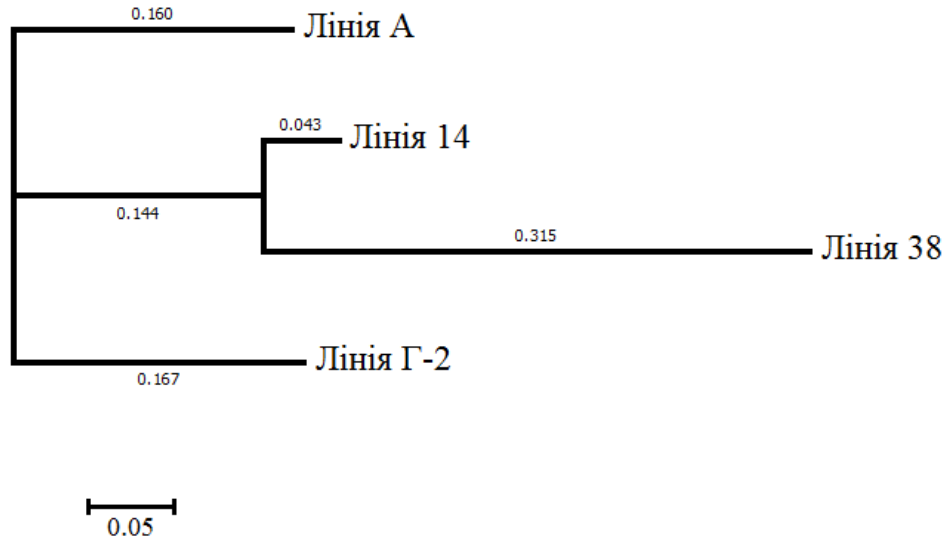


Рис. 4.4 Дендрограма міжпопуляційних взаємин, побудована на основі аналізу генетичних дистанцій за Nei методом Neighbor-Joining

У цьому випадку, за умов використання для побудови методу NJ, структура отриманого філогенетичного дерева істотним чином відрізняється від вищенаведеного (на основі UPGMA). Окремий кластер формують популяції курей порід полтавська глиняста й род-айленд червоний (лінії 14 та 38). При цьому популяції порід плімутрок білий (лінія Г-2) та бірківська барвиста (лінія А) формують окремі гілки. Картина, що спостерігається, повністю відображає тип напрямку продуктивності птиці. Кластер ліній 14 та 38 характеризує курей яєчно-м'ясного напрямку продуктивності, в той час як окремі гілки ліній А та Г-2 – відповідно яєчного та м'ясо-яєчного. Більш того, подібна структура повністю відповідає даним, отриманим при аналізі поліморфізму різних функціональних генів, що пов'язані з проявом господарсько-корисних ознак дослідних порід курей, та які також корелюють з напрямом продуктивності птиці (розділ 5.16).

4.2 Генетична диференціація різних субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей

Поряд з вивченням мікросателітної мінливості у популяціях курей української селекції різних напрямів продуктивності було проведено дослідження генетичної диференціації субпопуляцій м'ясо-яєчних курей. Для проведення досліджень використовували субпопуляції Г-1, Г-2, Г-3, Г-4 та С. Оцінку мікросателітної мінливості проводили з використанням SSR-маркерів, що рекомендовані FAO (LEI0094, MCW0034, ADL0278, ADL0268, MCW0081, LEI0166, MCW0104 та MCW0123).

За результатами аналізу генетичного різноманіття дослідних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей української селекції виявлено поліморфізм за кожним з вивчених мікросателітних локусів. Дослідні групи курей розрізнялися між собою за сукупністю показників генетичної мінливості.

Загальний алелофонд дослідних субпопуляцій за 8 обраними мікросателітними локусами представлений 38 різними алелями. За виключенням ADL0278, за всіма іншими мікросателітними маркерами кількість алелів різниться в кожній із дослідних груп. Найменша кількість алелів серед усіх локусів становила три, найбільша – вісім. За всіма локусами мінімальну кількість алелів визначено у субпопуляції Г-4 (30), максимальну – у субпопуляції Г-2 (35).

Найменше генетичне різноманіття за кількістю алелів на локус серед усіх дослідних популяцій встановлено для маркера ADL0278 (3 алелі на локус), найбільше – для MCW0104 (6,4 алелі на локус).

На рис. 4.5 приведено дані щодо співвідношення кількості алелів за кожним з визначених поліморфних локусів у різних субпопуляціях м'ясо-яєчних курей.

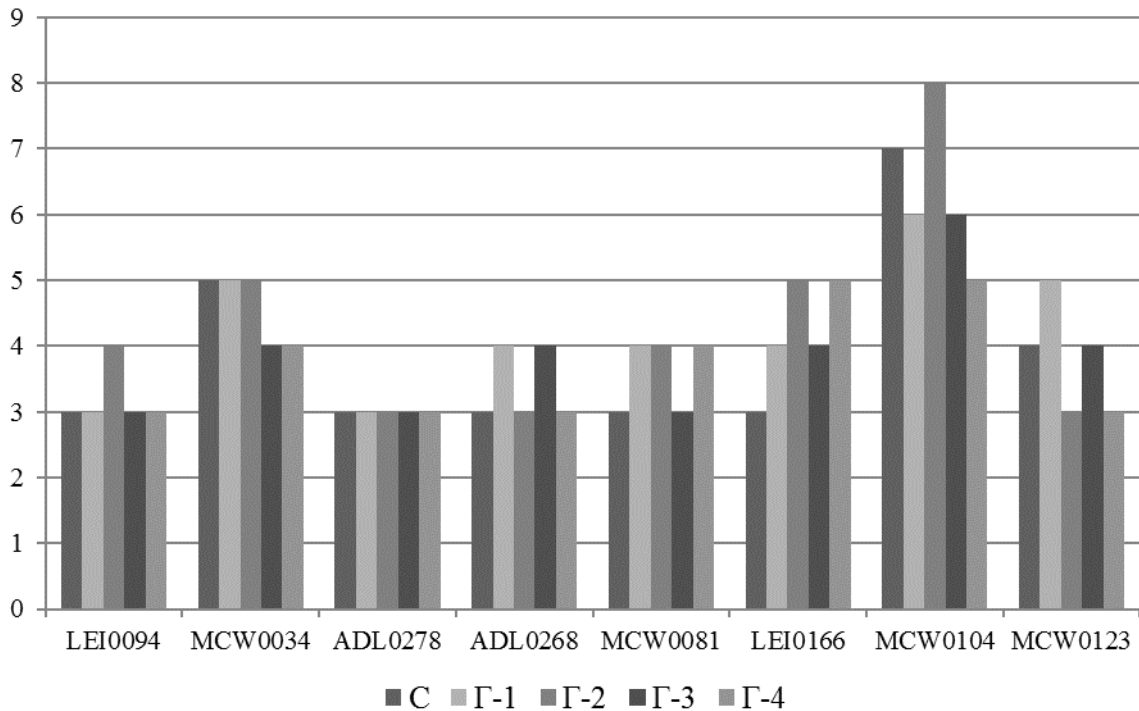


Рис. 4.5 Співвідношення кількості алелів за визначеними мікросателітними локусами в різних субпопуляціях м'ясо-яєчних курей

За результатами досліджень виявлено тільки два приватних алеля в субпопуляціях Г-2, за локусом LEI0094, та в Г-1, за локусом MCW0123.

За кожним з маркерів визначено показник інформаційного поліморфізму (PIC), який характеризує дискримінаційну здатність маркеру й, фактично, залежить від кількості алелів у локусі, а також від розподілу їх частот, тобто є еквівалентом генного різноманіття.

Так як значення PIC залежить від частоти зустрічальності алеля, то слід очікувати, що в різних дослідних популяціях величина інформативної цінності використаних маркерів буде різною. За результатами досліджень з'ясовано, що до найбільш інформативних ($PIC \geq 0,5$) локусів відносяться MCW0034, ADL0268, MCW0104, MCW0123 (за винятком субпопуляції Г-4) та LEI0166 (за винятком субпопуляції С), до найменш інформативних локусів – LEI094 (рис. 4.6).

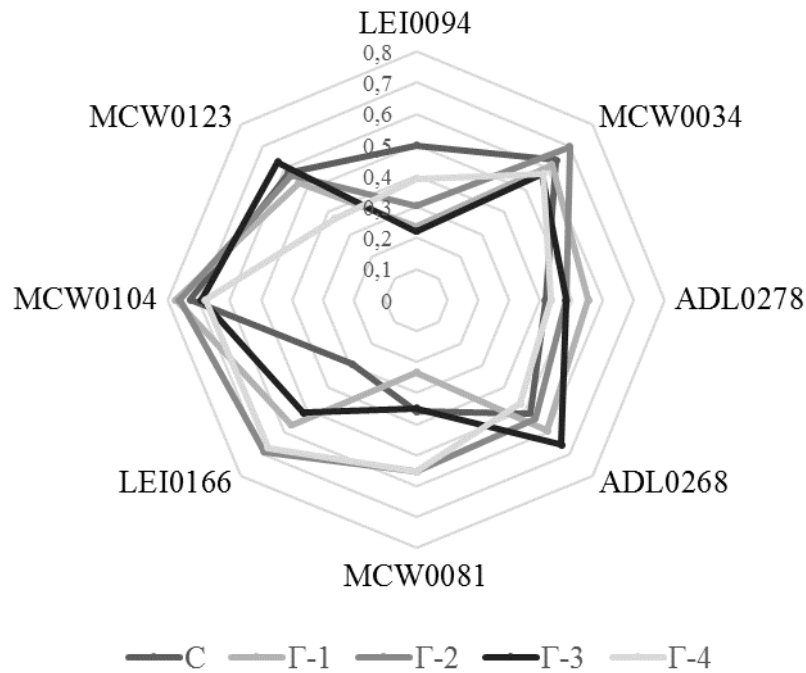
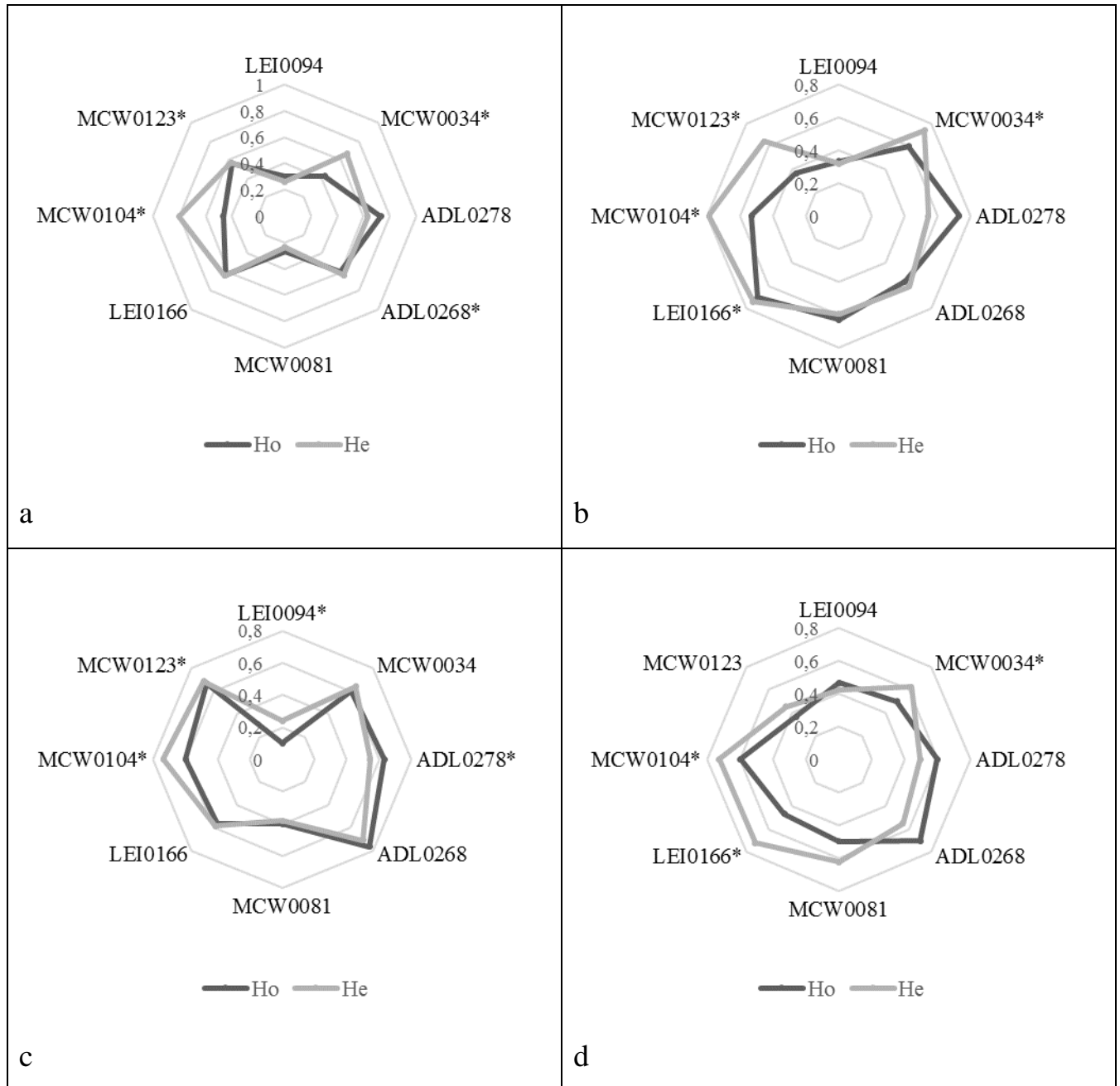


Рис. 4.6 Значення F_{is} у дослідних субпопуляціях м'ясо-яєчних курей

За співвідношенням очікуваної та фактичної гетерозиготності з усіх субпопуляцій найбільш вирівняними є Г-1 та Г-3. В Г-1 показник F_{is} приймає негативне значення у локусах LEI0094 (-0,16), ADL0278 (-0,16) та MCW0081 (-0,12), що вказує на наявність ексцесу гетерозигот ($p_{\chi^2} < 0,05$). За рештою локусів значення F_{is} – позитивні та досягають максимуму в локусах MCW0034 (0,36) й MCW0104 (0,42).

У свою чергу в субпопуляції Г-2 картина дещо зміщена в бік більшої кількості гомозиготних особин у популяції (інбридинг). Негативне значення F_{is} відзначено тільки для локусу ADL0278 (-0,35; $p_{\chi^2} > 0,05$). При цьому дефіцит гетерозиготних особин ($p_{\chi^2} < 0,01$) спостерігався для локусів MCW0034 (0,19), MCW0104 (0,33) та MCW0123 (0,43).

У субпопуляції Г-3 відмічена найбільш подібна картина співвідношення показників гетерозиготності. Серед істотних відхилень від рівноважного стану за Харді-Вайнбергом слід відмітити розподіл частот алелів для локусів ADL0278 ($F_{is} = -0,16$), MCW0104 ($F_{is} = 0,19$) та LEI0094 ($F_{is} = 0,58$) (рис. 4.7).



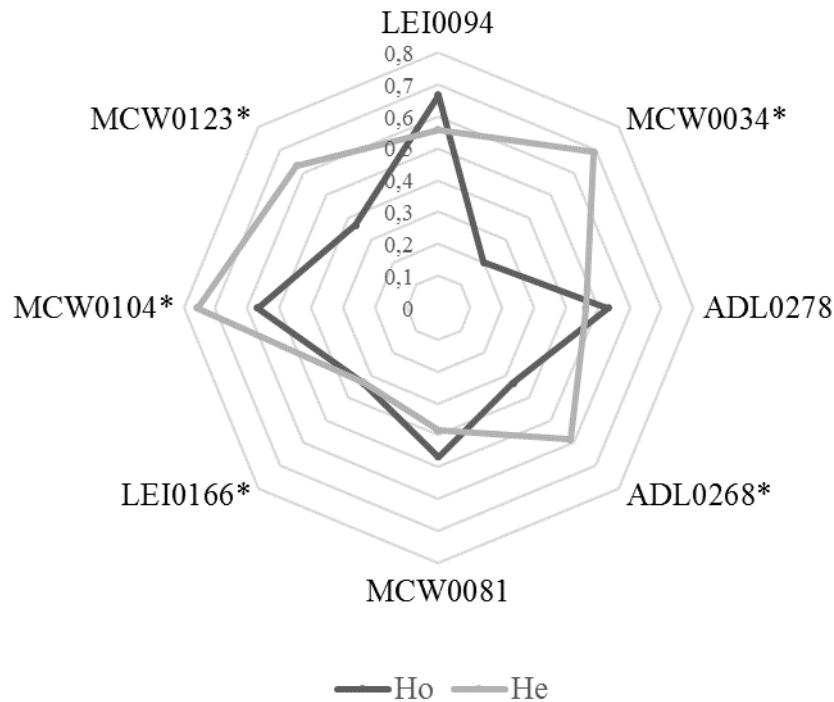
Примітка: * – достовірність відмінностей між показниками, $p_{\chi^2} < 0,05$.

Рис. 4.7 Показники очікуваної (H_e) та фактичної (H_o) гетерозиготності в дослідних субпопуляціях курей. а – субпопуляція Г-1; б – субпопуляція Г-2; с – субпопуляція Г-3; d – субпопуляція Г-4

У субпопуляції Г-4 встановлено тенденцію до збільшення гетерозиготних особин ($F_{is} < 0$, $p_{\chi^2} > 0,05$) для локусів LEI0094 (-0,10), ADL0278 (-0,21), ADL0268 (-0,27) та зміщення рівноваги в бік гомозигот за локусами

MCW0034 (0,20), MCW0081 (0,20; $p_{\chi^2} > 0,05$), LEI0166 (0,35), MCW0104 (0,18) та MCW0123 (0,19; $p_{\chi^2} > 0,05$).

Серед усіх дослідних груп субпопуляція С, за співвідношенням показників гетерозиготності, є найбільш контрастною (рис. 4.8).



Примітка: * – достовірність відмінностей між показниками, $p_{\chi^2} < 0,05$.

Рис. 4.8 Показники очікуваної (H_e) та фактичної (H_o) гетерозиготності в субпопуляції С

У цієї групи курей негативні значення F_{is} виявлено для локусів LEI0094 (-0,19), ADL0278 (-0,15) та MCW0081 (-0,21), проте вони знаходились у межах статистичної похибки ($p_{\chi^2} > 0,05$). Позитивні – для MCW0034 (0,710), ADL0268 (0,43), MCW0104 (0,25) та MCW0123 (0,42).

Таким чином, за результатами аналізу середніх значень показників H_e , H_o і F_{is} , можна відзначити, що в кожній із дослідних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей простежується тенденція до редукції гетерозиготних особин ($F_{is} > 0$). При цьому в субпопуляції С вона найбільш виражена (15,6 %), для решти –

знаходиться в межах 5,4–7,6 % ($p_{\chi^2} > 0,05$). Подібна картина вказує на поступове збільшення ступеня інбредності дослідних популяцій, що, у свою чергу, свідчить про використання в селекційному процесі близькоспоріднених схрещувань.

Окремо для кожного маркеру, а також для середніх значень за сукупністю локусів, розраховували показники F-статистик Райту. Середнє значення показнику F_{st} за використанням восьми мікросателітних локусів становило 0,092. При цьому найбільше значення виявлено для локусу LEI0166, найменше – для ADL278.

Середнє значення показнику F_{st} , який характеризує міжсубпопуляційні відмінності за всіма визначеними локусами в усіх дослідних лініях свідчить про те, що 9,2 % загальної генетичної мінливості є розподіленою між субпопуляціями й 90,8 % – всередині субпопуляцій (табл. 4.3). Отже, більша частина виявленої генетичної мінливості припадає на внутрішньопопуляційну складову.

Таблиця 4.3

**Показники F-статистики за 8 мікросателітними локусами
в дослідних субпопуляціях курей**

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}
LEI0094	-0,036	0,035	0,069
MCW0034	0,307	0,370	0,091
ADL0278	-0,206	-0,162	0,037
ADL0268	0,040	0,150	0,115
MCW0081	-0,018	0,071	0,087
LEI0166	0,106	0,228	0,137
MCW0104	0,275	0,350	0,103
MCW0123	0,219	0,297	0,100
У середньому ($M \pm m$)	0,086 \pm 0,062	0,167 \pm 0,064	0,092 \pm 0,011

За винятком ADL0278 значення індексу фіксації узагальненої популяції м'ясо-яєчних курей (F_{it}) вказують на достатньо виражений дефіцит гетерозиготних особин за кожним із локусів (табл. 4.3). F_{it} – це коефіцієнт інбридингу особини відносно всієї популяції без урахування її внутрішньої структури. Приймаючи до уваги, що досліджувані субпопуляції лише умовно можна прийняти як підрозділені частини однієї породи курей, більш інформаційним є показник F_{is} , що відображає співвідношення H_e і H_o в межах кожної сублінії.

Як вказують у представленій таблиці дані, внесок кожного локусу в показник міжпопуляційної мінливості дещо різниться. Значення, що характеризують середній рівень дивергенції, знаходяться у межах 0,06–0,15; чому відповідають всі локуси за виключенням ADL0278 ($F_{st} = 0,037$). Отже, якщо порівняти досліджені локуси з незалежними повтореннями субпопуляцій курей, то, спираючись на величину коефіцієнта F_{st} та його похибку ($0,092 \pm 0,011$), можна стверджувати про середній рівень дивергенції в підрозділеній популяції. Між тим, якщо дослідні лінії курей не є частинами одного цілого (як за визначенням має бути в підрозділеній популяції), проте мають спільне походження від однієї предкової породи курей (створені на основі гібридизації), проведено оцінку рівня спорідненості субпопуляцій на основі визначення генетичних дистанцій.

На основі отриманих даних щодо особливостей генетичної структури дослідних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей розраховували значення показників генетичних дистанцій та генетичної подібності між дослідними групами.

За результатами досліджень встановлено, що найбільш генетично віддаленими є субпопуляції Г-1 та Г-4 (28,8 % відмінностей), в той час як найбільш подібними – субпопуляції Г-2 та Г-3 (13,3 % відмінностей).

Дані за значенням генетичних дистанцій за N_{ei} приведено у табл. 4.4.

**Генетичні дистанції та генетична подібність субпопуляцій
м'ясо-яєчних курей**

Субпопуляції	Г-1	Г-2	Г-3	Г-4	С
Г-1	***	0,158	0,207	0,288	0,253
Г-2	0,854	***	0,133	0,154	0,153
Г-3	0,813	0,876	***	0,204	0,232
Г-4	0,750	0,857	0,816	***	0,176
С	0,776	0,858	0,793	0,839	***

Примітка: генетичні дистанції зображені над діагоналлю; генетична подібність – під діагоналлю.

Результати власних досліджень підтверджуються загальною структурою філогенетичного дерева, що побудовано на підставі значень генетичних дистанцій за Nei за використання методу незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA).

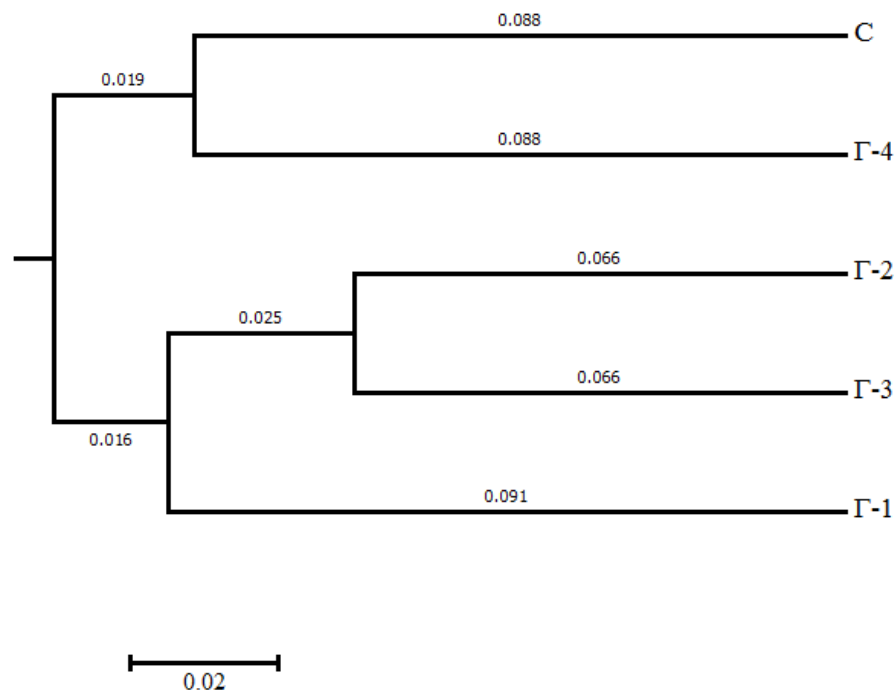


Рис. 4.9 Дендрограма міжпопуляційних взаємин, побудована на основі аналізу генетичних дистанцій за Nei методом незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA)

У цілому при аналізі дендрограми можна відзначити, що топологія дерева відповідає описаним вище закономірностям та відображає виявлені відмінності/подібності дослідних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей. Субпопуляції Г-2 та Г-3, а також субпопуляції Г-4 та С формують два окремих кластери. При цьому кластер Г-2 + Г-3 формується з більшого кластеру з Г-1.

Для порівняльного аналізу приведемо дендрограму, що побудована за використання методу приєднання сусідів (Neighbor-Joining) (рис. 4.10).

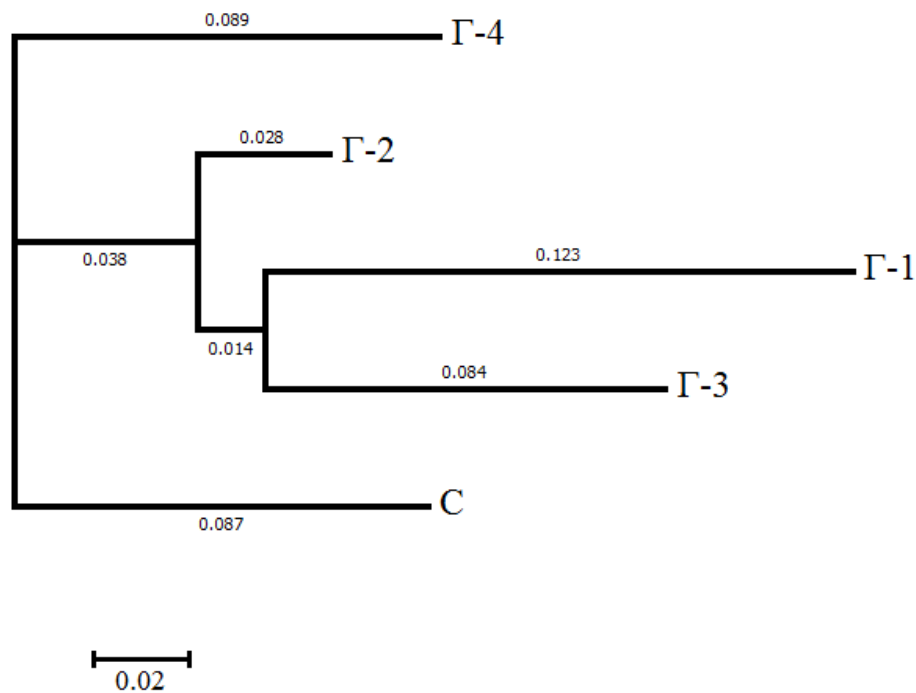


Рис. 4.10 Дендрограма міжпопуляційних взаємин, побудована на основі аналізу генетичних дистанцій за Nei методом приєднання сусідів (Neighbor-Joining)

Як свідчать результати досліджень структура філогенетичного дерева, що побудована за використання алгоритму Neighbor-Joining досить суттєво відрізняється від вищенаведеної. В обох випадках субпопуляції Г-1, Г-2 та Г-3 формують окремий комплексний кластер. У свою чергу, субпопуляції Г-4 та С, створюють окремі гілки, в той час як при використанні алгоритму UPGMA вони об'єднуються в окремий кластер.

Отже, як результат проведених досліджень з вивчення особливостей генетичного диференціювання різних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей

української селекції з використанням восьми мікросателітних маркерів виявлено суттєві міжпопуляційні розбіжності (що відповідають середньому ступеню дивергенції) в дослідних групах курей, що, перш за все, відображає спільність їх походження та інтенсивність селекційної роботи, що проводилась.

4.3 Генетична диференціація популяцій курей ліній 02 та 38 породи род-айленд червоний

За використання 8 мікросателітних маркерів LEI0094, MCW0034, ADL0278, ADL0268, MCW0081, LEI0166, MCW0104 та MCW0123 провели порівняльний аналіз генетичної структури популяцій курей ліній 02 та 38 породи род-айленд червоний (рис. 4.11).

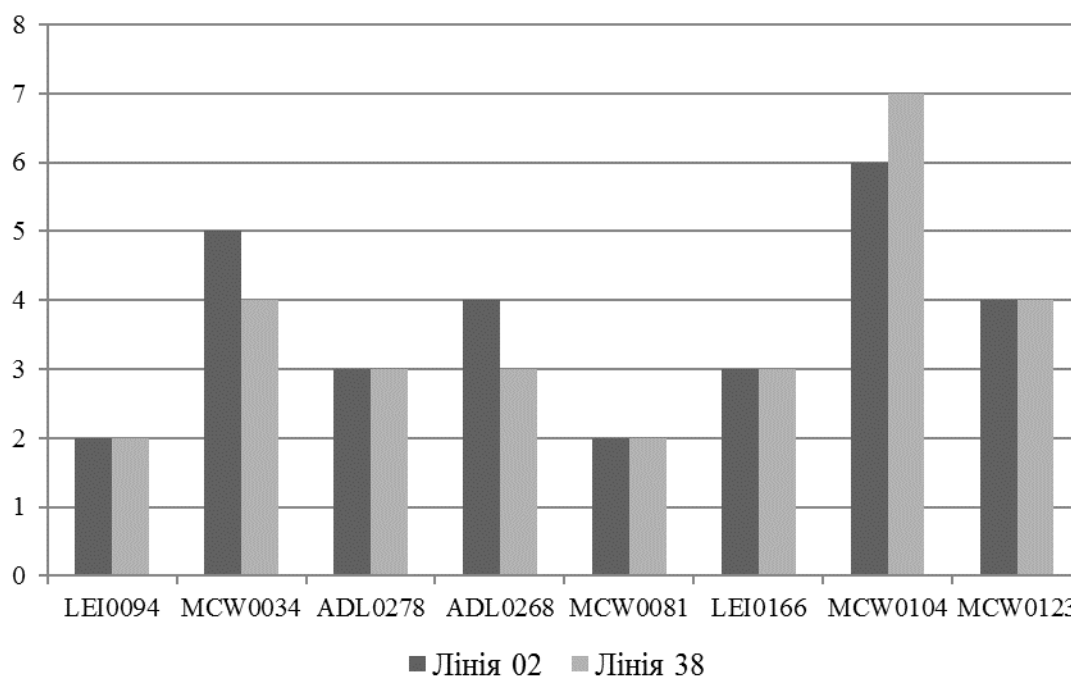


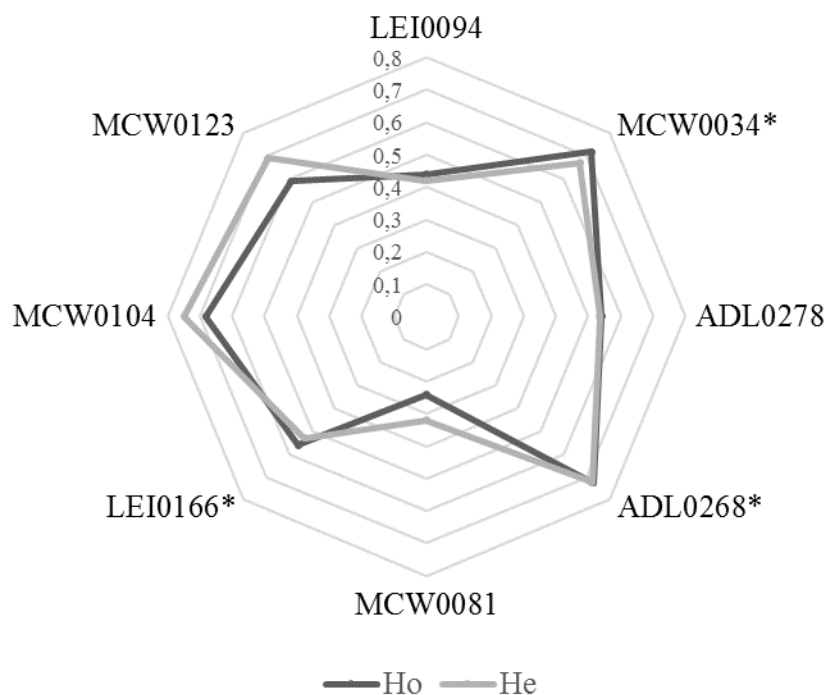
Рис. 4.11 Співвідношення кількості алелів за вивченими мікросателітними локусами у популяціях курей ліній 02 та 38 породи род-айленд червоний

За кількістю алелів на локус, лінії, що порівнюються, в цілому дуже схожі. Для лінії 02 визначено 29 алелів за сукупністю маркерів, для лінії 38 – 28. Мінімальну кількість алелів на локус для обох ліній виявлено для LEI094 (2)

та MCW081 (2); максимальну – для MCW104 (6 для лінії 02 та 7 для лінії 38) (рис. 4.11).

За значеннями показнику інформаційного поліморфізму (PIC) у дослідній лінії курей (лінія 02) загальна кількість високоінформативних маркерів становила $\sim 50\%$ від загальної кількості. Отже, до високоінформативних маркерів відносяться ADL0268 (0,67), MCW0034 (0,63), MCW0104 (0,71) та MCW0123 (0,63).

За співвідношенням очікуваної (H_e) та фактичної (H_o) гетерозиготності дослідна лінія курей досить «вирівняна» (рис. 4.12). Показник F_{is} приймає негативне значення в локусах LEI0094 (-0,05), LEI0166 (-0,05) та MCW0034 (-0,07). У локусах MCW0081, MCW0104 та MCW0123 відмічено надлишок гомозигот (0,25; 0,09 та 0,15 відповідно). Однак достовірними можна вважати відхилення від рівноважного стану лише для локусів MCW0034, ADL0268 та LEI0166.



Примітка: * – достовірність відмінностей між показниками, $p_{\chi^2} < 0,05$.

Рис. 4.12 Показники очікуваної (H_e) та фактичної (H_o) гетерозиготності в лінії 02 породи род-айленд червоний

Середнє значення показнику F_{is} становило 0,04; що вказує на рівноважний стан дослідної лінії, а також свідчить про відсутність впливу основних мікроеволюційних чинників на зміну частот алелів, що пов'язані з селекційно-племінною роботою (розведення в собі). Середні значення показників очікуваної та фактичної гетерозиготності практично співпадають. В свою чергу для лінії 38 середнє значення F_{is} становило -0,026; що також свідчить про рівноважний стан популяції. Достовірне відхилення від рівноважного стану в лінії 38 породи род-айленд червоний виявлено тільки для локусу MCW0104 ($F_{is} = -0,194$). За всіма іншими локусами відхилення від рівноважного стану неістотні.

При порівнянні з лінією 38 значення показнику F_{st} дорівнювало 0,027; тобто тільки 2,7 % загальної генетичної мінливості за всіма локусами обумовлено міжлінійними відмінностями та 97,3 % приходить на внутрішньолінійну складову. Значення F_{st} вказує на слабку дивергенцію між лініями 02 та 38 породи род-айленд червоний (менше порогового значення в 0,05).

Незначний ступінь генетичної диференціації дослідних ліній доводить також і значення генетичної дистанції за Nei. Так, величина генетичної дистанції між лініями 02 та 38 дорівнює 0,079; в той час як показник генетичної схожості (подібності) – 0,924. Отже, між лініями спостерігаються 7,9 % відмінностей, виявлених за особливостями розподілу алельних частот поліморфних мікросателітних локусів. Слід відзначити, що серед усіх вивчених ліній курей різних порід генетичні дистанції між лініями 02 та 38 мінімальні, що говорить про їх високу генетичну спорідненість.

З урахування отриманих експериментальних даних з розподілу частот алелів різних мікросателітних локусів проаналізували генетичну диференціацію всіх дослідних ліній курей. Для проведення аналізу використовували сукупність локусів, що були вивчені у всіх дослідних популяціях курей (LEI0094, MCW0034, ADL0278, ADL0268, MCW0081, LEI0166, MCW0104 та MCW0123). На основі отриманих даних щодо особливостей генетичної структури дослідних ліній курей різних порід розраховували значення показників генетичних дистанцій і генетичної подібності між дослідними

групами. За результатами проведених досліджень з'ясовано, що лінія А максимально віддалена від лінії 38 (56,7 % відмінностей). При порівнянні лінії А з м'ясо-яєчними субпопуляціями максимальні відмінності відмічені з лінією С (48,6 %), мінімальні – з лінією Г-2 (33,7 %). В свою чергу, лінія 14 максимально відрізняється від лінії 38 (37,9 %), мінімально – від Г-1 (23,6 %). Відносно всіх інших дослідних популяцій курей лінії 02 та 38 породи род-айленд червоний демонструють мінімальні розбіжності (генетична дистанція склала 7,9 %).

На основі отриманої матриці генетичних дистанцій провели філогенетичний аналіз ліній за використання різних алгоритмів класифікації. На рис. 4.13 представлено дендрограму, що побудована за використання методу незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA).

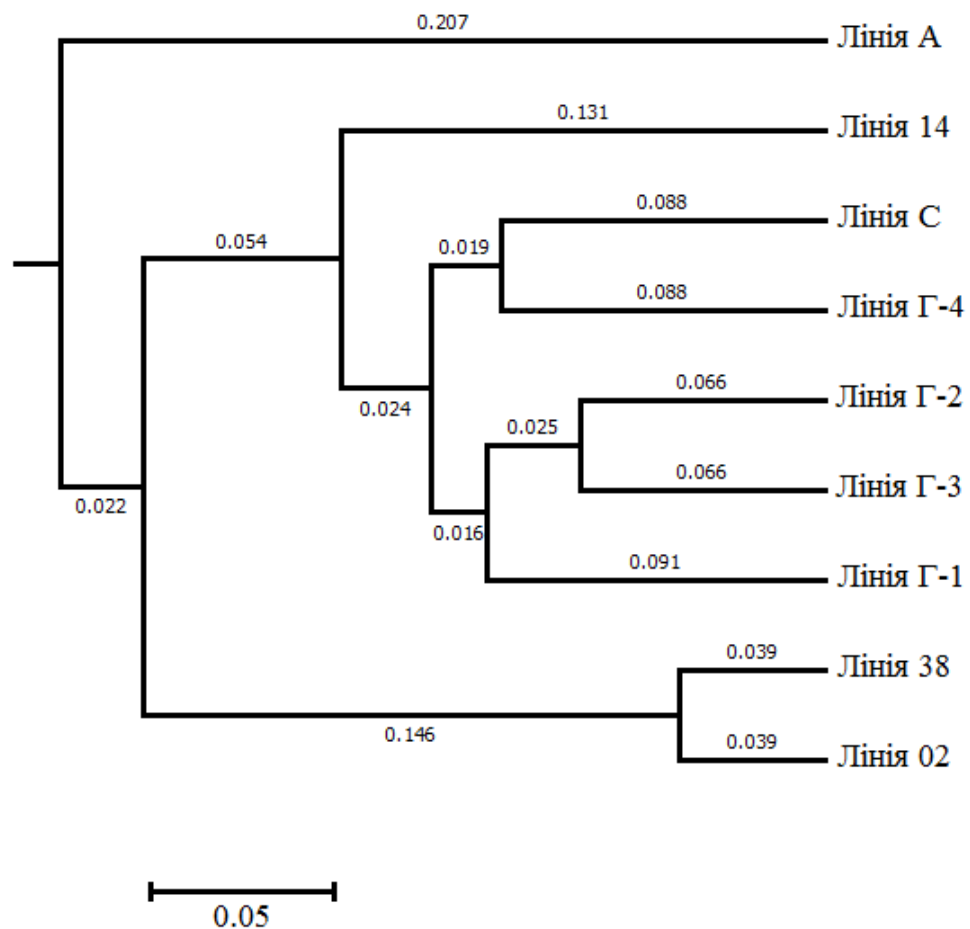


Рис. 4.13 Дендрограма міжпопуляційних взаємин, побудована на основі аналізу генетичних дистанцій за Nei методом UPGMA

Як вже було зазначено, необхідною умовою використання цього алгоритму є постійна швидкість еволюції дослідних нуклеотидних послідовностей (відповідність моделі молекулярного годиннику). Структуру філогенетичного дерева в цілому можна розглянути як кількість «еволюційних подій» (мутацій), які відбувалися в дослідних лініях курей порівняно з предковою формою. Найбільш близькими змінами в алельній структурі дослідних мікросателітних локусів характеризувалися лінії курей 02 та 38 породи род-айленд червоний, що увійшли в один кластер.

П'ять ліній курей породи плімутрок білий об'єднані в два субкластери з довжиною гілок 0,66–0,91, до яких найбільш близькою є лінія курей породи полтавська глиняста. Ї, в решті решт, окрема гілка з максимальною довжиною (0,207) обумовлена найбільшими відмінностями в алельному складі мікросателітів є властивою популяції курей яєчного напрямку продуктивності – породі бірківська барвиста (лінія А).

При використанні як основи розрахунків алгоритму Neighbor-Joining загальна топологія дерева дещо змінюється (рис. 4.14).

Окремі гілки утворюють вже дві лінії – породи бірківська барвиста (лінія А) та полтавська глиняста (лінія 14). Лінія А, як і раніше, характеризується максимальною довжиною гілки, що дорівнює 0,252. Обидві лінії род-айленду червоного утворюють перший кластер з найменшою генетичною дистанцією, до якого приєднується лінія м'ясо-яєчних курей Г-1. Решта субпопуляцій м'ясо-яєчних курей організовані в окремий кластер з 4 ліній методом послідовних приєднань (рис. 4.14).

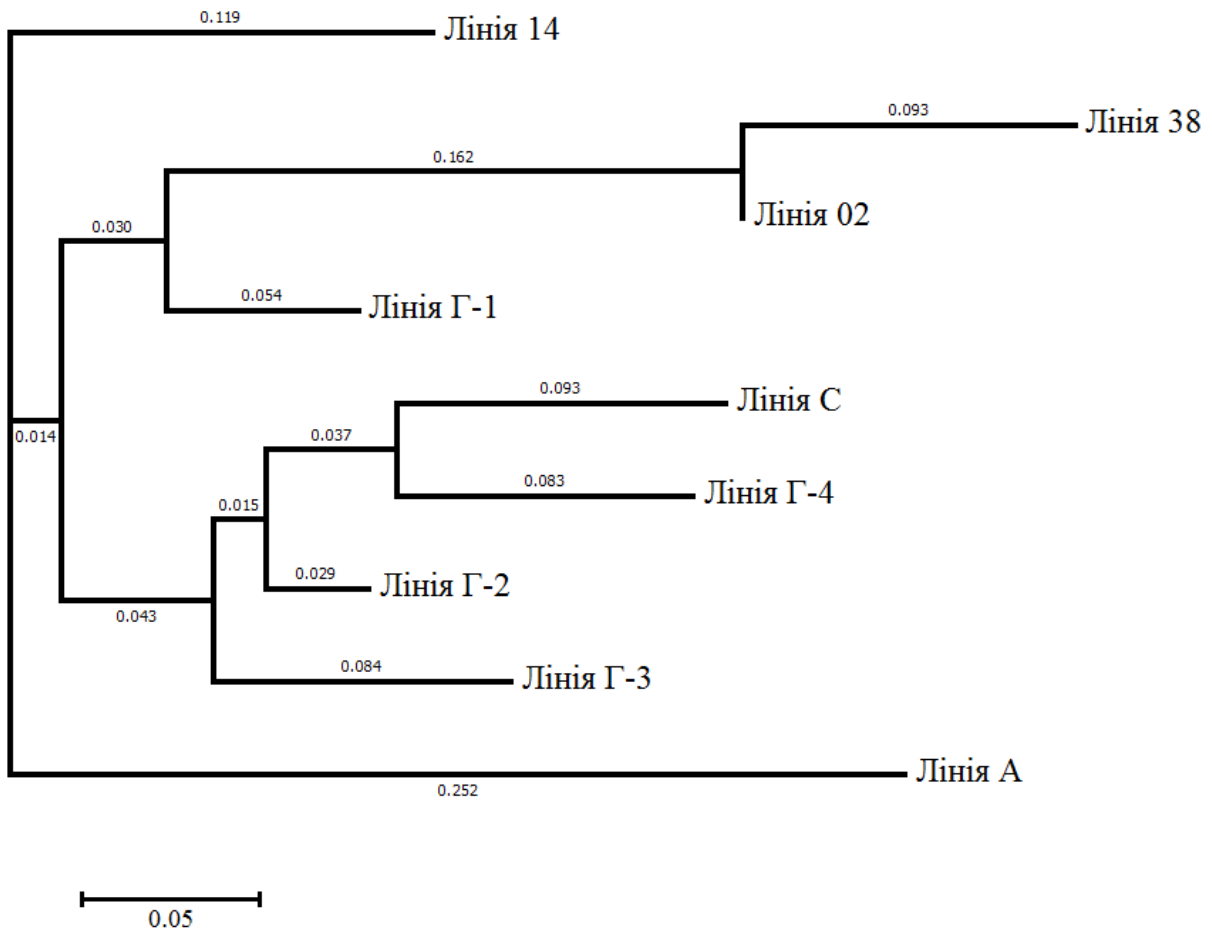


Рис. 4.14 Дендрограма міжпопуляційних взаємин, побудована методом NJ

В цілому можна відмітити, що за виключенням лінії Г-1, загальна топологія дерева, що побудовано за використання методу близького сусіда, достатньо точно відображає закономірності напряму продуктивності птиці й, приймаючи до уваги факт проведення селекційної роботи, а також відсутність необхідності відповідно гіпотези молекулярного годиннику, більш об'єктивно відображає філогенетичні взаємини між дослідними лініями курей.

Матеріали досліджень розділу викладено у наукових публікаціях [433–435].

РОЗДІЛ 5

ПОЛІМОРФІЗМ ЛОКУСІВ КІЛЬКІСНИХ ОЗНАК У ПОПУЛЯЦІЯХ КУРЕЙ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Мета сучасної селекції у птахівництві – створення високопродуктивних порід і ліній птиці за основними напрямками продуктивності – м'ясному, яєчному та комбінованому (м'ясо-яєчному та яєчно-м'ясному). У зв'язку з цим, різними методами досліджуються генотипи порід та ліній птиці з метою виявлення високоспецифічних маркерів несучості та м'ясних якостей. Виявлення низки молекулярно-генетичних маркерів дасть змогу проводити селекцію птиці на принципово нових засадах, що потенційно різко посилить інтенсивність селекції та сприятимуть максимально ефективному розкриттю її продуктивного потенціалу.

Перший крок у цьому напрямку – вивчення поліморфізму різних цільових генів у дослідних популяціях курей. Найбільше значення мають гени, продукти яких пов'язані з забезпеченням основних фізіологічних функцій організму. Виявлення поліморфних локусів, алельні варіанти яких пов'язані з проявом господарсько-корисних ознак, зумовить у подальшому безпосередньо проводити маркер-асоційовану селекцію птиці (MAS). В цьому контексті мають значення тільки поліморфні варіанти, тому виявлення поліморфізму будь-якого локусу, по суті, є передумовою для всієї наступної роботи. У представленому розділі дисертаційної роботи розглянемо питання поліморфізму локусів пролактину (*PRL*), гормону росту (*GH*), рецептору пролактину (*PRLR*), рецептору гормону росту (*GHR*), гіпофізарного фактору транскрипції 1 (*PIT-1*), родини трансформуючих ростових факторів бета (*TGF-β1*, *TGF-β2* і *TGF-β3*), інсуліноподібного ростового фактору I (*IGF-I*) та Mx гену (*Mx*) в популяціях курей української селекції порід бірківська барвиста (лінія А), полтавська глиняста (лінія 14), плімутрок білий (лінія Г-2) та род-айленд червоний (лінія 38).

5.1 Поліморфізм гену пролактину за наявності інсерції розміром 24 п.н. у промоторній ділянці

Поліморфізм гену пролактину в промоторній ділянці пов'язаний із наявністю (або відсутністю) інсерції розміром у 24 п.н., що приводить до утворення двох алельних варіантів – I (утримує інсерцію) та D (делеція, без інсерції).

На рисунку 5.1 представлена електрофореграма продуктів ампліфікації промоторної ділянки гену пролактину.

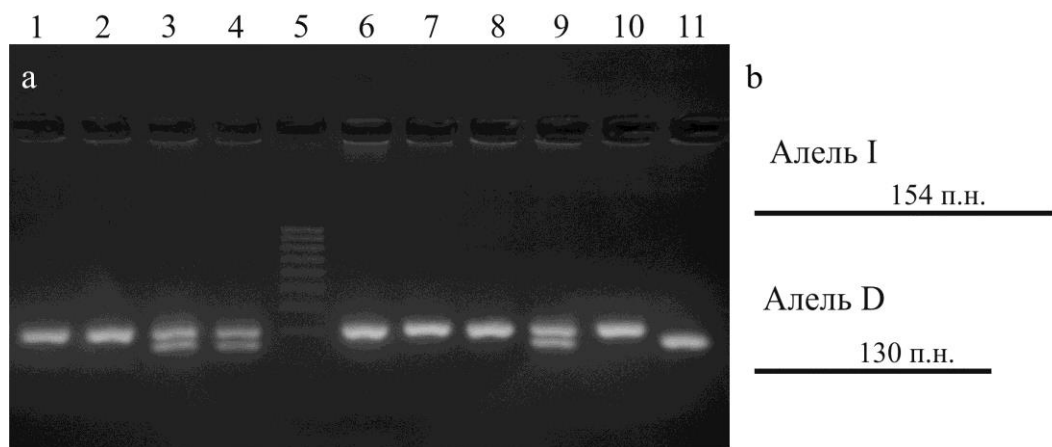


Рис. 5.1 Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагменту промотору гену пролактину (а). Схема відповідних алелів (b).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1, 2, 6, 7, 8, 10 – II; 3, 4, 9 – ID; 11 – DD; 5 – маркер молекулярних мас М-50.

Генотип II представлений на електрофореграмі фрагментом розміром 154 п.н., DD – 130 п.н., ID – 130 та 154 п.н.

Як слідує з результатів досліджень, ген пролактину, за наявності інсерції в промоторній ділянці, є поліморфним у популяціях курей порід білий плімутрок, бірківська барвіста (у наявності особини всіх трьох можливих генотипів – II, ID та DD) та Род-айленд червоний (у наявності особини з генотипами ID та DD). Однак у лінії курей породи полтавська глиняста виявлені виключно особини з генотипом DD, особин інших генотипів не

виявлено, що вказує на мономорфний характер цього локусу у дослідній популяції (рис. 5.2).

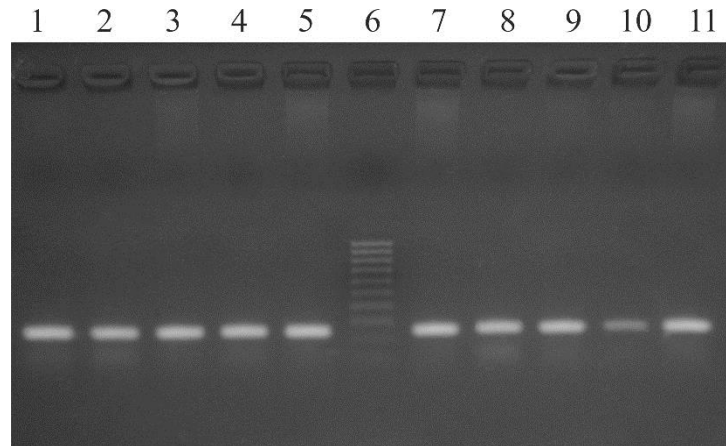


Рис. 5.2 Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагменту промотору гену пролактину у курей породи полтавська глиняста.

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1–5, 7–11 – DD; 6 – маркер молекулярних мас М-50.

Генетична структура дослідних популяцій курей наведена у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Генетична структура популяції курей різного напрямку продуктивності за локусом пролактину (24 Indel)

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		II	ID	DD	I	D	
Плімутрок білий	O	3	21	76	0,135	0,865	1,03
	E	1,82	23,36	74,82			
Бірківська барвиста	O	50	46	4	0,73	0,27	2,78
	E	53,29	39,42	7,29			
Полтавська глиняста	O	0	0	100	0	1	-
	E	-	-	-			
Род-айленд червоний	O	0	11	89	0,06	0,94	0,372
	E	0,36	11,28	88,36			

Частоти алелів І та D у популяціях курей м'ясо-яєчного (лінія Г-2), яєчного (лінія А) та яєчно-м'ясного (лінія 14 та 38) напрямів продуктивності істотно різняться ($p < 0,001$). Так, у м'ясо-яєчної птиці лінії Г-2 більшість особин утримує делецію у гомозиготному або гетерозиготному стані (відповідно 76 та 21 особина), при цьому кількість гомозигот за інсерцією – загалом 3. У яєчної птиці лінії А кількість гомозигот та гетерозигот за інсерцією становить відповідно 50 та 46 особин, у той час як кількість гомозигот за делецією – 4. Відмінності за частотою алелів у лініях високодостовірні ($p < 0,001$).

У популяції курей породи род-айленд червоний превалюють особини гомозиготні за алелем D. У лінії Г-2 виявлено знижену кількість гетерозигот порівняно з теоретично очікуваним, а у лінії А – підвищену, однак генетична рівновага не порушена. У той же час у популяції яєчно-м'ясних курей лінії 14 цей локус за наявності інсерції виявився мономорфним (частота алелю D склала 1), що різко відрізняє досліджену популяцію від решти. У свою чергу, популяція яєчно-м'ясних курей породи род-айленд червоний, за співвідношенням частот генотипів та алелів займає проміжне положення між лініями Г-2 та 14.

Той факт, що в лінії А, порівняно з іншими лініями курей, наявна значно більша кількість особин гомозиготних за алелем І, узгоджується з даними окремих авторів про позитивний асоціативний зв'язок цього алелю з яєчною продуктивністю. Ймовірний механізм зв'язку інсерції в 24 п.н. у промоторній ділянці гену пролактину з яєчною продуктивністю птиці пов'язаний з можливими змінами у взаємодії з факторами активації транскрипції, що відповідно призводить до змін у характері прояву фенотипових ознак (несучість). Отже, у цілому, проаналізувавши розподіл частот алелів та генотипів за цим локусом можна відмітити істотні відмінності в генетичній структурі популяцій курей яєчного напрямку від комбінованого (м'ясо-яєчного та яєчно-м'ясного).

У таблиці 5.2 представлені основні показники генетичної мінливості дослідних популяцій курей за цим поліморфізмом у промоторному фрагменті гену пролактину.

Таблиця 5.2

Основні генетико-популяційні характеристики досліджених ліній курей за локусом пролактину

Порода курей	S_a	n_e	H_o	H_e	F_{is}
Плімутрок білий	0,766	1,31	0,21	0,234	0,09
Бірківська барвіста	0,606	1,65	0,46	0,394	-0,18
Полтавська глиняста	1	1	-	-	-
Род-айленд червоний	0,887	1,13	0,11	0,113	0,03

Найвищий рівень поліморфності, що відповідає максимальному значенню показника ефективного числа алелів за дослідним локусом, характерний для популяції яєчних курей (1,65), найменший – для яєчно-м'ясних ліній 38 (1,13). У лінії А в наявності достатньо виражений ексцес гетерозигот, однак для інших популяцій це не є характерним (значення індексу фіксації Райта позитивні та майже не відрізняються від нульового значення). Так як у популяції курей породи полтавська глиняста цей локус є мономорфним, то показники генетичної мінливості для нього не розраховуються.

5.2 Однонуклеотидний поліморфізм у положенні -2402 гену пролактину (С-2402Т)

Поліморфізм гену пролактину в цьому випадку пов'язаний з транзицією цитозину в тимін у положенні -2402, що призводить до утворення двох алелів С

та Т. Кодування алелів визначається наявністю цитозину або тиміну в сайті рестрикції для AluI.

На рисунку 5.3 представлено електрофореграму продуктів рестрикції фрагменту гену пролактину (С-2402Т).

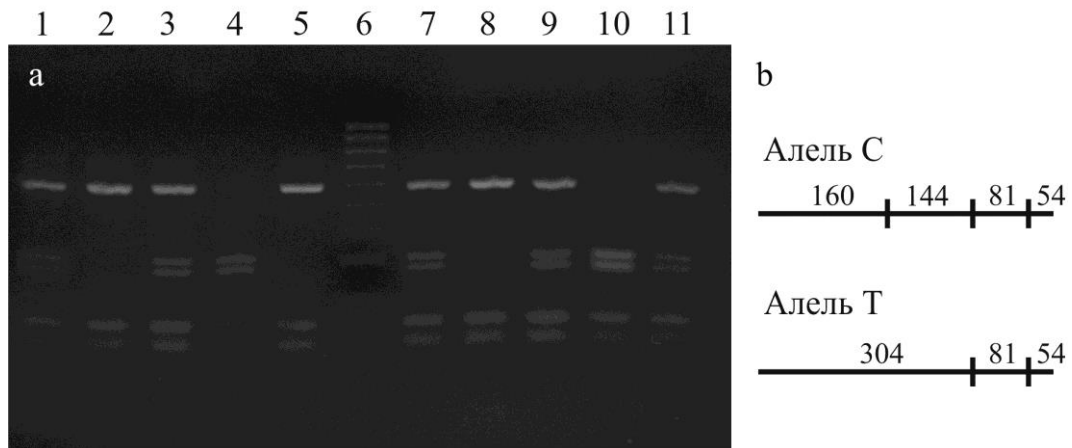


Рис. 5.3 Електрофореграма продуктів рестрикції гену пролактину (а).
Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (б).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 2, 5, 8 – ТТ; 4, 10 – СС; 1, 3, 7, 9, 11 – СТ;
б – маркер молекулярних мас М-50.

На відміну від Indel-поліморфізму промоторної ділянки гену в усіх дослідних популяціях курей локус пролактину за наявністю однонуклеотидного поліморфізму в положенні -2402 виявився поліморфним. В усіх лініях курей у наявності особини трьох можливих генотипів: СС, СТ та ТТ. Слід відмітити, що поряд з поліморфним сайтом, кожний із ампліфікованих фрагментів містить в своєму складі й мономорфний сайт для AluI, що й призводить до подібної картини розподілу рестрикційних фрагментів на електрофореграмі (мінімальна кількість фрагментів – 3 у випадку генотипу ТТ).

Частоти алелів С та Т у досліджених лініях курей різних напрямів продуктивності характеризуються низкою істотних відмінностей.

Генетична характеристика ліній за частотою однонуклеотидних замін у положенні -2402 гену пролактину в лініях курей яєчного та м'ясо-яєчного

напрямів продуктивності, які порівнюються, несуттєво відрізняється від генетичної структури за наявності інсерції/делеції. В лінії А, порівняно з Г-2, дещо збільшена кількість гетерозигот та зменшена кількість гомозигот, однак генетична рівновага не порушена. Відмінності між лініями за частотою однойменних алелів достовірні за високого рівня значущості ($p < 0,001$) (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

**Генетична структура дослідних ліній курей за наявністю
однонуклеотидного поліморфізму в локусі пролактину (С-2402Т)**

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		СС	СТ	ТТ	С	Т	
Плімутрок білий	О	2	27	71	0,155	0,845	0,093
	Е	2,40	26,20	71,40			
Бірківська барвиста	О	52	45	3	0,745	0,255	3,390
	Е	55,50	38,00	6,50			
Полтавська глиняста	О	12	52	36	0,380	0,620	1,060
	Е	14,44	47,12	38,44			
Род-айленд червоний	О	2	24	74	0,140	0,860	0,001
	Е	1,96	24,08	73,96			

В той же час у лінії 14 яєчно-м'ясних курей ген пролактину за показником, що досліджено, є поліморфним на відміну від 24 Indel. При цьому за частотою алелів ця популяція займає проміжне положення між лініями Г-2 та А. Кількість гетерозиготних особин максимальна (52) серед усіх популяцій, що були вивчені (табл. 5.3). Ця лінія курей також заходить у стані генетичної рівноваги. Популяція курей породи род-айленд червоний за співвідношенням частот алелів та генотипів максимально близька до лінії м'ясо-яєчних курей,

при цьому характеризується максимальною кількістю особин, які гомозиготні за алелем T.

У табл. 5.4 представлено основні показники генетичної мінливості дослідних популяцій курей за поліморфізмом, що було вивчено.

Таблиця 5.4

Основні генетико-популяційні характеристики ліній курей за локусом пролактину (C-2402T)

Порода курей	S_a	n_e	H_o	H_e	F_{is}
Плімутрок білий	0,738	1,35	0,27	0,262	-0,03
Бірківська барвиста	0,621	1,61	0,45	0,379	-0,19
Полтавська глиняста	0,529	1,89	0,52	0,471	-0,11
Род-айленд червоний	0,759	1,32	0,24	0,241	0,004

Аналіз спостережених та очікуваних розподілів генотипів у вибірці в цілому довів наявність певного ексцесу гетерозигот у популяціях курей ліній 14 та А. У той же час в лініях Г-2 та 38 значення фактичної та теоретичної гетерозиготності практично співпадають. Найбільший рівень поліморфності характерний для полтавських курей, найменший – для лінії Г-2.

Беручи до уваги зв'язок розглянутих мутацій в локусі пролактину з яєчною продуктивністю курей, вказаних в роботах закордонних науковців, було проведено аналіз розподілу частот гаплотипів пролактину за обома поліморфними сайтами у дослідних популяціях курей.

За результатами проведених досліджень з'ясовано, що повна нерівновага за зчепленням (complete LD) спостерігалась у випадку яєчних курей породи бірківська барвиста та яєчно-м'ясних – породи род-айленд червоний (в обох випадках значення стандартизованої міри нерівноваги D' становило 1). У

популяції яєчних курей суттєво більше особин з гаплотипом IC (0,82). У той же час, в популяції курей породи род-айленд червоний, переважають особини з гаплотипом DT (0,86). У лінії Г-2 м'ясо-яєчних курей також превалюють особини з гаплотипом DT (0,72), однак значення D' в цієї популяції становило 0,72; що достатньо суттєво перевищує межу значимості у 50 %.

У таблиці 5.5 наведено дані щодо структури та частоти зустрічальності в дослідних популяціях курей різних типів гаплотипів за локусом пролактину.

Таблиця 5.5

Розподіл частот гаплотипів за локусом пролактину в дослідних популяціях курей

Гаплотип	Поліморфізм		Порода курей			
	Indel	C-2402T	Плімутрок білий	Бірківська барвіста	Полтавська глиняста	Род-айленд червоний
1	I	C	0,01	0,76	-	0,03
2	I	T	0,11	0,06	-	0,02
3	D	C	0,14	0,06	-	0,11
4	D	T	0,74	0,12	-	0,84

Факт відхилення від стану генетичної рівноваги вказує на те, що співвідношення алелів, котрі формують гаплотип, не є випадковим та не визначається простим співвідношенням частот відповідних алельних варіантів окремих локусів. Тоді як для полтавських глинястих курей провести аналіз розподілу частот гаплотипів не представляється можливим внаслідок мономорфності за однією із мутацій (24 Indel). Перевага кількості особин з гаплотипом IC у популяції курей яєчного напрямку продуктивності підтверджується даними інших авторів про зв'язок однойменних алелів з підвищеними продуктивними якостями курей різних порід (несучість тощо).

Відбір, який проводиться методами класичної селекції у напрямі підвищення показників несучості птиці, супроводжувався насиченням дослідної популяції бажаними алелями I та C, які формують гаплотип, що й вплинуло на розподіл частот. Однак, можливість маскування небажаного гаплотипу (за відношенням до яєчної продуктивності) у гетерозиготному стані, що, в свою чергу, визначається кодомінантним типом успадкування, не дало змогу повністю елімінувати особин з непродуктивним гаплотипом із стада. Однак, факт тиску відбору в цьому випадку очевидний. У свою чергу, відсутність селекційного тиску в бік яєчної продуктивності відносно курей комбінованого напрямку продуктивності, ймовірно й призвела до з'ясованої ситуації (превалюванню частоти гаплотипу DT). У випадку з яєчно-м'ясними курями (лінія 38) спостерігається тенденція до превалювання кількості особин з гаплотипом DT, що також можна вважати опосередкованим результатом селекційної роботи, яка проводиться, та загальною збалансованістю лінії. Це підтверджується самими низькими серед вивчених популяцій значеннями показників гетерозиготності та ефективного числа алелів.

Слід зазначити, що перевага частоти гаплотипу DT також може бути результатом породної специфічності, яка може проходити у розріз із напрямом селекційної роботи. Також важливим є вірогідність породоспецифічності маркеру (тобто прояв асоціативного зв'язку із будь-якою ознакою у одній породі курей не обов'язково екстраполюється на інші породи). У будь-якому разі, питання про зв'язок досліджених алельних варіантів у гені пролактину з показниками продуктивності птиці різних ліній достатньо актуальне та буде викладене у відповідному розділі дисертаційної роботи.

5.3 MspI-поліморфізм у першому інтроні гену гормону росту

Поліморфізм гену гормону росту в першому інтроні пов'язаний з варіаціями кількості сайтів рестрикції для MspI, що призводить до утворення трьох алельних варіантів. Кожний із алелів містить один мономорфний сайт

рестрикції, при цьому максимальна кількість поліморфних сайтів спостерігається в алелі С.

На рисунку 5.4 представлено електрофореграму продуктів рестрикції першого інтрону гену гормону росту.

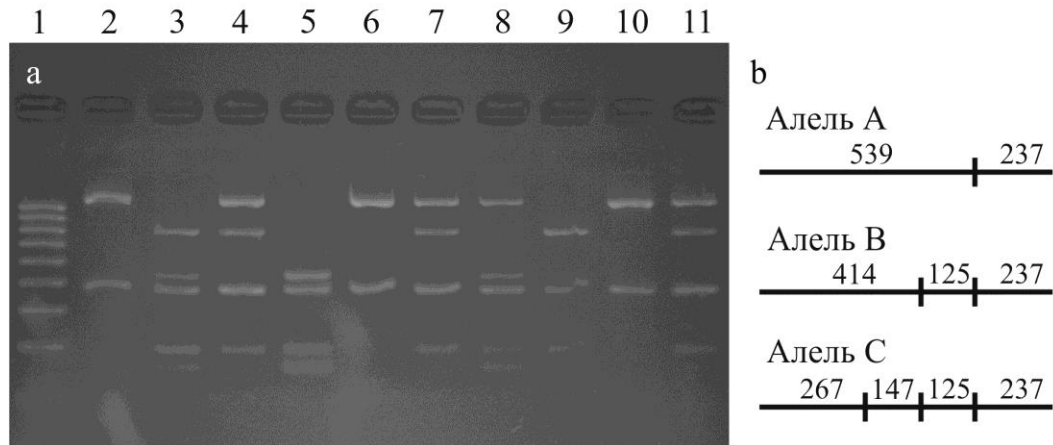


Рис. 5.4 Електрофореграма продуктів рестрикції першого інтрону гену гормону росту (а). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (б).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1 – маркер молекулярних мас М-50; 2, 6, 10 – АА; 3 – ВС; 4, 7, 11 – АВ; 5 – СС; 8 – АС; 9 – ВВ.

В усіх популяціях, що були вивчені, локус гормону росту за *MspI*-поліморфізмом у першому інтроні виявився поліморфним. В лінії Г-2 у наявності особини шести можливих генотипів (АА, ВВ, СС, АВ, АС, ВС); у лініях А та 38 – п'яти; у популяції полтавських курей – тільки трьох (рис. 5.4).

Генетичну структуру дослідних популяцій представлено у таблиці 5.6.

За розподілом генотипів та частотою алелів гормону росту лінії між собою також різняться, однак ці відмінності не настільки виражені, як у випадку з 24 *Indel* (*PRL*) та С-2402Т (*PRL*) (табл. 5.5). У всіх лініях курей, за винятком породи род-айленд, серед гомозигот з найбільшою частотою зустрічається генотип АА, при цьому кількість таких особин у лінії А у два, а у лінії 14 в чотири рази більше, ніж у Г-2 (відмінності вірогідні при $p < 0,001$). У популяції полтавських курей серед гомозиготних особин у наявності тільки

генотип АА, гомозигот за іншими алелями не виявлено. У свою чергу, в лінії 38 переважають особини з генотипом СС, особин з генотипом ВВ не було. У популяціях м'ясо-яєчних та яєчних курей кількість гомозигот ВВ достовірно не відрізняється, а гомозигот СС – ідентична.

Таблиця 5.6

Генетична структура ліній птиці за локусом гормону росту (MspI-поліморфізм у першому інтроні)

Лінія	Значення	Генотип						Алель			χ^2
		АА	ВВ	СС	АВ	АС	ВС	А	В	С	
Г-2	О	20	13	2	35	12	18	0,44	0,39	0,17	2,86
	Е	18,92	15,60	2,89	34,37	14,79	13,43				
А	О	42	6	2	20	30	0	0,67	0,16	0,17	12,9*
	Е	44,89	2,56	2,89	21,44	22,78	5,44				
14	О	81	0	0	4	15	0	0,91	0,02	0,07	1,29
	Е	82,81	0,04	0,49	3,64	12,74	0,28				
38	О	16	0	27	14	31	12	0,39	0,13	0,48	5,01
	Е	15,21	1,69	23,04	10,14	37,44	12,48				

Примітка: * – $p < 0,05$

За частотою гетерозигот лінії різняться у значно більшій мірі. Так, у лінії Г-2 кількість гетерозиготних особин АВ достовірно більша ($p < 0,05$), а гетерозигот АС – менша ($p < 0,01$), ніж у лінії А. Гетерозиготи ВС в лінії А, а також в 14 лінії, взагалі відсутні, що ймовірно може бути свідченням тиску відбору проти цього генотипу (в лінії 14 це також відноситься генотипів ВВ та СС). Висока частота алеля С у популяції курей породи род-айленд червоний суттєво відрізняє її від інших порід, які були досліджені, що може вказувати на породоспецифічність цього алеля.

Аналіз фактичного та теоретичного розподілів особин різних генотипів у лініях курей виявив відсутність порушення генетичної рівноваги в лініях Г-2, 14 та 38, а також статистично значуще відхилення від рівноважного розподілу в лінії А ($p < 0,001$). Вочевидь, відмінності у спрямуванні селекції та її інтенсивності, здійснюють істотний вплив на генетичну структуру ліній птиці.

Згідно джерел літератури, наявність алелю С характерна для локальних популяцій курей Китаю [237]. У комерційних лініях курей, таких як білий леггорн, частота алелю С дорівнює нулю, в той час як частота алелю А досягає 0,95; алелю В – 0,05; що пов'язано з проведенням інтенсивної селекції на підвищену яєчну продуктивність. Наявність алелю С у лініях курей, що були вивчені у виконаній роботі, вказує на необхідність проведення подальшої селекції у напрямі збільшення яєчної продуктивності, що дасть змогу більш ефективно розкрити генетичний потенціал птиці саме української селекції.

В таблиці 5.7 представлено основні показники генетичної мінливості дослідних популяцій курей за MspI-поліморфізмом у першому інтроні гену гормону росту.

Таблиця 5.7

Основні генетико-популяційні характеристики ліній курей, які були вивчені, за локусом гормону росту (MspI-поліморфізм у першому інтроні)

Порода курей	Ca	n _e	H _o	H _e	F _{is}
Плімутрок білий	0,374	2,67	0,65	0,626	-0,04
Бірківська барвиста	0,503	1,99	0,50	0,497	-0,02
Полтавська глиняста	0,833	1,20	0,19	0,167	-0,14
Род-айленд червоний	0,399	2,51	0,57	0,601	0,05

У цьому випадку найбільший рівень поліморфності характерний для популяції м'ясо-яєчних курей, найменший – для яєчно-м'ясних лінії 14. Для усіх популяцій, за винятком род-айленда червоного, є характерним слабо виражене відхилення в бік ексцесу гетерозигот. Максимальне порушення генетичної рівноваги спостерігається у випадку з полтавською глинястою.

5.4 SacI-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту

Поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту курей пов'язаний, у розглянутому випадку, з варіаціями кількості сайтів рестрикції для SacI. Наявність/відсутність сайту рестрикції для SacI призводить до утворення двох алельних варіантів А та В.

На рисунку 5.5 представлено електрофореграму продуктів рестрикції (SacI) четвертого інтрону гену гормону росту.

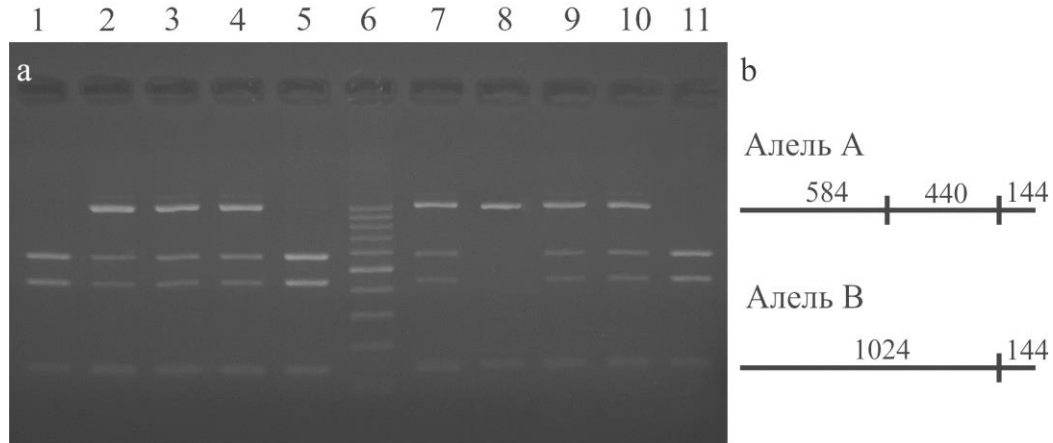


Рис. 5.5 Електрофореграма продуктів рестрикції (SacI) четвертого інтрону гормону росту (а). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (b).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1, 5, 11 – генотип АА; 2–4, 7, 9, 10 – АВ; 8 – ВВ; 6 – маркер молекулярних мас М-100.

Локус гормону росту за наявністю SacI-поліморфізму в четвертому інтроні гену виявився поліморфним. У популяції курей породи бірківська барвиста в наявності особини усіх трьох можливих генотипів (AA, AB та BB), в той же час як в лініях Г-2, 14 та 38 – тільки двох (AB та BB).

Генетичну структуру популяцій курей за цим локусом представлено в табл. 5.8.

Таблиця 5.8

Генетична структура ліній курей різних напрямів продуктивності за локусом гормону росту (4 інтрон, SacI)

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		AA	AB	BB	A	B	
Плімутрок білий	O	0	8	92	0,04	0,96	0,053
	E	0,16	7,68	92,16			
Бірківська барвиста	O	20	56	24	0,48	0,52	1,480
	E	23,04	49,92	27,04			
Полтавська глиняста	O	0	6	94	0,03	0,97	0,091
	E	0,09	5,82	94,09			
Род-айленд червоний	O	0	22	78	0,11	0,89	1,530
	E	1,21	19,58	79,21			

В лініях курей порід білий плімутрок, полтавська глиняста та Род-айленд червоний відсутні особини, гомозиготні за алелем А, але при цьому переважають гомозиготи за алелем В, що особливо виражено у лініях Г-2 та 14. У той же час в лінії А породи бірківська барвиста присутні особини усіх трьох можливих генотипів. За співвідношенням частот генотипів лінії курей порід білий плімутрок та полтавська глиняста практично однакові (розбіжності недостовірні), однак суттєво різняться від лінії курей породи бірківська барвиста ($p < 0,001$) та род-айленд червоний ($p < 0,01$).

Для популяцій курей м'ясо-яєчного та яєчно-м'ясного напрямів продуктивності характерна підвищена частота алеля В (0,96; 0,97 та 0,89). У свою чергу в популяції яєчних курей значно більша кількість гетерозигот, однак частоти алелів А та В практично ідентичні (0,48 vs. 0,52). Усі вивчені лінії курей знаходяться у стані генетичної рівноваги.

У курей локальних популяцій Ірану частота алелю А становила 0,798; алелю В – 0,202; однак, на відміну від іранських досліджень, у виконаних дослідженнях у кожному з алелів (А та В) присутній загальний сайт рестрикції для SacI, як результат на електрофореграмі в кожному генотипі в наявності фрагмент розміром 144 п.н. (рис. 5.5). Подібна картина ймовірно відповідає патернам рестрикції для SacI у роботі інших науковців, однак для більшої відповідності необхідне точне визначення розмірів рестрикційних фрагментів, так як роздільної здатності агарозного гелю, що застосовується в цій роботі, для цих цілей недостатньо. Натомість наявність мономорфного сайту рестрикції для SacI у обох алелях в трьох лініях курей вітчизняної селекції не підлягає сумніву (що, як вже було зазначено, призводить до утворення двох рестрикційних фрагментів у кожному випадку). Отже, у всіх алелях гену гормону росту (серед вивчених популяцій курей) міститься один мономорфний сайт рестрикції для SacI, в той же час як в алелі А є також додатковий поліморфний сайт.

Аналіз розподілу частот алелів та генотипів виявив наявність певного ексцесу гетерозигот у кожній із досліджених популяцій. Найбільший – у популяціях курей порід бірківська барвіста та род-айленд червоний, найменший – у полтавської глинястої, однак величина значення χ^2 , що розрахована для оцінки вірогідності цього твердження, свідчить про відсутність суттєвих порушень у розподілі частот генотипів у досліджених популяціях курей.

У табл. 5.9 просумовано основні генетико-популяційні характеристики дослідних популяцій.

**Основні генетико-популяційні характеристики дослідних ліній курей за
локусом гормону росту (4 інтрон, SacI)**

Порода курей	Ca	n_e	H_o	H_e	F_{is}
Плімутрок білий	0,923	1,08	0,08	0,077	-0,04
Бірківська барвиста	0,501	1,99	0,56	0,499	-0,12
Полтавська глиняста	0,942	1,06	0,06	0,058	-0,03
Род-айленд червоний	0,804	1,24	0,22	0,196	-0,12

Як свідчать результати досліджень найбільш високим рівнем поліморфності (практично максимальним для двоалельних систем) характеризувалася лінія А, найменшим – лінія 14. Значення ефективного числа алелів (n_e) у випадку з популяціями курей породи плімутрок білий та Род-айленд червоний займають проміжне положення.

5.5 Поліморфізм гену гіпофізарного фактору транскрипції-1 за наявністю інсерції розміром 57 п.н. у другому інтроні

Поліморфізм гену гіпофізарного фактору транскрипції-1 у другому інтроні пов'язаний з наявністю (або відсутністю) інсерції розміром у 57 п.н., що призводить до утворення двох (як й у випадку з геном пролактину, розділ 5.1.1) алельних варіантів – I (що містить інсерцію) та D (делеція, без інсерції) (рис. 5.6).

На рисунку 5.6 представлено електрофореграму продуктів ампліфікації другого інтрону гену гіпофізарного фактору транскрипції 1.

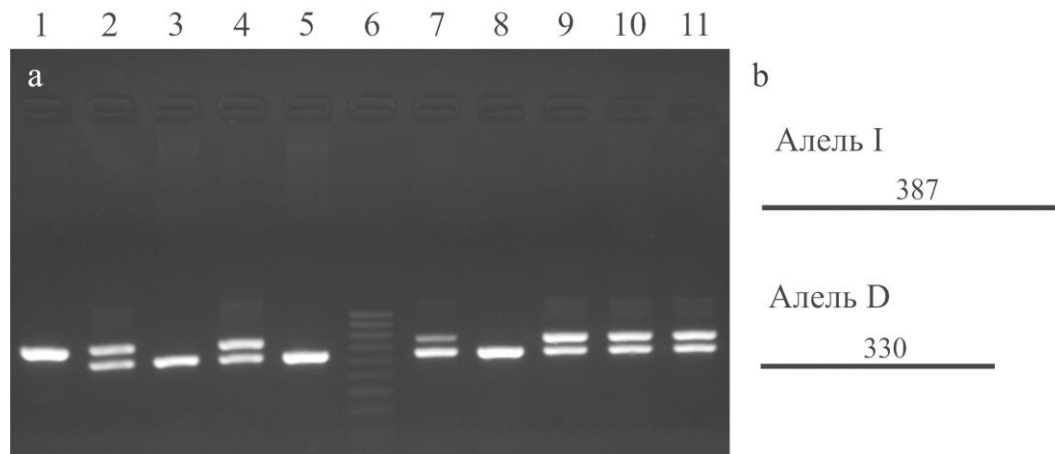


Рис. 5.6 Електрофореграма продуктів ампліфікації другого інтрону гену гіпофізарного фактору транскрипції 1.

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1 – II; 2, 4, 7, 9, 10, 11 – ID; 3, 5, 8 – DD; 6 – маркер молекулярних мас М-50.

Звертає на себе увагу те, що ген РІТ-1 за наявності інсерції у другому інтроні виявився поліморфним у всіх досліджених популяціях курей. У кожній лінії наявні особини трьох можливих генотипів: II, ID та DD. Генетичну структуру дослідних популяцій за цим локусом представлено у таблиці 5.10.

Таблиця 5.10

Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності за локусом гіпофізарного фактору транскрипції 1 (57 bp Indel)

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		II	ID	DD	I	D	
Плімутрок білий	О	28	48	24	0,52	0,48	0,180
	Е	26,91	50,17	22,92			
Бірківська барвиста	О	24	53	23	0,51	0,49	0,303
	Е	25,38	50,25	24,37			
Полтавська глиняста	О	38	50	12	0,63	0,37	0,620
	Е	39,69	46,02	13,69			
Род-айленд червоний	О	45	41	14	0,65	0,35	0,880
	Е	42,25	45,5	12,25			

Встановлено, що популяції курей м'ясо-яєчного та яєчного напрямів продуктивності за частотами алелів істотно не різняться між собою (розбіжності не достовірні). В обох популяціях кількість гомозиготних особин за алелями I та D практично співпадає. При цьому популяції яєчно-м'ясних курей за частотами алелів достовірно різняться від курей ліній Г-2 та А ($p < 0,05$). В цих популяціях, при схожій кількості гетерозигот, переважають особини з генотипом II (38 vs. 12 та 45 vs. 14 відповідно).

У таблиці 5.11 представлено дані про генетичну мінливість дослідних популяцій курей за локусом гіпофізарного фактору транскрипції 1 (57 bp Indel).

Таблиця 5.11

Основні генетико-популяційні характеристики дослідних ліній курей за локусом гіпофізарного фактору транскрипції 1 (57 bp Indel)

Порода курей	Ca	n_e	H_o	H_e	F_{is}
Плімутрок білий	0,501	1,99	0,48	0,499	0,04
Бірківська барвиста	0,501	1,99	0,53	0,499	-0,06
Полтавська глиняста	0,534	1,87	0,50	0,466	-0,07
Род-айленд червоний	0,545	1,83	0,41	0,455	0,10

Практично повний збіг частот алелів у популяціях м'ясо-яєчних та яєчних курей, а також між яєчно-м'ясними призводить і до подібних значень показників генетичної мінливості. Так, значення гетерозиготності, що розраховується, та ефективного числа алелів практично однакові в лініях Г-2 та А і несуттєво різняться в популяціях яєчно-м'ясної птиці. Усі дослідні популяції демонструють досить значне значення (практично максимальне) рівня поліморфності за цим локусом.

5.6 Поліморфізм генів родини TGF- β

Використання рестрикційного аналізу дало змогу виявити варіабельність кожного із генів, які складають родину трансформуючих ростових факторів бета (*TGF- β 1*, *TGF- β 2* та *TGF- β 3*) у досліджених популяціях курей.

5.6.1 MboII-поліморфізм екзонної ділянки гену TGF- β 1

Поліморфізм гену *TGF- β 1* пов'язаний з трансверсією цитозину в аденін у положенні 632 – місенс мутація, яка призводить до заміни глутаміну на аспарагін у білку, що кодується. Це супроводжується виникненням сайту рестрикції для MboII у алелі В.

Алельні варіанти гену TGF- β 1, що виникають як результат MboII-поліморфізму екзонної ділянки, представлено на рис. 5.7.

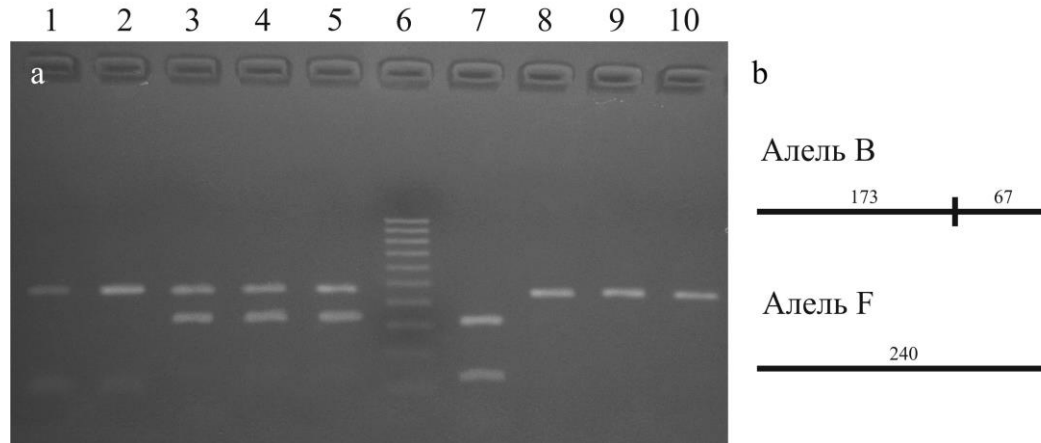


Рис. 5.7 Електрофореграма продуктів рестрикції екзонної ділянки гену *TGF- β 1* (а). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (b).

Примітка: 1–10 – номери лунок; 1, 2, 8–10 – генотип FF; 3–5 – генотип BF; 7 – генотип BB; 6 — маркер молекулярних мас М-50.

Як виходить із результатів досліджень, ген TGF- β 1 є поліморфним у всіх лініях курей, що були вивчені. У кожній дослідженій популяції, за винятком

род-айленда, присутні особини всіх можливих генотипів (BB, BF, FF) (рис. 5.7). В лінії 38 особин з генотипом BB не виявлено.

Генетична структура дослідних популяцій курей за локусом $TGF-\beta 1$ представлена у табл. 5.12.

Таблиця 5.12

Генетична структура популяцій курей різного напрямку продуктивності за локусом $TGF-\beta 1$ (екзон, MboII)

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		BB	BF	FF	B	F	
Плімутрок білий	O	6	30	64	0,21	0,79	0,91
	E	4,41	33,18	62,41			
Бірківська барвиста	O	28	52	20	0,54	0,46	0,22
	E	29,16	49,68	21,16			
Полтавська глиняста	O	10	42	48	0,31	0,69	0,028
	E	9,51	42,35	47,14			
Род-айленд червоний	O	0	29	71	0,15	0,85	2,75
	E	2,25	25,5	72,25			

За співвідношенням частот алелів $TGF-\beta 1$ популяції курей плімутрок білий та полтавська глиняста вірогідно різняться між собою ($p < 0,05$) та при цьому значно різняться від яєчних курей ($p < 0,001$). Популяція курей породи род-айленд червоний за частотами алелів вірогідно вирізняється від курей яєчного та яєчно-м'ясного напрямів продуктивності ($p < 0,001$).

Популяції курей породи плімутрок білий, полтавська глиняста та род-айленд червоний характеризуються переважанням кількості особин з генотипом FF, у той час як у популяції курей породи бірківська барвиста цієї закономірності не спостерігається (табл. 5.12). Всі лінії курей, які вивчено, знаходяться у стані генетичної рівноваги.

У табл. 5.13 наведені дані генетичної мінливості дослідних популяцій курей за локусом *TGF-β1* (екзон, MboII).

Таблиця 5.13

Основні генетико-популяційні характеристики дослідних ліній курей за локусом *TGF-β1* (екзон, MboII)

Порода курей	Ca	n_e	H_o	H_e	F_{is}
Плімутрок білий	0,668	1,50	0,30	0,332	0,10
Бірківська барвіста	0,503	1,98	0,52	0,497	-0,05
Полтавська глиняста	0,572	1,75	0,42	0,428	0,02
Род-айленд червоний	0,755	1,33	0,29	0,255	-0,16

Значення фактичної гетерозиготності в різних дослідних популяціях курей знаходились у межах від 0,29 (лінія 38) до 0,52 (лінія А); в той час як значення очікуваної гетерозиготності у тих же лініях становили від 0,255 до 0,497.

Найменше значення індексу фіксації Райта (F_{is}), як показника інбридингу, що характеризує ступінь родинного спаровування особин популяції, спостерігалось у популяції курей породи род-айленд червоний, найбільше – у популяції курей породи плімутрок білий.

Значення ефективного числа алелів коливалося у межах від 1,33 до 1,98. Найбільший рівень поліморфності демонструє лінія А, найменший – лінія 38.

5.6.2 RsaI-поліморфізм промоторної дялінки гену *TGF-β2*

Поліморфізм гену *TGF-β2* в промоторній ділянці визначається транзицією тиміну в цитозин у положенні -640, що, в свою чергу, призводить до змін сайту

рестрикції для *RsaI*, та, відповідно, до утворення двох алелів – L (*RsaI*-) та B (*RsaI*+) (рис. 5.8).

На рис. 5.8 представлено електрофореграму продуктів рестрикції (*RsaI*) промоторної ділянки гену *TGF-β2*.

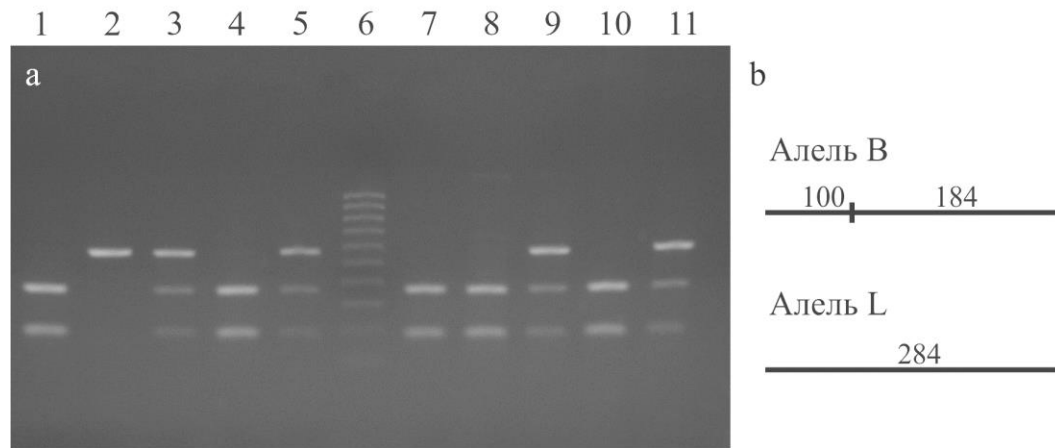


Рис. 5.8 Електрофореграма продуктів рестрикції промоторної ділянки гену *TGF-β2* (а). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (b).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1, 4, 7, 8, 10 – генотип BB; 2 – генотип LL; 3, 5, 9, 11 – генотип BL; 6 – маркер молекулярних мас М-50.

Ген *TGF-β2* також є поліморфним. У кожній із ліній курей, що вивчені, різного напрямку продуктивності присутні особини всіх трьох можливих генотипів (BB, BL та LL).

Додатково до вищевикладеного провели дослідження щодо можливості використання гетеродуплексного аналізу для генотипування особин за локусом *TGF-β2* як альтернативного варіанту методу PCR-RFLP. Використання цього підходу дає змогу істотно знизити витрати на проведення генотипування, за допомогою економії засобів на придбання ендонуклеаз рестрикції, а також загального часу досліджень.

Загальний принцип підходу, який використовується, наступний: при змішуванні еталонного зразку (ампліфікований фрагмент ДНК гену *TGF-β2*, що містить встановлену в ході рестрикційного аналізу мутацію) з дослідним, та з

наступною денатурацією/ренатурацією (94 °C / 25 °C), у випадку відмінностей в нуклеотидній структурі еталонного та дослідних зразків, утворюється гетеродуплексна ДНК. За повного збігу нуклеотидних послідовностей зразків, які порівнюються, утворення гетеродуплексів не відбувається. Як еталонний фрагмент використовували генотип ВВ за *TGF-β2*. Кожний зразок розділяли на дві рівні частини, при цьому одну змішували з еталонним зразком з подальшим термостатуванням (94 °C / 25 °C); другу – безпосередньо переводили на електрофорез. Утворення гетеродуплексної ДНК (додаткового фрагменту) в змішаному зразку вказує на генотип дослідної проби LL; утворення гетеродуплексної ДНК як в змішаній, так і в вихідних пробах – генотип ВL; відсутність гетеродуплексів – ВВ (рис. 5.9).

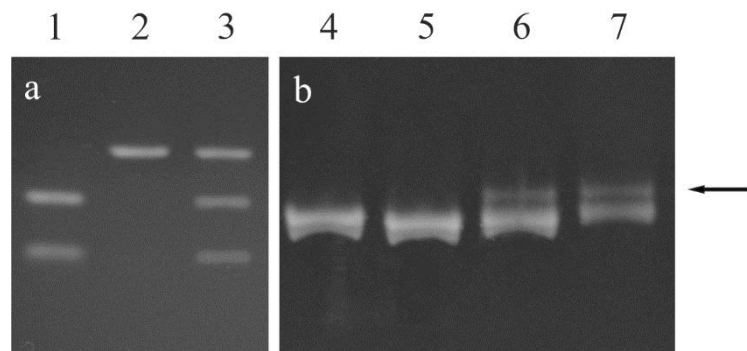


Рис. 5.9 Порівняння результатів рестрикційного (а) та гетеродуплексного (б) аналізів (стрілочкою вказана гетеродуплексна ДНК):

Примітка: 1–4 – номери лунок; 1, 4 – ВВ; 2, 5 – LL; 3, 6 – ВL; 7 – ВВ + LL (термостатування 94 °C / 25 °C).

Як вказано на представленій електрофореграмі, кожному із генотипів, що визначені методом PCR-RFLP, відповідає генотип, визначений за використання гетеродуплексного аналізу. Гетеродуплексна ДНК внаслідок особливостей своєї структури володіє зниженою електрофоретичною рухливістю порівняно з цільовими фрагментами, що й дає змогу визначити її наявність на електрофореграмі.

Слід зауважити, що у випадку гетеродуплексного аналізу використовували електрофорез у ПААГ, так як розподільної здатності агарозного гелю для детекції гетеродуплексної ДНК не достатньо.

Як результат проведених досліджень, встановлено повну (на 100 %) відповідність результатів гетеродуплексного аналізу методу PCR-RFLP, що безпосередньо дає змогу використовувати цей метод для генотипування за локусом *TGF-β2*.

Генетичну структуру досліджуваних популяцій курей, представлено у табл. 5.14.

Таблиця 5.14

Генетична структура ліній курей різних напрямів продуктивності за локусом *TGF-β2* (промоторна ділянка, *RsaI*)

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		BB	BL	LL	B	L	
Плімутрок білий	O	24	44	32	0,46	0,54	1,31
	E	21,16	49,68	29,16			
Бірківська барвиста	O	45	41	14	0,65	0,35	0,86
	E	42,9	45,2	11,9			
Полтавська глиняста	O	64	28	7	0,79	0,21	2,37
	E	61,79	32,84	4,37			
Род-айленд червоний	O	36	49	15	0,61	0,39	0,1
	E	37,21	47,58	15,21			

Найбільша кількість гомозиготних за алелем В особин спостерігається в лініях курей яєчно-м'ясного та яєчного напрямів продуктивності, найменша – у популяції м'ясо-яєчних курей. Всі три популяції заходяться у стані генетичної рівноваги.

За співвідношенням частот алелів досліджені популяції курей істотно розрізняються між собою. Так, для лінії курей породи полтавська глиняста характерна висока частота алелю В, у той же час як у лінії курей породи білий плімутрок частоти алелів В та L різняться не настільки виражено (0,46 vs. 0,54). Популяції курей породи бірківська барвиста та род-айленд червоний займають проміжне місце. При цьому за частотами алелів встановлено вірогідні відхилення ліній 14 та Г-2 одна від одної та від ліній 38 та А. У свою чергу популяції порід бірківська барвиста та род-айленд червоний вірогідно не різняться.

У табл. 5.15 представлено основні характеристики генетичної мінливості дослідних популяцій курей за локусом *TGF-β2*.

Таблиця 5.15

Основні генетико-популяційні характеристики досліджених ліній курей за локусом *TGF-β2* (промоторна ділянка, RsaI)

Порода курей	Ca	n_e	H_o	H_e	F_{is}
Плімутрок білий	0,503	1,98	0,44	0,497	0,12
Бірківська барвиста	0,545	1,83	0,41	0,455	0,10
Полтавська глиняста	0,668	1,50	0,28	0,332	0,16
Род-айленд червоний	0,524	1,91	0,49	0,476	-0,03

Як свідчать матеріали наведеної таблиці, найбільшим рівнем поліморфності характеризується лінія 38, а також Г-2. Найменше значення ефективного числа алелів спостерігалось у полтавських курей. За винятком род-айленду червоного для усіх ліній виявлений дефіцит гетерозигот, що досягає свого відносного максимального значення в лінії 14.

5.6.3 BslII-поліморфізм у четвертому інтроні гену TGF- β 3

Алельні варіанти гену TGF- β 3 виникають внаслідок трансверсії цитозину в аденін у положенні 2833 (четвертий інтрон), що призводить до варіювання кількості сайтів рестрикції для BslII у алелях В та L відповідно (рис. 5.10). Обидва алелі містять у своєму складі два мономорфних сайти рестрикції для BslII.

На рис. 5.10 представлена електрофореграма продуктів рестрикції (BslII) четвертого інтрону гену TGF- β 3.

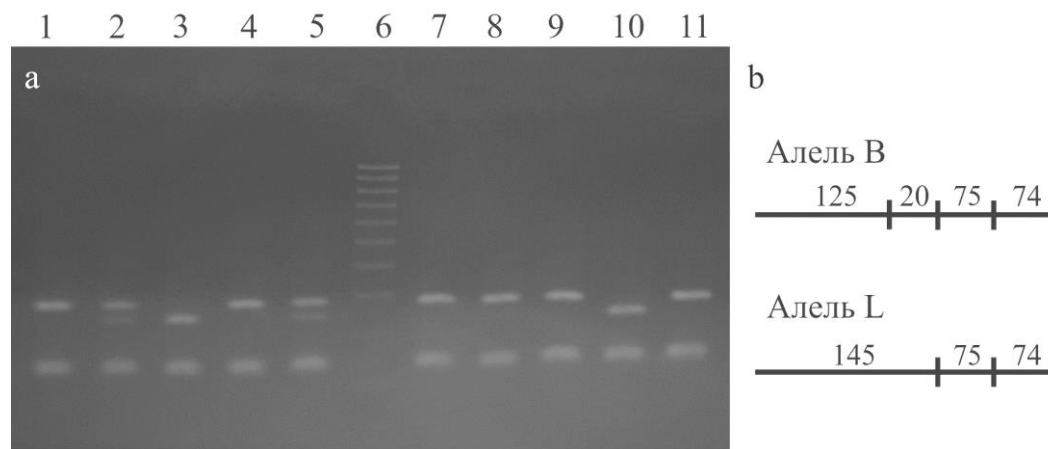


Рис. 5.10 Електрофореграма продуктів рестрикції (агарозний гель) фрагменту четвертого інтрону гену TGF- β 3 (а). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (б).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1, 4, 7–9, 11 – генотип LL; 2, 5 – генотип BL; 3, 10 – генотип BB; 6 – маркер молекулярних мас М-50.

Ген TGF- β 3 також є поліморфним у всіх популяціях курей, які були вивчені. У наявності особини усіх трьох можливих генотипів (BB, BL та LL).

У науковій літературі стосовно питання про BslII-поліморфізм у четвертому інтроні гену TGF- β 3 мають місце певні протиріччя щодо розмірів та загальної кількості рестрикційних фрагментів. У окремих джерелах наводять фотографії електрофореграм, які не включають у себе мономорфний сайт, характерний для двох алелів [245]. При детальному розгляді картини розподілу

рестрикційних фрагментів на електрофореграмі при використанні агарозного гелю (3 %) у наявності два алеля – В та L, кожний із яких містить у своєму складі тільки один мономорфний сайт (поряд з поліморфним у випадку алелю В). Однак інші джерела, а також аналіз цієї послідовності в GenBank, вказують на два мономорфних сайти, що в сумі дає патерн рестрикції, який схематично зображено на рис. 5.10 [376, 377]. Для рішення цього питання було проведено електрофоретичний розподіл рестрикційних фрагментів *TGF-β3* за використання 8 % поліакриламідного гелю з наступним фарбуванням сріблом (рис. 5.11).

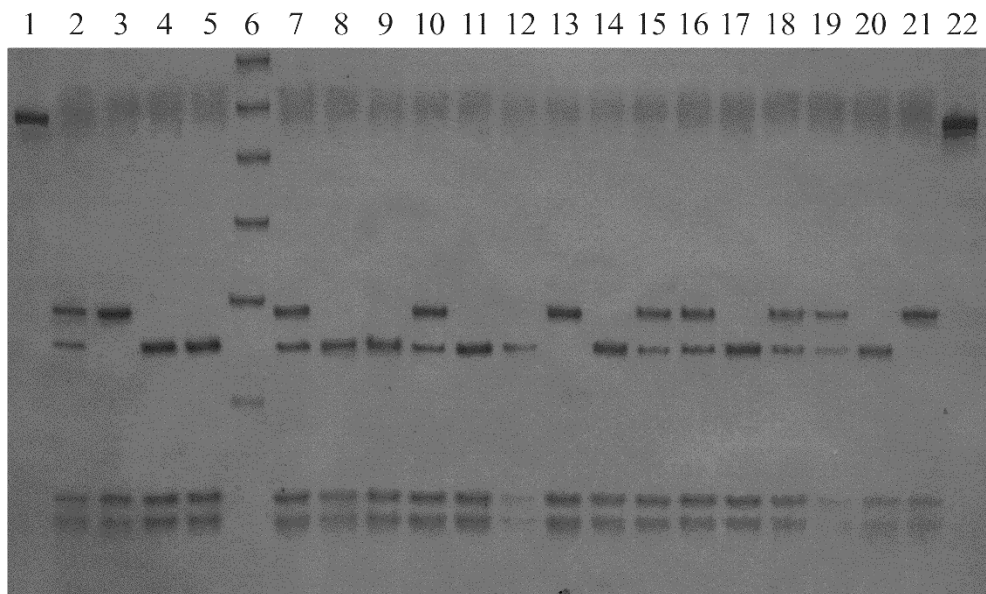


Рис. 5.11 Електрофореграма продуктів рестрикції фрагменту четвертого інтрону гену *TGF-β3*.

Примітка: 1–22 – номери лунок; 1, 22 – вихідний ампліфікований фрагмент; 2, 7, 10, 15, 16, 18, 19 – генотип BL; 3, 13, 21 – генотип LL; 4, 5, 8, 9, 11, 12, 14, 17, 20 – генотип BB; 6 – маркер молекулярних мас М-50.

Висока роздільна здатність цього гелю порівняно з агарозним дала змогу розділити фрагменти близьких розмірів (~75 та 74 п.н.). При цьому слід відзначити, що в роботах окремих авторів представлено дані про розміри проміжних фрагментів, що дорівнюють за молекулярною масою один одному

(75 п.н.) [245]. На власну думку, це пов'язано з використанням у роботі, яка цитується, агарозного гелю, розподільної здатності якого недостатньо для розділення близьких за розмірами фрагментів (на електрофореграмі фрагменти, різниця у довжині яких коливається у межах до 10–15 п.н. будуть представлені у вигляді однієї смужки). Цей факт вказує на необхідність використання поліакриламідних гелів для розділення близьких за молекулярними масами фрагментів у суперечливих випадках. Таким чином, можна зробити висновок, що у популяціях курей, що були вивчені, кожний із алелів за цим поліморфізмом містить, нарівні з поліморфним, два мономорфних сайти рестрикції для BslI.

Генетичну структуру популяцій курей досліджених порід представлено у табл. 5.16.

Таблиця 5.16

Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності за локусом *TGF-β3* (четвертий інтрон, BslI)

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		BB	BL	LL	B	L	
Плімутрок білий	O	8	32	60	0,24	0,76	1,73
	E	5,76	36,48	57,76			
Бірківська барвиста	O	8	30	62	0,23	0,77	2,32
	E	5,29	35,42	59,29			
Полтавська глиняста	O	34	35	31	0,52	0,48	8,41*
	E	26,77	49,42	22,81			
Род-айленд червоний	O	8	50	42	0,33	0,67	1,72
	E	10,89	44,22	44,89			

Примітка: * – $p < 0,05$

Слід відзначити, що популяції курей м'ясо-яєчного та яєчного напрямів продуктивності за співвідношенням частот генотипів *TGF-β3* практично однакові. У той же час для популяції курей яєчно-м'ясного напряму продуктивності лінії 14 характерна в два рази менша частота генотипу LL та у чотири рази більша частота зустрічальності особин генотипу BB (табл. 5.16). У свою чергу, популяція род-айленду червоного займає проміжне місце. При цьому в популяції курей породи полтавська глиняста відмічене порушення генетичної рівноваги, що імовірно може бути пов'язано з тиском відбору або феноменом дрейфу генів.

За співвідношенням частот алелів популяції курей м'ясо-яєчного та яєчного напрямів продуктивності практично однакові (вірогідних відмінностей не виявлено) та характеризуються значним превалюванням частоти алеля L. У лінії 38 спостерігається практично дворазове перевищення частоти алеля L над B. Відмінності у значеннях частот алелів у лінії 38 порівняно з іншими популяціями вірогідні. В свою чергу, популяція курей породи полтавська глиняста вірогідно відрізняється від інших ліній, які були вивчені, ($p < 0,001$), при цьому частоти алелів B та L практично співпадають (0,52 vs. 0,48).

В табл. 5.17 наведено дані щодо основних показників генетичної мінливості дослідних популяцій курей за локусом трансформуючого ростового фактору $\beta 3$.

За винятком род-айленда червоного для усіх досліджуваних популяцій характерний дефіцит гетерозиготних особин. У лінії полтавських курей він досягає свого відносно максимального значення, що корелює з фактом порушення генетичної рівноваги в цій популяції. Як свідчать розрахунки, порушення рівноважного стану трапляється за рахунок збільшення кількості гомозиготних особин на 7 (BB) – 8 % (LL). Також ця популяція характеризується максимальним значенням рівня генетичної поліморфності локусу (значення ефективного числа алелів становить 1,99).

**Основні генетико-популяційні характеристики ліній курей за локусом
TGF-β3 (четвертий інтрон, BslI)**

Порода курей	Ca	n _e	H _o	H _e	F _{is}
Плімутрок білий	0,635	1,57	0,32	0,365	0,12
Бірківська барвиста	0,646	1,55	0,30	0,354	0,15
Полтавська глиняста	0,501	1,99	0,35	0,499	0,30
Род-айленд червоний	0,558	1,79	0,50	0,442	-0,13

У свою чергу, найменший рівень генетичної мінливості демонструє популяція курей яєчного напрямку продуктивності. Популяції курей порід род-айленд червоний та плімутрок білий за цим показником мають проміжні значення.

5.7 PstI-поліморфізм у 5'UTR фрагменті гену інсуліноподібного ростового фактору I

Використання рестрикційного аналізу дало змогу виявити варіабельність локусу інсуліноподібного ростового фактору I у дослідних популяціях курей.

Транзиція цитозину в тимін у сайті для PstI призводить до виникнення двох алельних варіантів гену C₁ – PstI⁺ та C₂ – PstI⁻. Позначення алелів (C₁ та C₂) пов'язані з кількістю залишків цитозину в сайті рестрикції для PstI.

На рис. 5.12 представлено електрофореграму продуктів рестрикції (PstI) 5'UTR фрагменту гену IGF-I, а також схему патернів рестрикції та відповідні алелі.

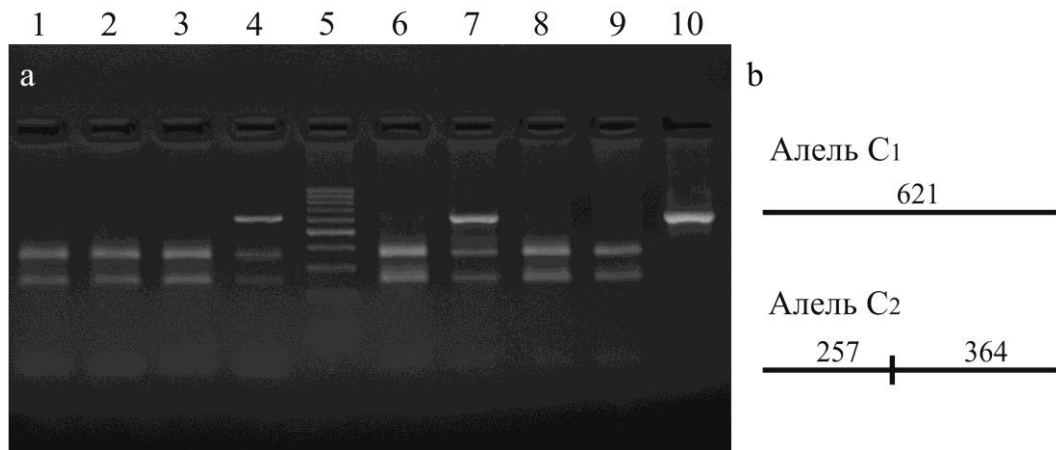


Рис. 5.12 Електрофореграма продуктів рестрикції ампліфікованого фрагменту гену інсуліноподібного ростового фактору I (а). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (b).

Примітка: 1–10 – номери лунок; 1–3, 6, 8, 9 – генотип C_2C_2 ; 4, 7 – C_1C_2 ; 10 – C_1C_1 ; 5 – маркер молекулярних мас М-100.

Як результат проведених досліджень встановлено, що локус інсуліноподібного ростового фактору I у дослідних популяціях курей є поліморфним. Виявлено особин усіх можливих генотипів: C_1C_1 , C_1C_2 та C_2C_2 .

В популяціях курей порід полтавська глиняста та род-айленд червоний спостерігається найбільша кількість особин гомозиготних за алелем C_1 (17 голів) серед всіх ліній, які були вивчені. У той же час для лінії 14 є характерною також і найбільша кількість гетерозиготних особин. Кількість гетерозиготних особин у лініях Г-2 та А співпадає, при цьому в лінії 38 гетерозигот дещо менше. У цілому популяція яєчних курей займає проміжне положення між популяціями м'ясо-яєчних та яєчно-м'ясних курей за значеннями частот алелів C_1 та C_2 . Отже для всіх досліджених популяцій курей характерно виражене превалювання частоти алелю C_2 над C_1 .

Генетичну структуру популяцій курей за даним локусом представлено у табл. 5.18.

**Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності за
локусом IGF-I (PstI-поліморфізм)**

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		C ₁ C ₁	C ₁ C ₂	C ₂ C ₂	C ₁	C ₂	
Плімутрок білий	О	1	35	64	0,18	0,82	2,46
	Е	3,35	30,31	66,34			
Бірківська барвиста	О	12	35	53	0,29	0,71	2,68
	Е	8,59	41,80	49,59			
Полтавська глиняста	О	17	42	41	0,38	0,62	1,17
	Е	14,44	47,12	38,44			
Род-айленд червоний	О	19	33	48	0,35	0,65	7,46*
	Е	12,25	45,5	42,25			

Примітка: * – $p < 0,05$

З аналізу приведених даних слідує, що у м'ясо-яєчної птиці лінії Г-2 найчастіше зустрічаються особини гомозиготні за алелем C₂, за алелем C₁ гомозиготна лише одна особина. В популяції яєчних курей найчастіше зустрічаються особини гомозиготні за алелем C₂ (53 голови), за алелем C₁ гомозиготних особин 12. У свою чергу в популяціях курей яєчно-м'ясного напрямку продуктивності як у породи полтавська глиняста, так і у род-айленду червоного, також виявлено найбільшу частоту зустрічальності алелю C₂.

За частотами алелів лінія Г-2 вірогідно відрізняється від лінії А ($p < 0,05$) та ліній 14 і 38 ($p < 0,001$). Відмінності між лініями А, 38 та 14 несуттєві.

Згідно з джерелами літератури, висока частота алелю C₂ позитивно корелює з масою яйця, несучістю, тривалістю яйцекладки. Ці дані співвідносяться з відносно більшою масою яєць у дослідженій м'ясо-яєчної птиці порівняно з птицею яєчного напрямку продуктивності та достатньо високою несучістю.

Аналіз фактичного та теоретичного розподілів особин різних генотипів виявив відсутність порушення генетичної рівноваги у всіх популяціях, крім род-айленда червоного.

Порівняння генетичної структури популяцій курей вітчизняної селекції з лініями курей різного напрямку продуктивності інших країн вказує на необхідність проведення подальшої селекції з урахуванням результатів, які були отримані за розподілом алелів дослідженого в цій роботі локусу. Зокрема, згідно з джерелами літератури, у курей локальних популяцій Кореї частота генотипу C_1C_1 становить 0,55; C_1C_2 – 0,26; C_2C_2 – 0,17; алелю C_1 – 0,7; C_2 – 0,3 відповідно [284]. При цьому доведено, що висока частота алелю C_2 позитивно корелює з рівнем розвитку фолікулів та високою яєчною продуктивністю. В свою чергу в локальних популяціях курей Китаю частота генотипу C_1C_1 становить 0,32; C_1C_2 – 0,41; C_2C_2 – 0,27; алелю C_1 – 0,53; C_2 – 0,47 відповідно [282].

При вивченні зв'язку алелів гену інсуліноподібного ростового фактору I з продуктивними якостями авторами було встановлено, що висока частота генотипу C_2C_2 позитивно корелює з підвищеною яєчною продуктивністю (особливо у 300 та 400 діб продуктивного періоду), в той час як висока частота генотипу C_1C_1 – з живою масою. Дослідження, які були проведені на курях локальних іранських популяцій, свідчать, що частота алелю C_1 становить 0,39; алелю C_2 – 0,51 [279].

Серед усіх популяцій, які були вивчені, тільки м'ясо-яєчні кури характеризуються ексцесом гетерозигот, – усім іншим популяціям властива їх нестача. В лінії 38 дефіцит гетерозигот досягає свого максимального (порівняно зі всіма іншими лініями) значення. Порушення генетичної рівноваги в цій популяції відбувається за рахунок збільшення кількості гомозиготних особин на 6 (C_2C_2) – 7 (C_1C_1) %.

В табл. 5.19 наведено основні показники генетичної мінливості ліній курей, які були вивчені, за PstI-поліморфізмом в локусі інсуліноподібного ростового фактору I.

**Основні генетико-популяційні характеристики ліній курей за локусом
IGF-I (PstI-поліморфізм)**

Порода курей	Ca	n _e	H _o	H _e	F _{is}
Плімутрок білий	0,705	1,42	0,35	0,295	-0,19
Бірківська барвиста	0,588	1,70	0,35	0,412	0,15
Полтавська глиняста	0,529	1,89	0,42	0,471	0,11
Род-айленд червоний	0,545	1,83	0,33	0,455	0,27

Найбільший рівень генетичного поліморфізму за досліджуваним локусом демонструє популяція полтавських курей, найменший – м'ясо-яєчних. Значення ефективного числа алелів у всіх популяціях окрім плімутрока білого є достатньо значним та коливається від 1,70 (лінія А) до 1,89 (лінія 14).

5.8 HinfI-поліморфізм у промоторній ділянці гену інсуліноподібного ростового фактору-I

HinfI-поліморфізм у промоторній ділянці *IGF-I* призводить до виникнення двох алелів – С (HinfI+) та А (HinfI-). Слід відзначити, що на відміну від попереднього випадку кожний із алелів додатково містить мономорфний сайт рестрикції для HinfI, що, у свою чергу, вплинуло на розподіл фрагментів ДНК на електрофореграмах.

На рис. 5.13 представлено електрофореграму продуктів рестрикції промоторного фрагменту *IGF-I*.

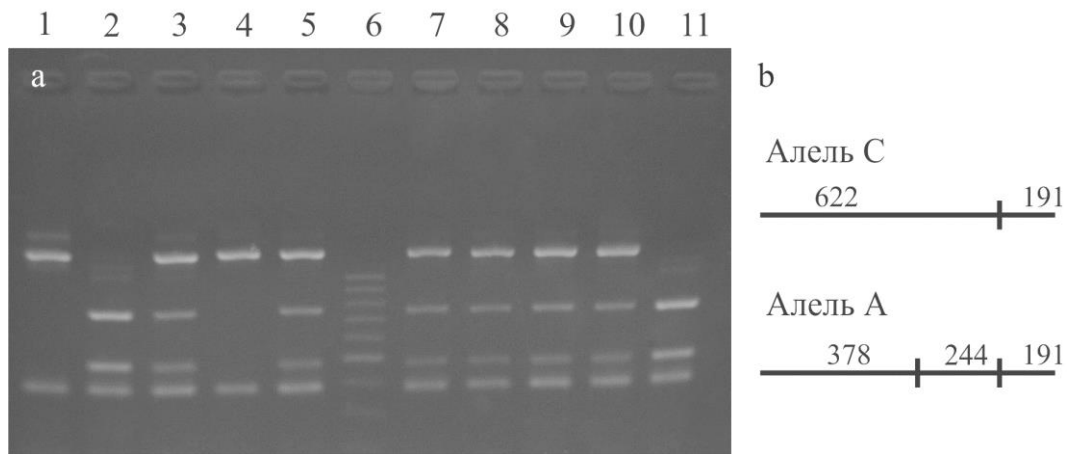


Рис. 5.13 Електрофореграма продуктів рестрикції ампліфікованого фрагменту гену інсуліноподібного ростового фактору-I (a). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (b).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1, 4 – генотип CC; 2, 11 – AA; 3, 5, 7-10 – AC; 6 – маркер молекулярних мас M-50.

Генотип CC представлено на електрофореграмі у вигляді фрагментів розміром 622 та 191 п.н.; AA – 378, 244 та 191 п.н.; AC – 622, 378, 244 та 191 п.н. відповідно.

За HinfI-поліморфізмом локус IGF-I також виявився поліморфним. У дослідних популяціях зустрічаються особини усіх можливих генотипів – AA, AC та CC.

За співвідношенням частот алелів та генотипів дослідні популяції курей вірогідно різняться між собою, за винятком ліній А та 14. Для популяцій курей яєчного та яєчно-м'ясного напрямів продуктивності характерна відносно більша кількість гетерозиготних особин, а також виражене превалювання частот алеля С над А та гомозигот CC над AA. У випадку з м'ясо-яєчними курями ситуація протилежна – в наявності двократне превалювання частот алеля А над С, та чотирикратьне переважання кількості гомозиготних особин з генотипом AA над CC.

Генетичну структуру популяцій курей за цим локусом представлено у табл. 5.20.

**Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності за
локусом IGF-I (HinfI-поліморфізм)**

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		AA	AC	CC	A	C	
Плімутрок білий	O	48	40	12	0,68	0,32	0,65
	E	46,24	43,52	10,24			
Бірківська барвиста	O	7	40	53	0,27	0,73	0,01
	E	7,29	39,42	53,29			
Полтавська глиняста	O	7	44	49	0,29	0,71	0,46
	E	8,41	41,18	50,41			
Род-айленд червоний	O	15	54	31	0,42	0,58	1,21
	E	17,64	48,72	33,64			

Усі популяції курей, які були вивчені, знаходяться у стані генетичної рівноваги.

За винятком м'ясо-яєчних курей, для усіх дослідних популяцій відмічена тенденція до ексцесу гетерозигот, що досягає свого відносно максимального значення в породі род-айленд. Значення індексу фіксації Райта коливалося в межах від -0,11 (свідчить про певний рівень аутбридингу в популяції курей породи род-айленд) до 0,08 (свідчить про деякий інбридинг в популяції курей породи плімутрок білий). Але, незважаючи на певні коливання рівня гетерозиготних особин, це не порушує рівноважний стан всіх дослідних популяцій. Найвищий рівень поліморфності зафіксовано також у лінії 38, найменший – у популяції яєчних курей. Популяції курей порід плімутрок білий та полтавська глиняста займають проміжне місце.

В табл. 5.21 представлено основні генетико-популяційні параметри ліній курей, які були вивчені.

**Основні генетико-популяційні характеристики ліній курей за локусом
IGF-I (HinfI-поліморфізм)**

Порода курей	Ca	n_e	H_o	H_e	F_{is}
Плімутрок білий	0,565	1,77	0,40	0,435	0,08
Бірківська барвиста	0,606	1,65	0,40	0,394	-0,02
Полтавська глиняста	0,588	1,70	0,44	0,412	-0,07
Род-айленд червоний	0,513	1,95	0,54	0,487	-0,11

Аналіз розподілу частот гаплотипів дослідних ліній курей за поліморфізмами локусу IGF-I дає змогу зробити висновок щодо порушення рівноважного стану (за винятком породи плімутрок білий), тобто у кожній лінії курей частоти гаплотипів не визначаються значенням частот відповідних алелів. Значення нормованого відхилення від рівноважного стану D' коливалося від 0,56 до 0,89; що перевищує значення прийнятої межі значущості в 50 %. Однак, при порівнянні розподілу частот гаплотипів можна виявити деякі закономірності, які, як вже було зазначено вище, цілком корелюють зі значеннями розподілу алельних частот у відповідних лініях курей. Так, у популяції Род-айленда червоного частоти гаплотипів C_1C та C_2C максимально наближені один до одного за значенням, що не спостерігається в інших лініях курей. Для цієї популяції, а також для м'ясо-яєчних курей є характерним переваження частоти гаплотипу C_2A , у той час як для усіх інших – гаплотипу C_2C . При цьому значення стандартизованої міри відхилення від стану рівноваги у лінії Г-2 є мінімальним та не досягає межі значущості ($D' = 0,23$). Популяція яєчних курей породи бірківська барвиста характеризується максимальним значенням стандартизованої міри відхилення від рівноважного стану (0,89), полтавські кури займають проміжне положення ($D' = 0,70$).

В таблиці 5.22 просумовано результати щодо структури та частоти зустрічальності різних типів гаплотипів у локусі IGF-I в лініях курей, які були вивчені.

Таблиця 5.22

Розподіл частот гаплотипів за локусом інсуліноподібного ростового фактору-I у дослідних популяціях курей

Гаплотип	Маркер		Порода курей			
	PstI	HinfI	Плімутрок білий	Бірківська барвиста	Полтавська глиняста	Род-айленд червоний
1	C ₁	A	0,13	0,03	0,06	0,1
2	C ₁	C	0,06	0,235	0,305	0,25
3	C ₂	A	0,55	0,24	0,23	0,31
4	C ₂	C	0,26	0,495	0,405	0,34

Подібний розподіл імовірно можна інтерпретувати напрямом продуктивності птиці. Так, згідно з джерел літератури, алель A (HinfI-поліморфізм локусу IGF-I), пов'язаний з підвищеними м'ясними якостями птиці, зокрема, з показниками живої маси [283, 291]. Це відображено у генетичній структурі м'ясних порід курей, для яких характерна виражена перевага частоти алелю A, аж до повної відсутності у популяції гомозиготних особин з генотипом CC. У свою чергу, для курей яєчних порід специфічна, в цілому, перевага значення частоти алелю C. У той же час алель C₂ (PstI-поліморфізм локусу IGF-I), асоційований з підвищеними показниками несучості [284]. Все це відображається на характері розподілу алельних частот IGF-I за кожним із поліморфізмів. Також для м'ясо-яєчної птиці, порівняно з іншими дослідними лініями, характерною є підвищена частота гаплотипу C₁A. У будь-якому разі, специфіка генетичної структури ліній курей різних напрямів

продуктивності дає передумови для проведення подальшої селекційної роботи з метою максимальної реалізації продуктивного потенціалу птиці.

5.9 NspI -поліморфізм у 5 інтроні гену рецептора гормону росту

Поліморфізм локусу рецептора гормону росту виникає як результат транзиції цитозину на тимін у 5 інтроні (у сайті рестрикції для NspI), що в свою чергу й призводить до виникнення алельних варіантів А (NspI-) та В (NspI+).

На рис. 5.14 представлена електрофореграма продуктів рестрикції (NspI) п'ятого інтрону гену GHR.

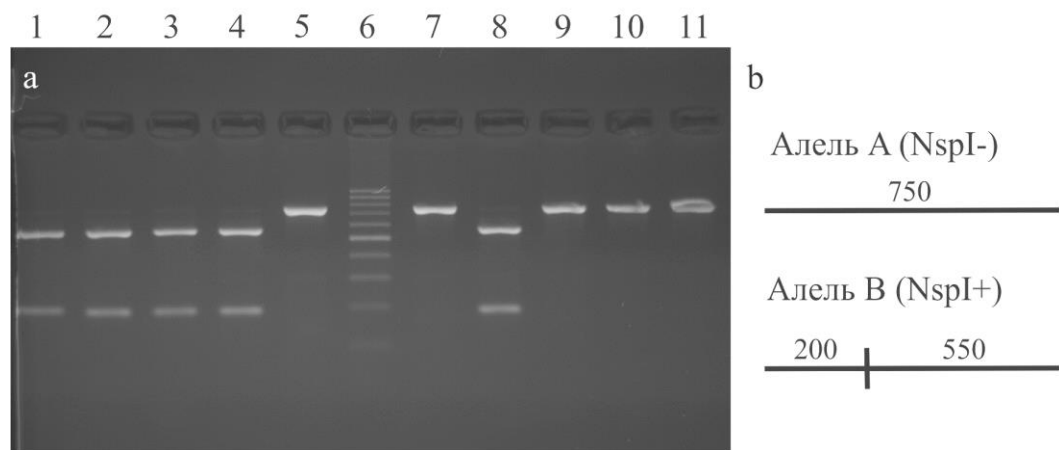


Рис. 5.14 Електрофореграма продуктів рестрикції 5-го інтрону гену рецептору гормону росту в м'ясо-яєчних курей породи плімутрок білий (а). Схеми патернів рестрикції та відповідні алелі (б).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1 – 4, 8 – генотип В0; 5, 7, 9 – 11 – генотип А0; 6 – маркер молекулярних мас М-100.

У всіх популяціях курей, які були вивчені, ген GHR є поліморфним – у наявності особини двох можливих генотипів (А0 та В0). Гетерозиготні особини відсутні, що безпосередньо пов'язано з гемізіготністю цього локусу.

Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності за локусом рецептора гормону росту представлена в табл. 5.23.

**Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності за
локусом рецептора гормону росту**

Порода курей	Алелі	
	A (NspI-)	B (NspI+)
Плімутрок білий	0,72	0,28
Бірківська барвіста	0,46	0,54
Полтавська глиняста	0,27	0,73
Род-айленд червоний	0,20	0,80

За частотами алелів популяції курей різного напрямку продуктивності істотно різняться одна від одної ($p < 0,001$). Так, найбільша частота алелю А спостерігається в популяції курей породи білий плімутрок (0,72), найменша – в популяції курей породи род-айленд червоний (0,20). Лінія А займає проміжне положення, характеризується при цьому близькими значеннями частот алелів А та В (0,46 та 0,54 відповідно).

У світовій науковій літературі дані щодо генотипування птиці за локусом рецептору гормону росту представлені недостатньо. При цьому цікавим прикладом можуть слугувати випадки невірної інтерпретації даних у деяких наукових публікаціях. Джерелом помилок слугує той факт, що у птиці, на відміну від ссавців, гетерогаметною статтю є самиці, тому ген рецептору гормону росту представлений у них в гемізиготному стані. Однак окремі автори наводять дані з генотипування безвідносно до статі дослідної птиці. Зокрема, у дослідженні, яке присвячено вивченню зв'язку алельних варіантів гену рецептору гормону росту з продуктивними якостями курей локальних китайських популяцій, встановлено, що частоти генотипів становлять: V_1V_1 – 0,20; V_2V_2 – 0,80; алелів V_1 – 0,2; V_2 – 0,8 відповідно (чисельність вибірки 120 голів) [263, 266]. Як впливає із цих робіт, автори описують алелі V_1 та V_2 , як ті,

що присутні в гомозиготному стані у вигляді B_1B_1 та B_2B_2 , що неможливо внаслідок гемізіготності цього локусу. При цьому науковців, мабуть, зовсім не дивує повна відсутність гетерозигот у популяції, а також велике значення χ^2 , яке дорівнює 45,07.

5.10 HindIII-поліморфізм у другому інтроні гену рецептору гормону росту

Поліморфізм локусу рецептора гормону росту в другому інтроні пов'язаний з варіативністю наявності сайту рестрикції для HindIII, що призводить до виникнення різних алельних варіантів гену – А (HindIII-) та В (HindIII+). На відміну від розглянутого NspI-поліморфізму в гені GHR, у цьому випадку кожний із алелів утримує додатковий до поліморфного мономорфний сайт рестрикції для HindIII.

На рис. 5.15 представлено електрофореграму продуктів рестрикції (HindIII) другого інтрону гену GHR.

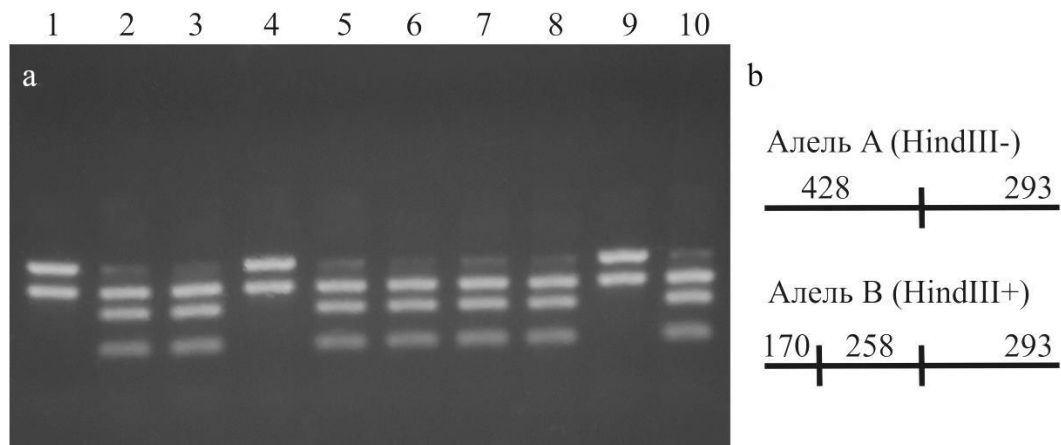


Рис. 5.15 Електрофореграма продуктів рестрикції 2-го інтрону гену рецептора гормону росту у яєчно-м'ясних курей породи полтавська глиняста (а). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (б).

Примітка: 1–10 – номери лунок; 1, 4, 9 – генотип А0 (HindIII-); 2, 3, 5 – 8, 10 – генотип В0 (HindIII+).

У цьому випадку алель А містить один мономорфний сайт рестрикції для *HindIII*, у той же час як алель В, нарівні з мономорфним, містить також і додатковий (поліморфний для локусу в цілому) сайт рестрикції. Наявність мономорфного сайту рестрикції дає змогу уникнути потенційної помилки генотипування, яка може бути спричинена недостатньою активністю ендонуклеази рестрикції, або наявністю інгібіторів у реакційній суміші. Типування різних алелів як *HindIII*⁺ або *HindIII*⁻ вказує тільки на наявність/відсутність поліморфного сайту (наявність мономорфного сайту в цьому випадку не враховується).

Як свідчать результати досліджень, ген рецептору гормону росту за *HindIII*-поліморфізмом у другому інтроні є поліморфним тільки у популяції курей породи полтавська глиняста, в якій у наявності особини обох можливих генотипів – А0 (*HindIII*⁻/0) та В0 (*HindIII*⁺/0) (рис. 5.15). У свою чергу, в інших дослідних популяціях курей різних напрямів продуктивності *GHR* є мономорфним (рис. 5.16).

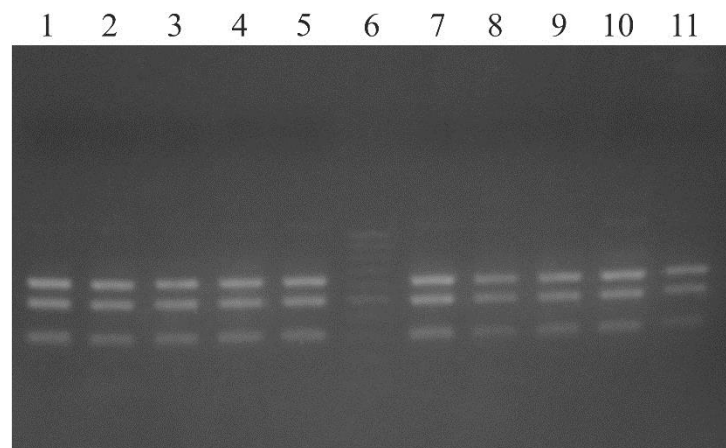


Рис. 5.16 Електрофореграма продуктів ПЛР рестрикції 2-го інтрону гену рецептора гормону росту в курей порід бірківська барвиста, Род-айленд червоний та плімутрок білий.

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1 – 5, 7 – 11 – генотип В0 (*HindIII*⁺); 6 – маркер молекулярних мас М-50.

В трьох зазначених популяціях курей в наявності лише особини з генотипом В0 (HindIII+). У цьому випадку ситуація прямо протилежна результатам генотипування за інсерцією в промоторній ділянці гену пролактину, у випадку з яким популяція полтавських глинястих курей є мономорфною, на відміну від усіх інших (розділ 5.1).

Як проілюстровано на рис. 5.15, кодування HindIII+ або HindIII- вказує на наявність/відсутність поліморфного сайту рестрикції (при цьому наявність мономорфного сайту в кожному із алелів не враховується). Використання такого типу кодування алелів вважаємо зручнішим порівнянно з загальноприйнятим (алелі А та В), що дає змогу уникнути плутанини при аналізі результатів досліджень інших авторів, які, інколи, досить вільно маркують алелі, як, наприклад, у роботах Enayati B. et al., 2009 та Seyyedbabayi M. et al., 2014.

Генетичну структуру дослідних ліній курей представлено у табл. 5.24.

Таблиця 5.24

Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності за локусом рецептора гормону росту (HindIII-поліморфізм)

Порода курей	Алелі	
	А (HindIII-)	В (HindIII+)
Плімутрок білий	0	1
Бірківська барвиста	0	1
Полтавська глиняста	0,29	0,71
Род-айленд червоний	0	1

За частотами алелів популяції курей порід плімутрок білий, бірківська барвиста та Род-айленд червоний значно різняться від порід курей, які були

вивчені у роботах зарубіжних дослідників. Мономорфний характер цього локусу різко відрізняє популяції курей української селекції (за винятком полтавських глинястих) від інших, в яких *GHR* за *HindIII*-поліморфізмом у другому інтроні є поліморфним, однак, частоти алелів *HindIII*+ та *HindIII*- в яких (згідно з результатами досліджень зарубіжних вчених) істотно варіюють. Зокрема, у популяціях іранських курей знайдено тільки одну особину з генотипом *HindIII*-/0 із загального поголів'я в 156 особин [245]. У той же час у іншій роботі частота алелю А (*HindIII*-) була істотно вища та досягала 0,15 [271]. У популяції яєчних курей породи білий леггорн частота алелю *HindIII*- становила 0,38 [234].

Беручи до уваги той факт, що тільки популяція курей породи полтавська глиняста за двома мутаціями *GHR*, які були вивчені, є поліморфною, провели аналіз розподілу частот гаплотипів *GHR* за обома мутаціями (табл. 5.25). Загальна кількість теоретично можливих гаплотипів відповідає чотирьом, а саме: А0А0 (*NspI*-/*HindIII*-); А0В0 (*NspI*-/*HindIII*+); В0А0 (*NspI*+/*HindIII*-); В0В0 (*NspI*+/*HindIII*+).

Таблиця 5.25

Частоти гаплотипів за локусом рецептору гормону росту в популяції курей породи полтавська глиняста

Гаплотипи <i>NspI</i> / <i>HindIII</i>	Кількість особин	
	n	%
А0А0 (<i>NspI</i> -/ <i>HindIII</i> -)	0	0
А0В0 (<i>NspI</i> -/ <i>HindIII</i> +)	13	29
В0А0 (<i>NspI</i> +/ <i>HindIII</i> -)	13	29
В0В0 (<i>NspI</i> +/ <i>HindIII</i> +)	19	42

За результатами досліджень встановлено, що у дослідній популяції курей (полтавська глиняста) з найбільшою частотою зустрічаються особини з

гаплотипом *NspI*⁺/*HindIII*⁺, в той же час як особин з гаплотипом *NspI*⁻/*HindIII*⁻ не виявлено (таблиця 5.25). У свою чергу кількість особин з гаплотипами *NspI*⁻/*HindIII*⁺ та *NspI*⁺/*HindIII*⁻ співпадає. Подібна картина розподілу гаплотипів *GHR* імовірно вказує на тиск відбору проти особин з гаплотипом *NspI*⁻/*HindIII*⁻, що у свою чергу може бути пов'язано з комбінованим напрямом продуктивності птиці.

5.11 *Bam*HI-поліморфізм у 5 екзоні гену рецептора пролактину

Алельні варіанти гену *PRLR* виникають як результат точкової мутації (SNP) у п'ятому екзоні в сайті рестрикції для *Bam*HI, утворенням двох алелів – А (*Bam*HI⁺) та В (*Bam*HI⁻) (рис. 5.17). Цей локус, як і *GHR*, також є гемізіготним, що визначає відсутність гетерозиготних особин у дослідних популяціях курей.

На рис. 5.17 представлено електрофореграму продуктів рестрикції (*Bam*HI) п'ятого екзону гену *PRLR*.

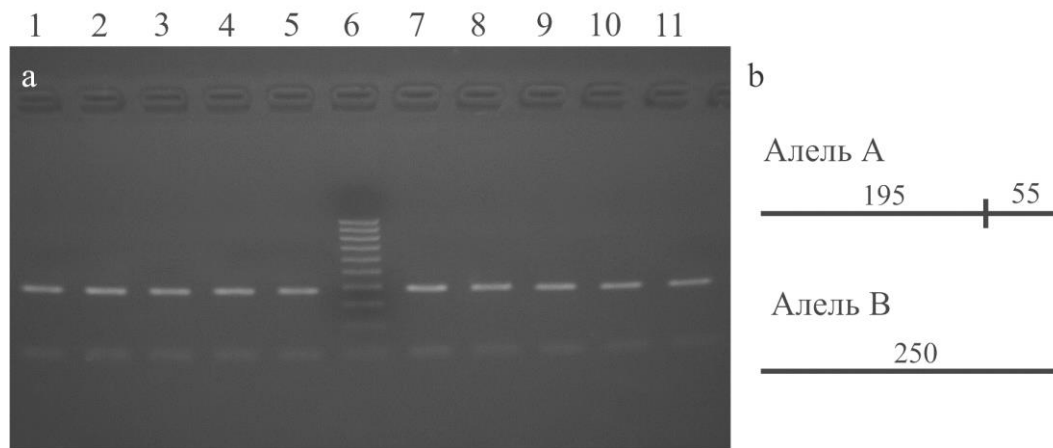


Рис. 5.17 Електрофореграма продуктів рестрикції 5-го екзону гену рецептору пролактину (а). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (б).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1–11 – генотип А0; 6 – маркер молекулярних мас М-50.

На наведеній електрофореграмі представлено тільки варіанти, які складаються із двох фрагментів 195 та 55 п.н., що відповідає генотипу A0 (BamHI+). За результатами проведених досліджень в усіх чотирьох дослідних породах курей виявлено особин з генотипом A0 (BamHI+), особин з генотипом B0 (BamHI-) не було. При цьому слід відзначити наявність у дослідних популяціях тільки особин з генотипом A0 (BamHI+), які утримують сайт рестрикції, що повністю запобігає ймовірності помилки при проведенні генотипування (виключає факт недостатньої активності ферменту або наявності інгібіторів у зразках), що було б можливим у випадку з генотипом B0 (BamHI-).

Таким чином, картина, що спостерігається, вказує на мономорфний характер гену рецептору пролактину за BamHI-поліморфізмом у п'ятому екзоні, що істотним чином відрізняє його від локусів, що були описані раніше у дисертаційній роботі.

Генетичну структуру популяцій, яка була вивчена за цим локусом, представлено у табл. 5.26.

Таблиця 5.26

Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності за локусом рецептора пролактину

Порода курей	Алелі	
	A (BamHI+)	B (BamHI-)
Плімутрок білий	1	0
Бірківська барвіста	1	0
Полтавська глиняста	1	0
Род-айленд червоний	1	0

Слід відмітити, що мономорфний характер 5-го екзону *PRLR* є характерним не тільки для сайту *VamHI*, але й в цілому для загального ампліфікованого фрагменту, що підтверджується результатами використання методу *SSCP* (в усіх випадках виявлений тільки один алель).

Мономорфний характер локусу *PRLR* різко відрізняє популяції курей української селекції від іноземних локальних популяцій, в яких цей локус є поліморфним. Зокрема, у нативних іранських популяціях курей (вперше виявлено цей поліморфізм) частоти алелів А (*VamHI+*) та В (*VamHI-*) становлять 0,72 та 0,28 відповідно [326]. Більш того, показаний зв'язок генотипу А0 з підвищеною яєчною продуктивністю птиці. Наявні дані дають змогу зробити висновок про притаманність алелю В (*VamHI-*) саме для нативних порід Ірану, однак для підтвердження цього припущення необхідно провести дослідження на інших породах курей (бажано на комерційних).

У свою чергу, в дослідження *Jiang R.S. et al.* також не виявлено поліморфізму в п'ятому екзоні *PRLR* як у нативних китайських популяціях, так й в комерційних лініях курей [309]. Подібні результати отримано й у роботі *Hassanane M.S. et al.* на популяціях локальних порід курей Судану [436].

5.12 *RsaI*-поліморфізм у 13 екзоні *Mx* гену

Поліморфізм *Mx* гену в 13 екзоні викликаний транзицією гуаніну в аденін у положенні 2032 (G2032A). Ця мутація, в свою чергу, призводить до заміни аспарагіну (N, *Asn631*) на серин у положенні 631 білку *Mx* (*Ser631*). Ця мутація має провідне господарсько-корисне значення, так як встановлено, що наявність серину (S) в положенні 631 білку *Mx* (*Ser631*) супроводжується пригніченням противірусної активності. Тоді як наявність аспарагіну (N, *Asn631*) корелює з вираженою противірусною активністю. Як показали результати досліджень зарубіжних колег, ця транзиція міститься в сайті рестрикції для *RsaI*, що дало змогу розробити досить простий та зручний метод її визначення.

За результатами проведених досліджень виявлено поліморфізм Mx гену в усіх дослідних популяціях курей. Електрофореграму продуктів рестрикції, а також структуру алельних варіантів представлені на рис. 5.18.

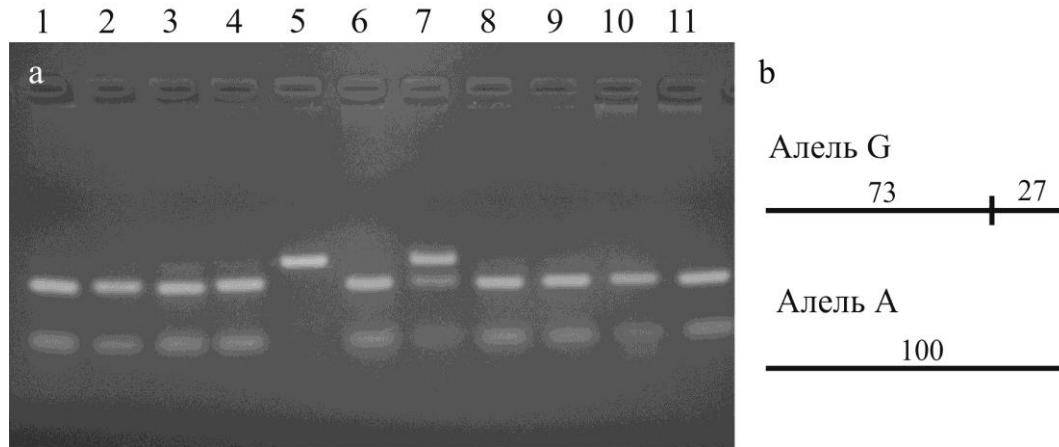


Рис. 5.18 Електрофореграма продуктів рестрикції 13-го екзону гену Mx (а). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (б).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1–4, 6, 8–11 – генотип GG, 5 – AA, 7 – AG.

У кожній з дослідних популяцій виявлено особин усіх можливих, за цим поліморфізмом, генотипів (AA, AG та GG).

Слід відзначити, що у певних публікаціях, RsaI-поліморфізм Mx гену визначають за використання електрофорезу в поліакриламідному гелі, що пов'язано, в першу чергу, з розмірами рестрикційних фрагментів (100, 73 та 27 п.н.) [344, 349].

Однак окремі автори працюють і з агарозним гелем, використання якого дає цілу низку переваг (тривалість електрофорезу, простота проведення тощо) [348]. Як результат проведених досліджень встановлено, що використання 2,5–3,0 % агарозного гелю цілком достатньо для ефективного генотипування та дає змогу, з високим ступенем точності, визначити на електрофореграмі всі рестрикційні фрагменти. Використання гелів більш низьких концентрацій призводить до погіршення якості візуалізації фрагментів та до появи можливих

помилки у генотипуванні внаслідок погіршення ступеня розходження фрагментів.

Не дивлячись на наявність особин усіх можливих генотипів, генетична структура дослідних популяцій суттєво різняться (таблиця 5.27).

Таблиця 5.27

**Генетична структура дослідних популяцій курей за RsaI-поліморфізмом
Mx гену**

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		AA	AG	GG	A	G	
Плімутрок білий	O	6	29	65	0,21	0,79	1,21
	E	4,41	33,18	62,41			
Бірківська барвиста	O	15	45	40	0,375	0,625	0,16
	E	14,06	46,88	39,06			
Полтавська глиняста	O	4	20	76	0,14	0,86	2,87
	E	1,96	24,08	73,96			
Род-айленд червоний	O	1	23	76	0,125	0,875	0,26
	E	1,56	21,87	76,57			

Найбільша кількість особин з генотипом AA (резистентний генотип) виявлено у популяції яєчних курей породи бірківська барвиста, найменша – у лінії 38 род-айленду червоного. При цьому найбільшу кількість особин із генотипом GG (чутливий генотип) встановлено у популяціях курей яєчно-м'ясного напрямку продуктивності.

Аналіз спостережуваних та очікуваних розподілів генотипів не виявив коливань від стану генетичної рівноваги у кожній з дослідних популяцій, що свідчить про відсутність тиску відбору за цим локусом.

Основні параметри генетичної мінливості дослідних популяцій курей за поліморфізмом Mx гену представлено в табл. 5.28.

**Основні генетико-популяційні характеристики ліній курей за локусом
Mx гену**

Порода курей	Ca	n _e	H _o	H _e	F _{is}
Плімутрок білий	0,668	1,50	0,29	0,332	0,13
Бірківська барвиста	0,531	1,88	0,45	0,469	0,04
Полтавська глиняста	0,759	1,32	0,20	0,241	0,17
Род-айленд червоний	0,781	1,28	0,23	0,219	-0,05

Індекс фіксації Райта в лініях Г-2, 14 та А був позитивним та становив 0,13; 0,17 та 0,04 відповідно. Провідне значення індексу фіксації в популяції курей породи полтавська глиняста вказує на виражений ексцес гомозигот, причому в рівному ступені для алелів А та G. У свою чергу, в лінії 38 спостерігався незначний ексцес гетерозигот (-0,05). Найбільше значення ефективного числа алелів, що вказує на найвищий рівень поліморфності в локусі, який було вивчено, спостерігався у популяції курей лінії А (1,87), найменший – в лінії 38 (1,28). Популяції курей ліній Г-2 та 14 займають проміжне положення (1,49 та 1,32 відповідно).

5.13 MspI-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту

Мета даного розділу – вивчення поліморфізму гену гормону росту (MspI-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту) в популяціях курей порід плімутрок білий, бірківська барвиста, полтавська глиняста та Род-айленд червоний.

Використання ПЛР з наступним рестрикційним аналізом дозволило виявити варіабельність гену гормону росту в дослідних популяціях (рис. 5.19).

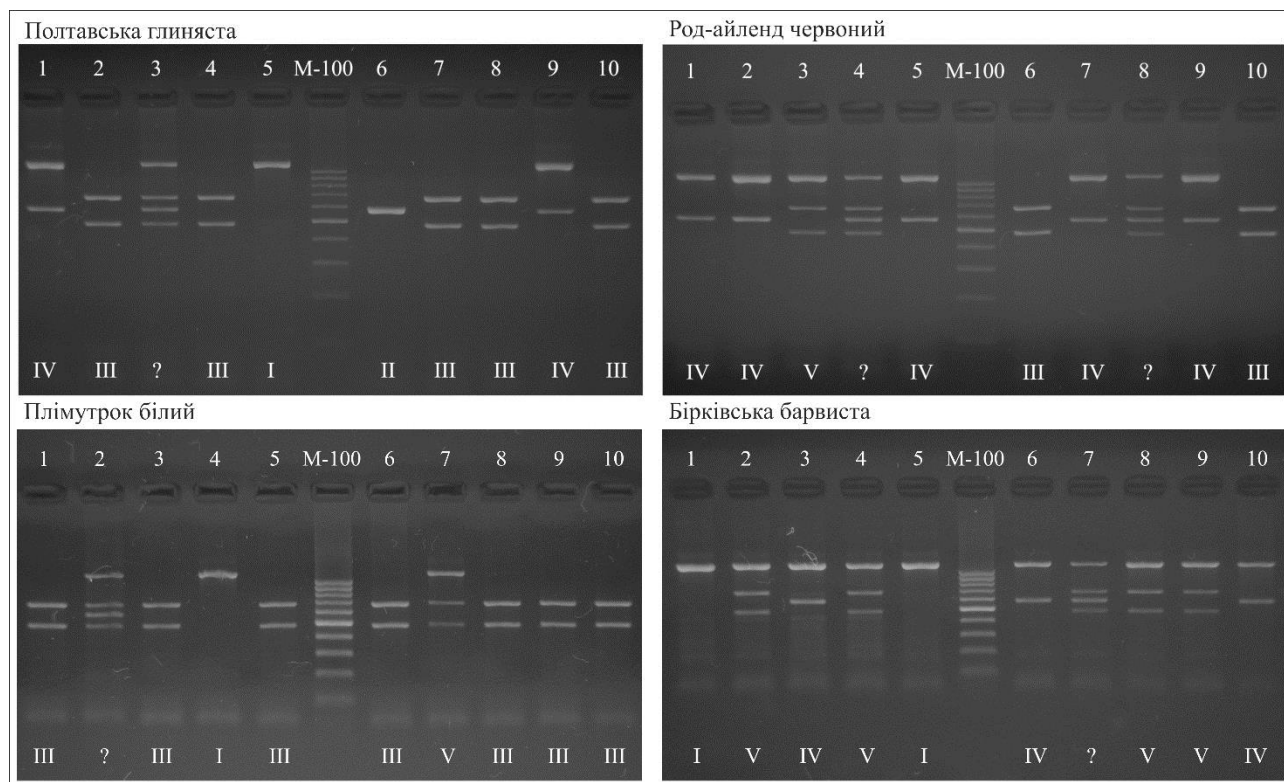


Рис. 5.19 Електрофореграми продуктів рестрикції 4-го інтрону гену гормону росту (кури різних порід).

Примітка: 1–10 – номери лунок; М – молекулярний маркер М-100; I, II, III, IV, V, VI – відповідні патерни рестрикції.

Як свідчать результати досліджень, ген гормону росту (за наявності *MspI*-поліморфізму в четвертому інтроні) є поліморфним у всіх популяціях курей, які було вивчено. В наявності три алелі – А, В та С, що в сумі дає шість можливих генотипів.

У всіх лініях курей виявлено особини з генотипами АА, ВВ, СС, АВ та АС. Особин з генотипом ВС не виявлено. Однак при генотипуванні в наявності варіанти, які за характером розподілу фрагментів ДНК відхиляються від загальноприйнятої моделі патернів рестрикції для *MspI* (відмічені знаком питання на фотографіях електрофореграм) (рис. 5.19). Представлені на електрофореграмі генотипи вочевидь відрізняються від інших, отримані результати високовідтворювані, особини цих генотипів виявлені в усіх популяціях курей, які були вивчені. У зв'язку з неможливістю інтерпретації

результатів досліджень, які спостерігаються, що в свою чергу призводить до ускладнень при визначенні генетичної структури дослідних популяцій курей за цим локусом, була поставлена задача всебічного вивчення цього феномену із залученням різних методів досліджень.

Для вирішення питання щодо генотипування цих особин необхідно детально проаналізувати варіанти патернів рестрикції четвертого інтрону гену гормону росту для MspI. На рис. 5.20 приведено узагальнюючу схему загальноприйнятих патернів рестрикції.

Електрофореграма	Схема рестрикції	Патерн	Генотип
		I	A/A
		II	B/B
		III	C/C
		IV	A/B
		V	A/C
		VI	B/C

Рис. 5.20 Патерни рестрикції для MspI четвертого інтрону гену гормону росту та відповідні генотипи

На запропонованій схемі приведено патерни рестрикції (позначені римськими цифрами від I до VI) та відповідні ним генотипи (AA, BB, CC, AB, AC та BC). Також приведено фотографії електрофореграм (рестрикційні фрагменти ДНК), кожна із яких відповідає певному генотипу за MspI-

поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту. Розміри рестрикційних фрагментів подані для зручності розрахунків у вигляді округлених значень. Використання наведених на рисунку патернів рестрикції дає змогу проводити безпомилкове генотипування за цим локусом.

Порівняння отриманих у результаті досліджень електрофореграм з наведеною схемою дає змогу успішно визначити додаткові патерни рестрикції (генотипи).

Як результат проведених досліджень встановлено, що у всіх чотирьох популяціях курей, які були вивчені, в наявності особини з «додатковим» фенотипом (патерн V згідно роботі Shahnaz S. із співавторами [437]) (рис. 5.19). «Додатковий» генотип, що спостерігається, не відповідає жодному із патернів рестрикції четвертого інтрону гену гормону росту для MspI та містить у своєму складі фрагменти, характерні для усіх трьох алелів А, В та С (~ 1200, ~ 700, ~ 600 та ~ 500 п.н.).

До схожої картини (виникнення патерну VII згідно з класифікацією, що наведено на рис. 5.20) може призводити ряд неспецифічних факторів, таких як недостатня активність ферменту (ендонуклеази рестрикції), наявність у реакційній суміші інгібіторів, незбалансовані умови реакції.

Для перевірки цього припущення було проведено серію експериментів, що включали в себе варіації параметрів часу рестрикції та концентрації ампліфікованої ДНК-мішені. Однак у кожному випадку як кінцевий результат спостерігали повторення первинного варіанту, тобто наявність на електрофореграмі додаткового нерозрізаного фрагменту не підлягає сумніву.

До ідентичних результатів привели досліди із заміни MspI на фермент, який було отримано з іншої партії.

Подібним чином використання HpaII, як ізошизомеру MspI, також не змінює загальної картини, що свідчить про відсутність впливу індивідуальних особливостей ферменту на шаблон рестрикції продуктів ампліфікації (рис. 5.21).

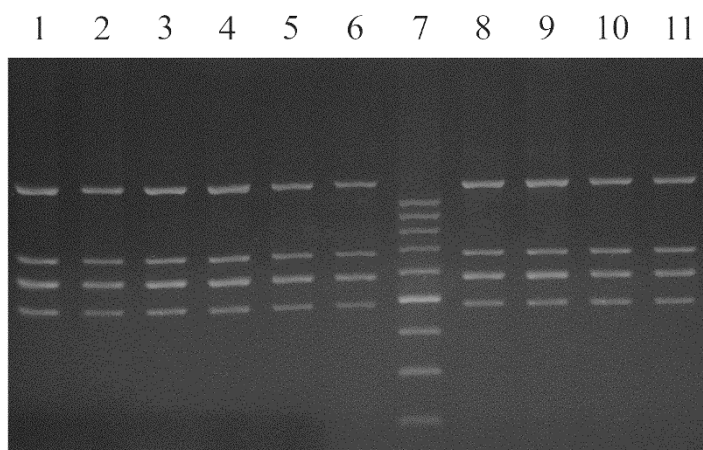


Рис. 5.21 Електрофореграма продуктів рестрикції четвертого інтрону гену гормону росту (рестриктази *MspI* та *HpaII*).

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1–6 – обробка *MspI*; 8–11 – обробка *HpaII*; 7 – маркер молекулярних мас М-100.

За використання реагентів GeneJET Gel Extraction провели екстракцію додаткового фрагменту ДНК розміром ~ 1200 п.н. із агарозного гелю з наступною обробкою *MspI*, з метою виключення технічної можливості «недопереварювання» рестриктазою вихідного фрагменту. Як результат дослідження з'ясовано, що фрагмент, який було виділено, не містить канонічного сайту рестрикції *CCGG* (вирізаний із гелю додатковий фрагмент ДНК після обробки ендонуклеазою рестрикції залишився у нативному стані, тобто у вигляді вихідного фрагменту).

Отже, проведені дослідження дають змогу виключити вплив вищеперелічених чинників на дослідний патерн рестрикції для *MspI*.

Наявність на електрофореграмах додаткового фрагменту (патерн VII) було встановлено також і в роботі індійських вчених, яка присвячена вивченню зв'язку *MspI*-поліморфізму в четвертому інтроні гену гормону росту з продуктивними ознаками курей різних порід (білий леггорн, а також нативних популяцій) [437]. Частота зустрічальності особин цього фенотипу в популяції бентамських курей становила 0,03; при цьому в комерційній лінії яєчних курей породи білий леггорн особин даного фенотипу не виявлено.

У виконаній роботі, для пояснення картини, яка спостерігалась, автори припустили наявність дуплікації гену гормону росту, яка досить широко розповсюджена та спостерігається у багатьох інших видів тварин, таких як вівці, кози, мавпи тощо. Дійсно, у цьому випадку припущення про дуплікацію гену може пояснити наявність трьох алелів одного локусу в однієї особини. Однак при цьому виникає питання щодо структури дуплікації гену, тобто, якщо при дуплікації зачеплений четвертий інтрон гену, то які алелі за MspI-поліморфізмом зчеплені один з одним? При цьому дуплікація гену обов'язково повинна супроводжуватися зміною сайту рестрикції у дуплікованому фрагменті, що й дало змогу припустити її наявність у різних видів тварин.

На рис. 5.22 приведено імовірні патерни рестрикції для MspI за умови дуплікації гену гормону росту.

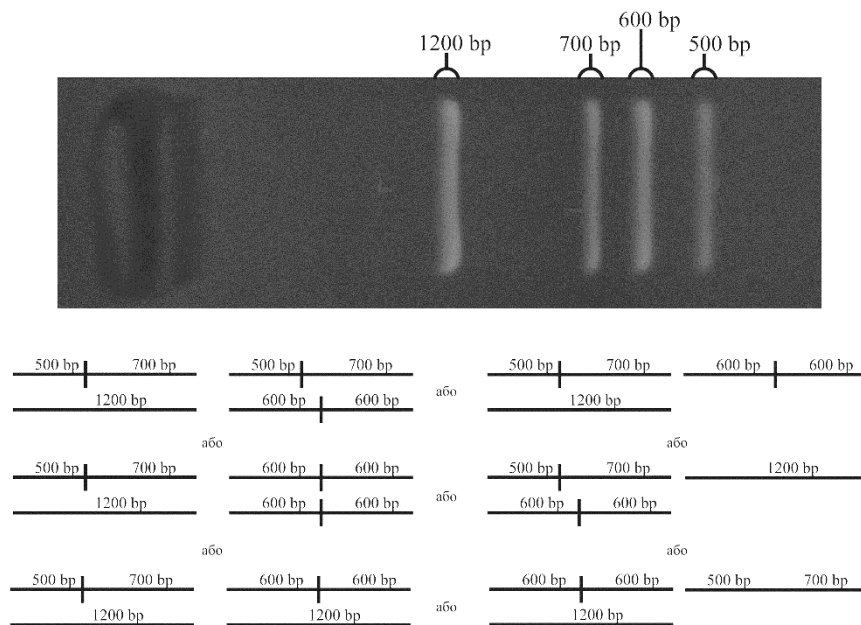


Рис. 5.22 Імовірні патерни рестрикції для MspI при наявності дуплікації гену гормону росту

У випадку, що розглядається, який обмежений можливостями рестрикційного аналізу, припускається наявність шести варіантів патернів рестрикції для MspI, які включають у себе як гомозиготні, так і гетерозиготні генотипи відносно дуплікації гену. Кількість варіацій обмежена шістьма, так

як усі інші можливі варіанти призводять до ідентичної картини взаємного розміщення рестрикційних фрагментів на електрофореграмі та, відповідно, їх неможливо розрізнити.

З метою вивчення структури імовірної дуплікації гену гормону росту провели генотипування нащадків F1 від особин відомих генотипів (використовували курей порід полтавська глиняста та бірківська барвіста). Як результат проведених досліджень отримано особин (F1) з цілком очікуваними генотипами за деякими винятками (табл. 5.29). При схрещуванні особин з генотипами BB та CC, отримано особини з патерном VII замість очікуваних гетерозигот BC. При цьому без єдиного винятку.

Таблиця 5.29

Схема схрещувань курей породи полтавська глиняста із зазначенням генотипів батьків та нащадків F1

Група	Генотип батьківських особин	Генотип нащадків (F1)
1	AA (I) × AA (I)	AA (I)
2	AA (I) × BB (II)	AB (IV)
3	AA (I) × CC (III)	AC (V)
4	BB (II) × CC (III)	VII
5	CC (III) × CC (III)	CC (III)
6	AA (I) × VII	AB (IV); AC (V)
7	BB (II) × VII	BB (II); VII
8	CC (III) × VII	VII; CC (III)
9	AB (IV) × VII	AB (IV); AC (V); BB (II); VII
10	AC (V) × VII	AB (IV); AC (V); CC (III); VII
11	VII × VII	BB (II); CC (III); VII

Як результат всіх проведених досліджень виникає цілком закономірне питання, як при схрещуванні гомозиготних особин, кожна із яких має алель

гормону росту, котрий, в свою чергу, містить сайт рестрикції для MspI, можна отримувати потомство, яке має додатковий фрагмент цього гену, який не утримує канонічного сайту?

Передбачувана наявність дуплікації гену, а також повна відсутність гетерозигот типу ВС у дослідних популяціях курей (у тому числі й у поколінні F1), призводить до необхідності проведення досліджень з метою детального уточнення структури «додаткового» фрагменту та трьох вихідних алелів.

Для вирішення поставленої задачі провели ампліфікацію вирізаного із гелю додаткового фрагменту ДНК, з наступною рестрикцією MspI. У рамках цих досліджень було отримано патерн VII. Отже, виникло нове запитання – як на матриці фрагменту ДНК, який не утримує сайту рестрикції для MspI, ампліфікуються фрагменти, що утримують ці сайти? Більш того, отримані рестрикційні фрагменти в точності відповідають за розмірами алелям В та С! При цьому вихідний виділений із гелю фрагмент не утримує сайту рестрикції для MspI, що доводять досліди з рестрикції цього фрагменту, які описані вище.

Крім того зроблено припущення, яке здатне теоретично довести картину, що спостерігається, про утворення в реакційній суміші гетеродуплексів – фрагментів ДНК, які складаються із двох не повністю комплементарних ланцюгів при ампліфікації гетерозигот типу ВС. Гетеродуплекси утворюються як результат багаточисельних циклів денатурації/гібридизації (відпалу) в процесі ПЛР. Більш того, наявність гетеродуплексних фрагментів ДНК, які ймовірно відповідають додатковому фрагменту, дає змогу пояснити результати, що були отримані при проведенні ампліфікації та наступній рестрикції виділеного із гелю фрагменту.

Слід відзначити, що питання про утворення гетеродуплексної ДНК вивчались також й іншими авторами. Зокрема, показано утворення гетеродуплексів при ампліфікації суміші відмінних за походженням зразків (які належать до різних видів тварин) [438]. Відмічений негативний вплив гетеродуплексної ДНК на проведення RAPD-аналізу внаслідок утворення різних артефактів тощо [420].

Для перевірки цього припущення було проведено наступне дослідження. На першому етапі були взяті гомозиготи ВВ та СС, зразки ДНК змішали між собою та ампліфікували. Також окремо провели ампліфікацію зразків ВВ та СС. На другому етапі продукти ПЛР зразків ВВ та СС змішали один з одним у еквівалентних кількостях та розділили на дві групи. Першу групу, а також окремі та змішані на першому етапі зразки ВВ та СС, піддали обробці *MspI*. Зразки другої групи переносили на термостатування при 94 °С протягом 5 хвилин та при 20 °С протягом також 5 хвилин з наступною рестрикцією *MspI*. Далі всі зразки переносили на гель-електрофорез.

Результати досліджень повністю підтвердили зроблене припущення про утворення гетеродуплексної ДНК в процесі ПЛР. Із однієї й тієї ж суміші ВВ та СС залежно від температурних умов отримали генотип ВС та патерн VII (рис. 5.23).

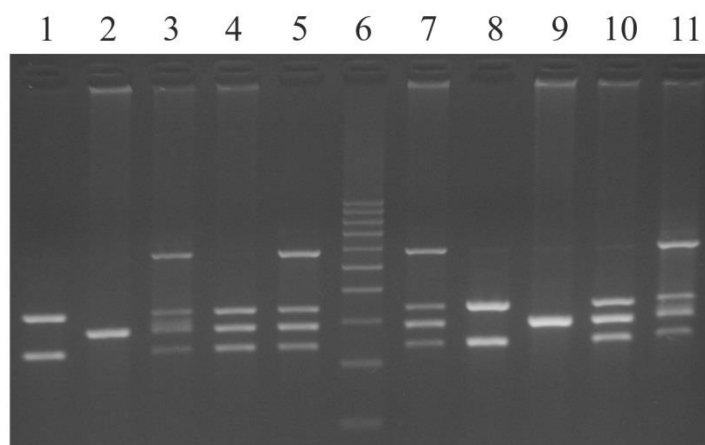


Рис. 5.23 Електрофореграма продуктів рестрикції четвертого інтрону гену гормону росту.

Примітка: 1–11 – номери лунок; 1, 8 – СС; 2, 9 – ВВ; 3, 11 – суміш ВВ та СС з температурною обробкою; 4, 10 – суміш ВВ та СС без температурної обробки; 5, 7 – змішані проби ВВ та СС з наступною ампліфікацією; 6 – маркер молекулярних мас М-200.

Таким чином, як свідчують результати досліджень, утворення гетеродуплексів ініціюється денатурацією з наступною гібридизацією у

випадку змішаних зразків ВВ та СС, а також при ампліфікації вихідних гетерозигот ВС. У той же час зразки з першої групи не піддавались тепловій обробці, завдяки чому зберегли свій нативний стан (гомодуплекси, що складаються із повністю комплементарних ланцюгів ВВ та СС), чим і пояснюється різниця в результатах рестрикції.

У подальшому провели секвенування всіх трьох алелів – А, В та С, а також виділеного фрагменту за використання ABI Prism 3130.

Результати досліджень підтвердили дані рестрикційного аналізу про наявність/відсутність сайтів рестрикції в кожному із алелів (рис. 5.24).

	461	· · · · ·	481
Алель А	AAAGCCAGGCC	<u>CTGGG</u>	GAGCAAA
Алель В	AAAGCCAGGCC	<u>CTGGG</u>	GAGCAAA
Алель С	AAAGCCAGGCC	<u>CCGGG</u>	GAGCAAA
Фрагмент	AAAGCCAGGCC	<u>CTGGG</u>	GAGCAAA
	571	· · · · ·	591
Алель А	GCAGTTTGAGC	<u>CTGGT</u>	GGGGGGG
Алель В	GCAGTTTGAGC	<u>CCGGT</u>	GGGGGGG
Алель С	GCAGTTTGAGC	<u>CTGGT</u>	GGGGGGG
Фрагмент	GCAGTTTGAGC	<u>CTGGT</u>	GGGGGGG

Рис. 5.24 Нуклеотидні послідовності ділянок, що фланкують сайти рестрикції для *MspI* у різних алелях гену гормону росту.

Примітка: сайт рестрикції для *MspI* виділено підрядковою рисою.

Як і передбачалося, алель В містить канонічний сайт (CCGG) для *MspI* в положенні 581 – 584, алель С – в положенні 471 – 474. При цьому алель А не містить сайтів рестрикції зовсім.

У випадку з додатковим фрагментом хроматограму, яку отримано як результат секвенування, обробили в програмі DNA Baser 4 version 4.16.0.25 для пошуку мутацій і виявили наявність одонуклеотидного поліморфізму С/Т (У, транзиція цитозину на тимін) в сайтах рестрикції для *MspI*, що також підтверджує гіпотезу про додатковий фрагмент як гетеродуплекс. Наявність одонуклеотидного поліморфізму в додатковому фрагменті пов'язана з виникненням двох типів гетеродуплексної ДНК, що пояснює результати

ампліфікації вирізаного із гелю додаткового фрагменту, який не містить сайту рестрикції (рис. 5.25).

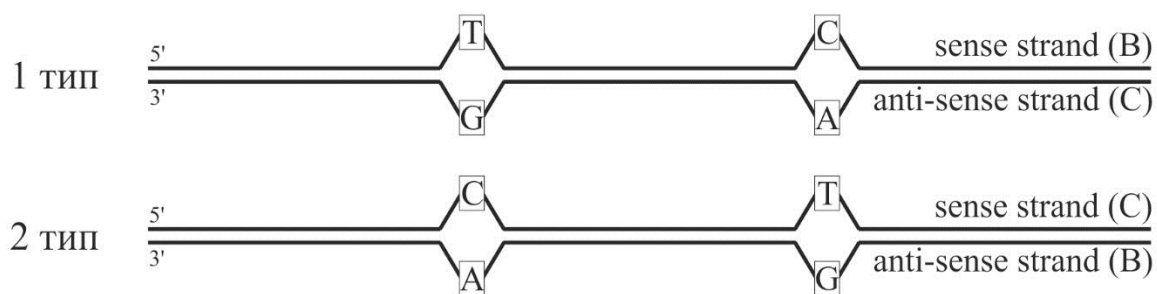


Рис. 5.25 Різні типи гетеродуплексної ДНК, які формуються в процесі ПЛР.

Примітка: sense strand (B) – смисловий ланцюг алелю В; sense strand (C) – смисловий ланцюг алелю С; anti-sense (C) – антисмисловий ланцюг алелю С; anti-strand (B) – антисмисловий ланцюг алелю В.

Перший тип містить у своєму складі як смисловий ланцюг алеля В, як антисмисловий – ланцюг алеля С; у свою чергу, другий тип гетеродуплексної ДНК утримує як смисловий ланцюг алеля С та як антисмисловий – ланцюг алеля В.

Фрагмент хроматограми та обидва сайти представлено на рис. 5.26.

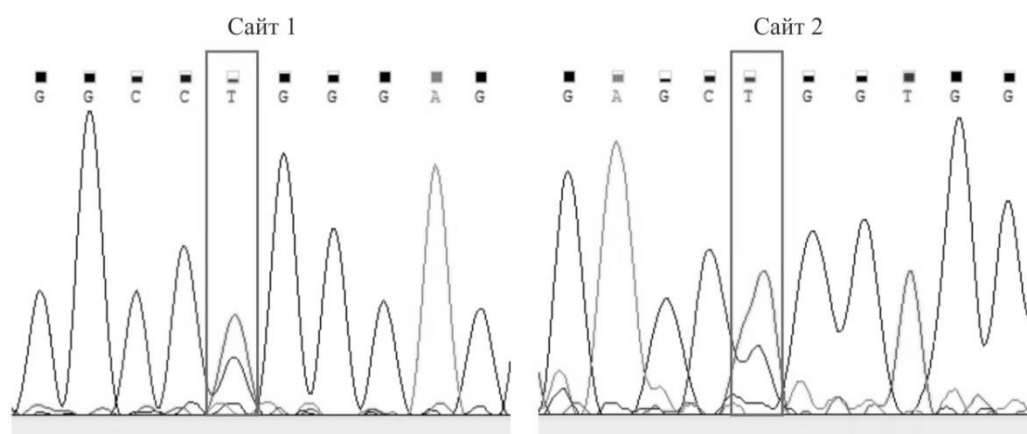


Рис. 5.26 Хроматограма ділянок «додаткового фрагменту»

Як видно на представленій хроматограмі, в обох сайтах у положенні тиміну знаходяться два піки, що перекриваються. В обох випадках у наявності піки для

тиміну та цитозину, що перекриваються, тобто у матеріалі, що аналізується, наявні декілька варіантів нуклеотидних послідовностей (максимально можлива кількість відповідає 4 варіантам).

Резюмуючи все вищевикладене можна стверджувати, що «додатковий» фенотип (патерн VII) ніяким чином не пов'язаний з феноменом дуплікації гену та повністю відповідає генотипу ВС. Разом з тим в цьому випадку доцільно використовувати термін фенотип, а не генотип, так як патерн рестрикції (патерн VII), який спостерігається, відображає не генотип, як такий, а утворюється як результат специфічних процесів під час ПЛР.

Наразі, на основі отриманих даних, перейдемо до аналізу генетичної структури дослідних ліній курей.

Генетична структура популяцій курей, які були вивчені, за локусом гормону росту істотно відрізняється (табл. 5.30).

Таблиця 5.30

Генетична структура популяцій курей різних порід за локусом гормону росту (четвертий інтрон, MspI)

Порода курей	Значення	Генотип						Алель			χ^2
		AA	BB	CC	AB	AC	BC	A	B	C	
Плімут рок білий	О	27	6	6	17	40	4	0,56	0,16	0,28	10,47 *
	Е	31,36	2,56	7,84	17,92	31,36	8,96				
Бірківська барвіста	О	56	0	3	14	25	2	0,75	0,08	0,17	1,17
	Е	56,25	0,64	2,89	12	25,5	2,72				
Полтавська глиняста	О	3	0	74	5	8	10	0,1	0,07	0,83	19,10 **
	Е	1	0,49	68,89	1,4	16,6	11,62				
Род-айленд червоний	О	7	7	17	20	20	29	0,27	0,31	0,42	2,05
	Е	7,29	9,61	17,64	16,74	22,68	26,04				

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$

Так, у популяціях курей порід полтавська глиняста та бірківська барвиста, гомозиготних за алелем В особин не виявлено, при цьому для полтавської глинястої характерна найбільша частота зустрічальності особин генотипу СС та, відповідно, найвища частота алеля С. Найбільша кількість особин з генотипом ВС виявлено в популяції курей породи Род-айленд червоний, найменша – бірківська барвиста. В популяціях курей порід плімутрок білий та полтавська глиняста спостерігалось порушення генетичної рівноваги ($\chi^2 = 10,47$ та $19,10$ відповідно).

У табл. 5.31 представлено дані щодо генетичної мінливості популяцій курей порід, які були вивчені, за локусом гормону росту.

Таблиця 5.31

Основні генетико-популяційні характеристики дослідних ліній курей за локусом гормону росту

Порода курей	С _a	n _e	H _o	H _e	F _{is}
Плімутрок білий	0,42	2,38	0,61	0,58	-0,05
Полтавська глиняста	0,7	1,43	0,23	0,3	0,23
Род-айленд червоний	0,35	2,86	0,69	0,65	-0,06
Бірківська барвиста	0,6	1,66	0,41	0,4	-0,02

Найбільший рівень гетерозиготності характерний для популяцій курей порід плімутрок білий та род-айленд червоний (0,58 та 0,65), найменший – для полтавських курей.

Найвищий рівень поліморфності (ефективне число алелів) за локусом гормону росту виявився в лінії 38, найнижчий – в лінії 14.

Також, виходячи із отриманих результатів, стає зрозумілим відсутність особин генотипу ВС (патерн V) в популяції білого леггорну в дослідженнях S. Shahnaz зі співавторами. Очевидно, це пов'язано з повною відсутністю у цій

популяції алелю В (на відміну від інших досліджених порід курей в популяції білого леггорна ген гормону росту за MspI-поліморфізмом у четвертому інтроні представлений тільки двома алелями – А та С).

В цілому, утворення гетеродуплексної ДНК в процесі ампліфікації може призводити до ускладнень при інтерпретації електрофореграм у випадку наявності більше двох алелів дослідного локусу (практично будь-якого). Тому при проведенні рестрикційного аналізу, особливо у випадку вивчення генних дуплікацій, необхідно враховувати вірогідність утворення цих артефактів.

Таким чином, як результат проведених досліджень встановлено, що в популяціях курей порід плімутрок білий, полтавська глиняста, род-айленд червоний та бірківська барвіста ген гормону росту за MspI-поліморфізмом у четвертому інтроні є поліморфним. Доведено утворення в процесі ампліфікації гетерозигот ВС гетеродуплексної ДНК двох різних типів, що призводить до виникнення артефактів при проведенні електрофорезу рестрикційних фрагментів. Визначено нуклеотидну послідовність алелів А, В та С, а також додаткового фрагменту. З'ясовано, що утворення «додаткового» фрагменту не пов'язано з дуплікацією гену гормону росту. Виявлені істотні відмінності в генетичній структурі дослідних популяцій курей за локусом гормону росту.

В свою чергу, особливості формування гетеродуплексної ДНК при аналізі поліморфізму мікросателітних локусів розглянули у відповідному розділі (розділ 3.1).

5.14 AluI-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту

При вивченні MspI-поліморфізму в четвертому інтроні гену гормону росту були отримані нуклеотидні послідовності, які слугували матеріалом для подальших досліджень. Детальний аналіз, проведений за використання відповідного програмного забезпечення, дав змогу виявити раніше не описані у науковій літературі мутації у четвертому інтроні гену гормону росту курей. При цьому визначені були різні типи мутацій – транзиції, трансверсії тощо.

Однак, беручи до уваги той факт, що метою досліджень слугувала необхідність вивчення генетичної структури різних популяцій курей, то у подальшому аналізували тільки ті мутації, які знаходяться у сайтах рестрикції, що у свою чергу, дало змогу б розробити метод ПЛР-ПДРФ для проведення генотипування особин. У такому випадку список мутацій, що підходять для розробки методу ПЛР-ПДРФ, дуже обмежений, так як поліморфні варіанти мають розрізнятися за своєю структурою саме унікальних для кожного ферменту сайтів рестрикції. Отже, фрагмент, що аналізується, може утримувати достатньо значну кількість різних мутацій і, при цьому, не відповідати вищенаведеним вимогам.

За використання аналізу нуклеотидних послідовностей четвертого інтрону гену гормону росту курей було визначено поліморфізм у сайті рестрикції для AluI (рис. 5.27).

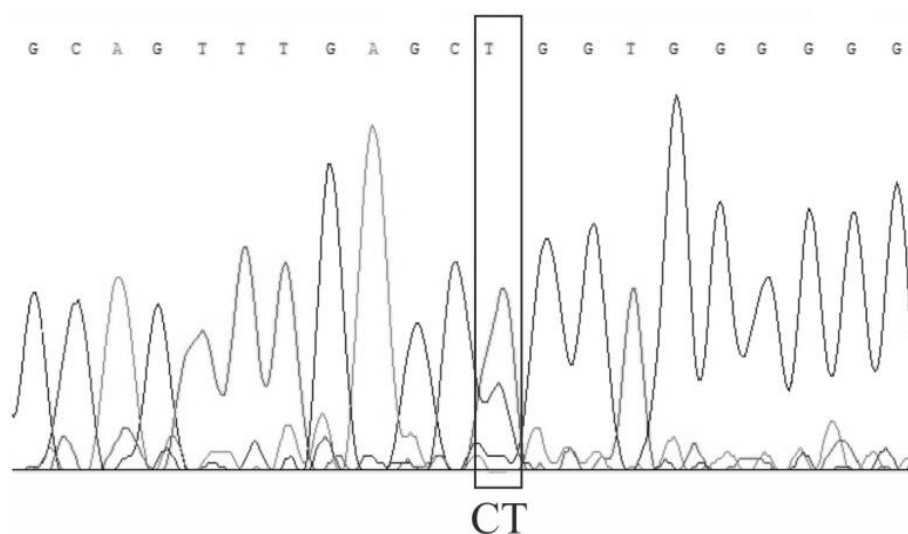


Рис. 5.27 Нуклеотидна послідовність фрагменту четвертого інтрону гену гормону росту курей, гетерозиготний генотип.

Примітка: прямокутником виділено поліморфний сайт.

На представленому рисунку приведена нуклеотидна послідовність фрагменту четвертого інтрону *GH* курей. Наявність піків, які перекриваються,

вказує на точкову мутацію (транзиція цитозину в тимін у положенні 1788455), що призводить до утворення сайту рестрикції для *AluI* AGCT. Виходячи з цього, наявність цитозину відповідає алелю *AluI* -; тиміну – алелю *AluI* +.

На підставі отриманих даних провели обробку декількох зразків (популяція курей породи род-айленд червоний) відповідною ендонуклеазою рестрикції *AluI*. Результати повністю підтвердили зроблені на підставі аналізу нуклеотидних послідовностей висновки про наявність *AluI*-поліморфізму в дослідній популяції (рис. 5.28).

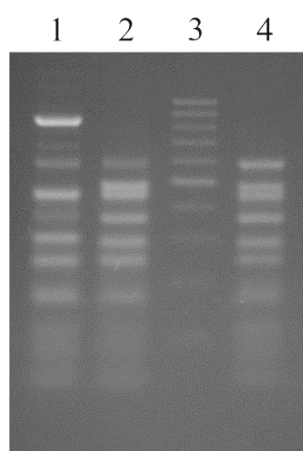


Рис. 5.28 Електрофореграма продуктів рестрикції четвертого інтрону гену гормону росту з використанням *AluI*.

Примітка: 1–4 – номери лунок; 1 – *AluI* +; 2, 4 – *AluI* - ; 3 – маркер молекулярних мас М-100.

За результатами досліджень були визначені поліморфні варіанти *GH*. Однак, у випадку проведення досить масштабних досліджень генетико-популяційної структури дослідних ліній курей, використання вихідного ампліфікованого фрагменту (~1200 п.н.) для вивчення *AluI*-поліморфізму не є доцільним, у зв'язку з утворенням значної кількості фрагментів, що істотно ускладнює аналіз електрофореграм. Так як галузь застосування методу ПЛР-ПДРФ – проведення рутинних досліджень генетико-популяційної структури, то доцільно підбирати такі умови проведення рестрикції (патерни рестрикції), які

давали б змогу використовувати для генотипування, в першу чергу, агарозні гелі (що істотно спрощує процес досліджень). Для цього повинні бути досить виражені різниці в розмірі рестрикційних фрагментів, тобто відмінності у довжині «порізаних» фрагментів ДНК повинні легко визначатися. Відсутність виражених відмінностей у розмірах фрагментів може призводити до ускладнень при генотипуванні особин та до необхідності використання поліакриламідних гелів, які мають більшу, порівняно з агарозними, розподільчу здатність, але при цьому є більш трудозатратними.

Зокрема, вихідний ампліфікаційний фрагмент містить 8 – 9 мономорфних сайтів рестрикції для AluI, що призводить до утворення значної кількості фрагментів на електрофореграмі та, відповідно, ускладнює ефективність генотипування (рис. 5.31). Тому виникає необхідність у підборі праймерів до ділянки гену, який містить поліморфний сайт рестрикції, таким чином, щоб кількість рестрикційних фрагментів, що утворюються, не ускладнювала проведення аналізу. На власний погляд, оптимальним є підбір фрагменту, який містить один мономорфний сайт рестрикції та один поліморфний. Наявність мономорфного сайту, у цьому контексті, дасть змогу уникнути технічної можливості часткової активності ферменту, тобто наявність на електрофореграмі фрагменту, що відповідає за розмірами вихідному ампліфікованому фрагменту, не буде слугувати перешкодою для ефективного генотипування (можна успішно генотипувати особин при неповній активності ендонуклеази рестрикції).

За використання відповідного програмного забезпечення підібрали праймери, які фланкують ділянку четвертого інтрону, що містить один мономорфний сайт рестрикції для AluI та один поліморфний сайт:

Forward: 5'-CTGAGGGACGTGGTTATGGGCAC-3';

Reverse: 5'-GACCTCAAGGATTGCAGGGCT-3'.

Температура відпалу становила 63 °С, розмір ампліфікованого фрагменту – 460 п.н.

Обробку ампліфікованих фрагментів проводили за використання *AluI* за пропонованою виробником методикою.

Патерни рестрикції для кожного алелю та фотографія електрофореграми представлені на рис. 5.29.

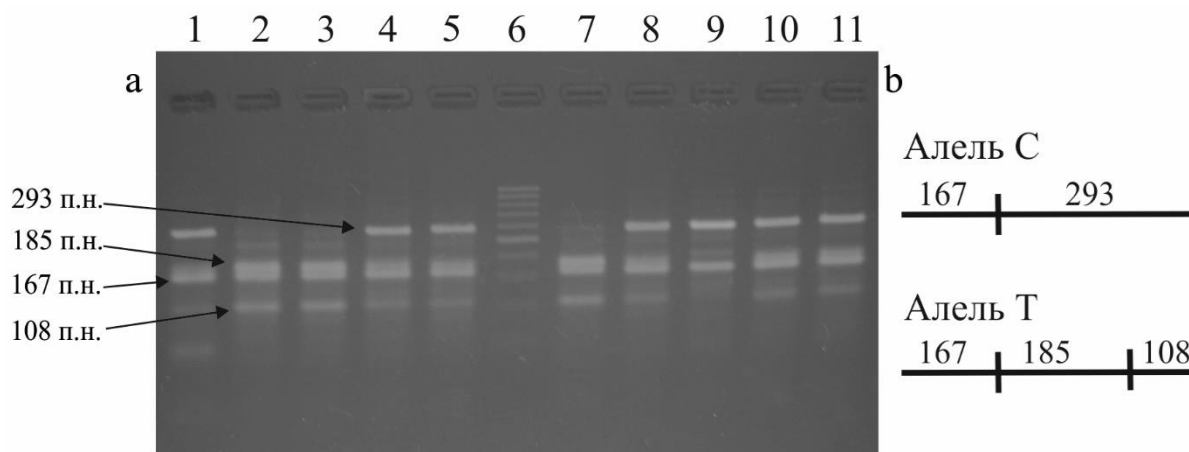


Рис. 5.29 Електрофореграма продуктів рестрикції фрагменту четвертого інтрону гену гормону росту курей (а). Схема патернів рестрикції та відповідні алелі (b).

Примітка: стрілочками позначені рестрикційні фрагменти. 1–11 – номери лунок; 1, 4, 5, 8, 10, 11 – генотип СТ; 2, 3, 7 – ТТ; 9 – СС.

Як видно із результатів досліджень, отримані «спектри» фрагментів ДНК на електрофореграмі відповідають розрахованим патернам рестрикції (на основі аналізу нуклеотидних послідовностей). Генотип СС представлений на електрофореграмі двома фрагментами розміром 167 та 293 п.н.; ТТ – 108, 185 та 167 п.н.; СТ – 108, 185, 167 та 293 п.н. відповідно.

Секвенування ділянки гену, фланкованого розробленими праймерами, підтверджує результати, отримані при визначенні нуклеотидної структури вихідного фрагменту. Як свідчать представлені послідовності, алелю *AluI* + відповідає алель Т; *AluI* - – алель С. Відповідно кодування алелів проводили співвідносно типу азотистої основи у поліморфному сайті (цитозин/тимін).

На рис. 5.30 представлено нуклеотидні послідовності ампліфікованого фрагменту особин різних генотипів.

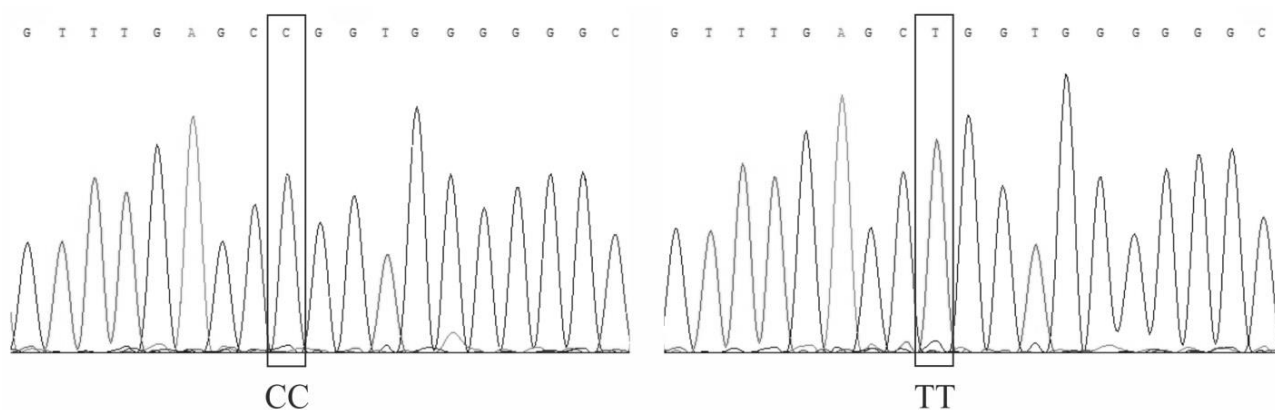


Рис. 5.30 Нуклеотидні послідовності фрагменту четвертого інтрону гену гормону росту курей різних генотипів.

Примітка: прямокутником виділено поліморфний сайт.

Отримані результати (запропонована структура праймерів тощо) дають змогу проаналізувати генетичну структуру дослідних популяцій курей за цим поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту.

Так, як результат проведених досліджень встановлено, що ген гормону росту (за *AluI*-поліморфізмом у четвертому інтроні) є поліморфним у всіх популяціях курей, які були досліджені.

Генетичну структуру дослідних популяцій курей представлено у табл. 5.32.

Таблиця 5.32

Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності за локусом гормону росту (четвертий інтрон, *AluI*)

Порода курей	Значення	Генотип			Алель		χ^2
		CC	CT	TT	C	T	
Плімутрок білий	O	0	8	20	0,14	0,86	1,020
	E	0,55	6,74	20,71			
Бірківська барвиста	O	2	12	85	0,08	0,92	3,370
	E	0,63	14,57	83,79			
Полтавська глиняста	O	0	4	41	0,04	0,96	0,157
	E	0,07	3,46	41,47			
Род-айленд червоний	O	8	44	48	0,30	0,70	0,220
	E	9	42	49			

Отримані результати свідчать про значну мінливість значень частот зустрічальності різних генотипів у популяціях курей різних порід. При цьому слід відзначити, вірогідність відмінностей у частотах алелів між популяцією курей породи род-айленд червоний та всіма іншими. У той же час між популяціями інших порід вірогідних розбіжностей не виявлено. Особин, гомозиготних за алелем С, виявлено тільки у популяціях курей порід род-айленд червоний (8 %) та бірківська барвиста (2 %). У свою чергу, найбільшу кількість особин, гомозиготних за алелем Т, виявлено в популяції курей породи полтавська глиняста (91,1 %), найменшу – в лінії 38 (48 %).

У табл. 5.33 представлено основні показники генетичної мінливості дослідних популяцій курей за вказаним поліморфізмом.

Таблиця 5.33

Основні генетико-популяційні характеристики дослідних ліній курей за локусом гормону росту

Порода курей	Ca	n _e	H _o	H _e	F _{is}
Плімутрок білий	0,76	1,32	0,29	0,24	-0,21
Бірківська барвиста	0,85	1,18	0,12	0,15	0,20
Полтавська глиняста	0,92	1,09	0,09	0,08	-0,13
Род-айленд червоний	0,58	1,72	0,44	0,42	-0,05

Найбільш виражений ексцес гетерозигот спостерігався в лінії Г-2, найменший – в лінії А. Лінія 38 характеризувалася найбільшим рівнем поліморфізму за показником ефективного числа алелів, лінія 14 – найменшим. Усі дослідні популяції курей знаходились у стані генетичної рівноваги.

Таким чином, як результат аналізу нуклеотидних послідовностей четвертого інтрону гену гормону росту курей визначено новий поліморфізм в

сайті рестрикції для AluI (транзиція С→Т в положенні Chr27:1788455). Підбрано праймери, які фланкують фрагмент четвертого інтрону гену розміром 460 п.н., що містить поліморфний сайт рестрикції для AluI. Виявлено, що ген гормону росту (за AluI-поліморфізмом у положенні 1788455) є поліморфним у всіх вивчених вітчизняних популяціях курей. Частота алелю С (відсутність сайту рестрикції) у дослідних популяціях курей змінювалась у межах від 4 % (полтавська глиняста) до 30 % (Род-айленд червоний). Наявність транзиції С→Т було характерно для переважної кількості особин та становило 70–96 %. На фоні переважання особин, які мають транзицію С→Т, у всіх досліджених популяціях курей відмічені відмінності у розподілі частот алелів та генотипів більшою мірою мали індивідуальний характер, що свідчить про необхідність обліку впливу породних особливостей при дослідженні алельного поліморфізму в межах одного напрямку продуктивності.

5.15 Динаміка генетичної структури популяції курей породи бірківська барвиста за локусами кількісних ознак

Як відомо, в основі еволюції лежить зміна генетичної структури популяції у часі. Тому вивчення динаміки зміни частот алелів у дослідних популяціях є однією з першочергових задач еволюційної біології. Більш того, вивчення динаміки частот алелів та генотипів на рівні ДНК (ДНК-маркери) дає змогу оцінити ефективність селекційного процесу та відповісти на питання – чи є достатнім використання класичних методів селекції, які ґрунтуються на оцінюванні особин за фенотипом для отримання чистолінійної птиці. Або, дещо перефразуючи, чи відбувається збільшення в селекційних популяціях частоти бажаних алелів/генотипів, які пов'язані із господарсько-корисними ознаками? Вивчення динаміки генетичної структури за цільовими поліморфними локусами дає змогу також проводити аналіз дії мікроеволюційних процесів у штучних популяціях тварин та птиці під дією чинників відбору, дрейфу генів тощо.

Для дослідження впливу селекційної роботи на генетичну структуру дослідної лінії здійснено аналіз зміни частот генотипів та алелів у популяціях курей яєчного напрямку продуктивності породи бірківська барвиста лінія А, а саме, дані за поліморфними локусами *PRL* (дві мутації), *GH* (дві мутації), *TGF-β2*, *TGF-β3* та *PIT-1*. Для проведення досліджень проведемо порівняльний аналіз генерацій 2011 та 2013 років.

На рисунку 5.31 вказано розподіл частот алелів за поліморфними локусами у генераціях курей, які були вивчені.

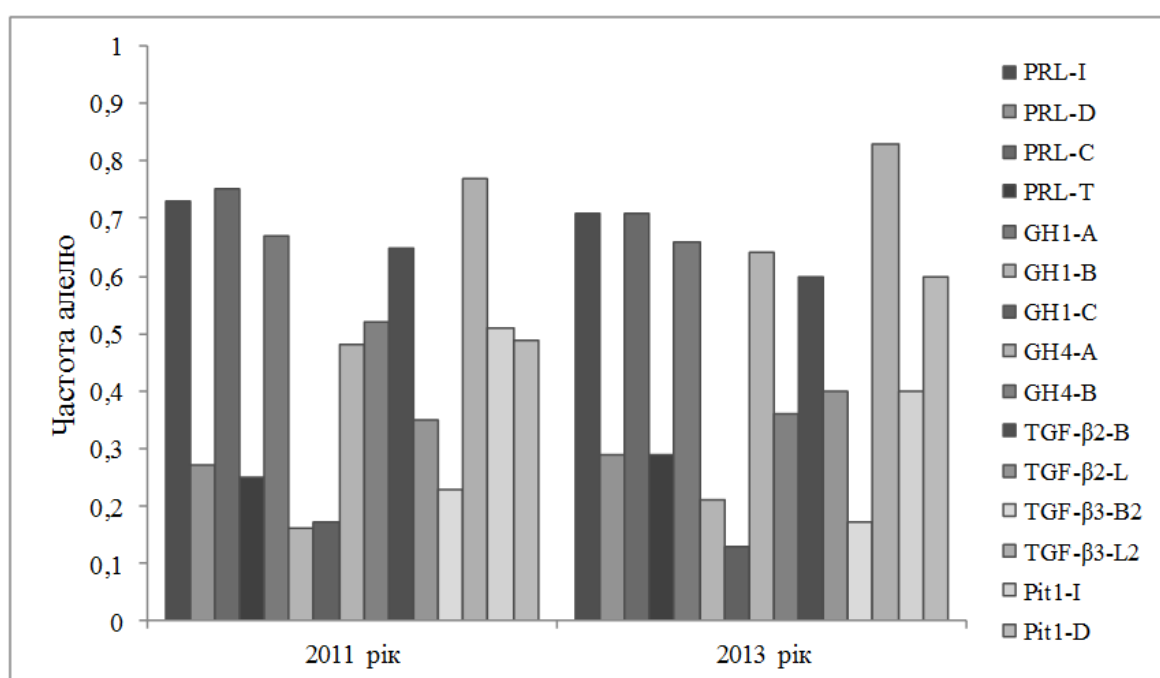


Рис. 5.31 Розподіл частот алелів за поліморфними локусами у популяції курей породи бірківська барвиста лінія А за даними 2011 та 2013 років

Аналіз розподілу частот у дослідних генераціях курей за локусом пролактину свідчить, що для обох генерацій характерно переважна кількість гомозиготних особин з генотипами II (24 Indel) та CC (C-2402T), яка становила 50 – 52 %. Частота «високопродуктивного» алелю I у різних генераціях залишалась майже на одному рівні. Істотних змін за рівнем частот алелів за два

покоління відбору за використання традиційних методів селекції не виявлено. Спостерігався деякий перерозподіл частот гетерозиготних генотипів, яких на 7 – 8 % було менше у 2013 році, що відповідно відобразилось на незначному збільшенні кількості гомозиготних особин, у тому числі, й за «непродуктивними» алелями D та T. Однак, встановлені відмінності знаходились у межах статистичної похибки, про що свідчить відсутність відхилення від рівноважного розподілу за Харді-Вайнбергом ($\chi^2 = 1,05-3,39$).

Аналіз поліморфізму в гені гормону росту виявив найбільший відсоток особин, які мають алель A (GH1-MspI). Частота цього алелю у дослідних генераціях практично ідентична (0,67 у 2011 та 0,66 – у 2013 році відповідно). Алелі B та C зустрічались істотно рідше, здебільшого у складі гетерозиготних генотипів. Подібний розподіл частот алелів та генотипів, а також повна відсутність у генерації 2011 року особин з генотипом BC відобразилась на факті відхилення від теоретично очікуваних частот генотипів за Харді-Вайнбергом ($\chi^2 = 12,9$). Слід відзначити, що популяція 2013 року за цим поліморфізмом перебуває у стані генетичної рівноваги (при цьому у наявності особини усіх можливих генотипів).

За GH4-SacI поліморфізмом спостерігався своєрідний перерозподіл частот алелів у бік збільшення частки алелю A у популяції 2013 року (практично на одну третину порівняно з 2011 роком). Причому збільшення частоти алелю A відбувалося за рахунок збільшення кількості гомозиготних особин та зниження частки гетерозигот. Слід відзначити, що, не дивлячись на досить істотні відмінності, в обох генераціях не спостерігалось відхилення від стану генетичної рівноваги.

У локусах генів родини трансформуючих ростових факторів β частоти алелів та генотипів у досліджених генераціях істотно не змінювались. Для *TGF- β 2* та *TGF- β 3* частоти алелів B та L у відповідних популяціях незначно коливались у межах статистичної похибки. Порушень у розподілі генотипів у межах генерацій, що були досліджені, не виявлено.

Аналіз поліморфізму локусу PIT-1 виявив, що у генерації 2013 року частка алелю D (делеція 57 п.н.) збільшилась з 49 % до 60 % за рахунок збільшення кількості гомозиготних особин з генотипом DD внаслідок зниження рівня гетерозиготності. При цьому кількість особин з генотипом II зменшилася незначно (з 0,24 до 0,22). У генерації 2013 року виявлено порушення генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом ($\chi^2 = 6,25$). Зміни генетичної структури популяції за цим локусом відобразились у різкому збільшенні індексу фіксації Райта (з -0,06 у 2011 році до 0,25 – у 2013 році), значення якого вказує на виражений ексцес гомозигот (інбридинг) (рис. 5.32).

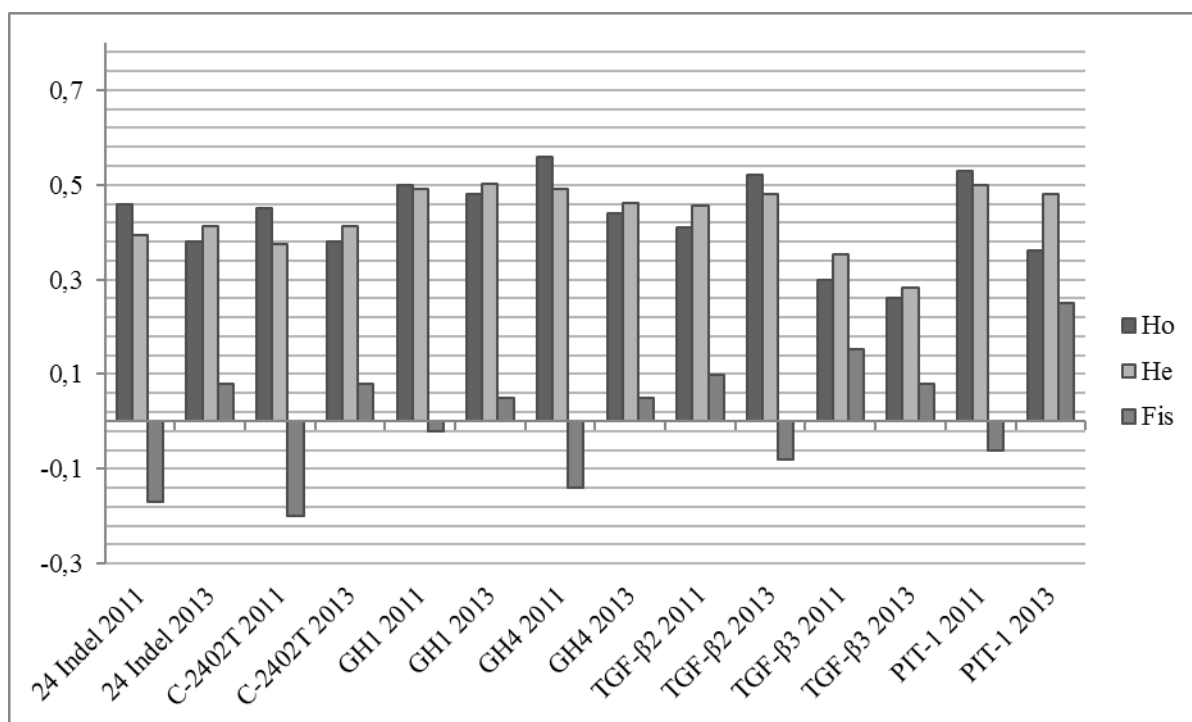


Рис. 5.32 Основні генетико-популяційні характеристики курей породи бірківська барвиста за обраними поліморфними локусами (дані 2011 та 2013 років)

Подібного роду відхилення у частотах алелів, які виникають на фоні відсутності порушень рівноважного стану в розподілі генотипів (*PIT-1*, $\chi^2 = 0,303$ у 2011 році) у попередніх генераціях, є не виключенням із правил, а повністю закономірним явищем для штучних популяцій. Обмежена кількість

особин, порушення співвідношення самців та самиць за умов відтворення, штучний відбір, дрейф генів – це ймовірний список чинників, який не дає змогу використовувати тест на відповідність розподілу за Харді-Вайнбергом як основу для прогнозування стабільності відтворення існуючих частот алелів та генотипів у наступній генерації в разі аналізу штучних популяцій птиці.

За всіма вивченими поліморфними локусами середній рівень фактичної гетерозиготності (H_o) у генерації 2011 року було незначно вище порівняно з 2013 роком (0,46 та 0,40 відповідно). Показник розрахункової гетерозиготності (H_e) в середньому залишався на рівні 0,44 для обох генерацій. Аналіз значення та розміру показника F_{is} свідчить, що у популяції курей 2011 року в цілому спостерігався незначний ексцес гетерозиготних особин порівняно з очікуваним рівнем, в той же час як у 2013 році спостерігали більшу кількість гомозиготних за алелями, що були досліджені, особин. В цілому, за усіма дослідженими поліморфними локусами, за винятком *TGF- β 2*, коефіцієнт F_{is} змінився у бік позитивних значень, що вказує на загальне збільшення кількості гомозигот за кожним із локусів, які були вивчені. У свою чергу за *TGF- β 2* спостерігали збільшення негативного значення F_{is} . Однак в умовах відсутності вірогідних змін від розподілу за Харді-Вайнбергом (у 12 випадках із 14) виявлені відмінності у співвідношенні генотипів можна віднести тільки до тенденції.

При вивченні рівня поліморфності окремо взятого локусу (показник n_e), генерації, які порівнюються, у середньому за дослідними локусами, істотно не відрізнялись ($n_e = 1,79$ в обох випадках). За окремо взятих локусів найбільший рівень поліморфності серед двоалельних генотипів характерний для *PIT-1* ($n_e = 1,99$ у 2011 році та 1,92 – у 2013 році), найменший – для *TGF- β 3* ($n_e = 1,55$ і 1,39 відповідно).

Отже, за деякими виключеннями, що вказані вище, розподіл частот алелів та генотипів за кожним із вивчених маркерів дещо коливається за умови відповідності стану генетичної рівноваги. Однак, необхідно мати на увазі, що дослідні популяції курей відносяться до штучних, що, у свою чергу, накладає певні обмеження на інтерпретацію генетичних даних. У цілому можна

відзначити, що штучний відбір, який проводиться за фенотипом, істотним чином не змінює співвідношення частот алелів та не призводить до максимального збільшення частоти бажаних, пов'язаних зі збільшеними продуктивними якостями (у випадку, який розглядається, це показники яєчної продуктивності птиці), алелів у популяції. Не дивлячись на виражений тиск відбору, частоти непродуктивних алелів (як наприклад D та T у випадку яєчного напрямку продуктивності птиці) у популяції залишаються на досить стабільному рівні, що, природним чином, пов'язано з неможливістю їх ідентифікації методами класичної селекції у гетерозиготних особин, продуктивні якості яких можуть лише незначно відрізнятися від таких у гомозигот за продуктивними алельними варіантами. Саме «маскування» небажаних алелів у гетерозиготному стані та дає змогу їм уникнути тиску відбору, що й призводить до генетичної структури популяції, котру спостерігали.

Таким чином, усе вищенаведене свідчить про необхідність доповнення методів класичної селекції сучасними молекулярно-генетичними підходами, які ґрунтуються на використанні ДНК-маркерів, що з успіхом використовуються у більшості розвинутих країн світу. Саме за використання подібних підходів були отримані комерційні лінії курей яєчного напрямку продуктивності, які є мономорфними за цілим рядом маркерів (локусів), що пов'язані з підвищеними продуктивними якостями.

5.16 Генетична диференціація дослідних популяцій за поліморфізмом локусів кількісних ознак

Узагальнюючу оцінку генетичної диференціації дослідних популяцій курей різного напрямку продуктивності проведено шляхом розрахунку генетичних дистанцій за дослідженими поліморфними локусами (аналізували як PCR-RFLP, так і Indel маркери). Значення генетичних дистанцій, а також

протилежащих їм за значенням показників генетичної подібності приведено у табл. 5.34.

Таблиця 5.34

Генетичні дистанції та генетична подібність дослідних популяцій курей

Порода курей	Плімутрок білий	Бірківська барвиста	Полтавська глиняста	Род-айленд червоний
Плімутрок білий	***	0,195	0,112	0,042
Бірківська барвиста	0,823	***	0,232	0,249
Полтавська глиняста	0,894	0,793	***	0,071
Род-айленд червоний	0,959	0,780	0,931	***

Примітка: генетичні дистанції позначені над діагоналлю; генетична подібність – під діагоналлю.

Найбільш генетично віддаленими породами виявились породи бірківська барвиста та род-айленд червоний (24,9 % відмінностей). У цілому можна відмітити, що порода курей яєчного напрямку продуктивності найбільш виражено відрізняється від комбінованого. При цьому максимально виражені відмінності з породами яєчно-м'ясного напрямку продуктивності (23–25 % відмінностей у алельних варіантах локусів). Розбіжності між породами курей м'ясо-яєчного та яєчно-м'ясного напрямків продуктивності виражені не достатньо. Максимальні відмінності спостерігаються між породами полтавська глиняста та плімутрок білий (11,2 %), мінімальні – між род-айлендом червоним та плімутроком білим (4,2 %). У свою чергу, величина генетичної дистанції між двома породами яєчно-м'ясного напрямку займає проміжне положення відносно вищенаведених (7,1 % розбіжностей).

При аналізі генетичної диференціації дослідних популяцій курей можна відмітити, що для ліній різних напрямів продуктивності характерна різна картина розподілу частот алелів досліджених поліморфних локусів, при цьому за різними маркерами «рівень прояву» відмінностей різний. У зв'язку з цим доцільно оцінити вираженість відмінностей за окремими локусами між дослідними популяціями. Вагомим інструментом у цьому випадку може слугувати коефіцієнт F_{st} , який безпосередньо відображає диференціацію популяцій та може бути розрахований для окремих локусів. Значення коефіцієнту F_{st} окремо за кожним із локусів між різними популяціями можна використовувати для визначення ступеня вираженості відмінностей (генетичної диференціації) дослідних ліній курей за обраними генами.

Так, за локусом пролактину, у розрізі досліджених мутацій, відмінності між птицею яєчного та комбінованого напрямів продуктивності чітко виражені, що підтверджується також значеннями F_{st} , які становлять від 0,34 до 0,55 для 24 Indel та від 0,11 до 0,33 для C-2402T відповідно. За наявності інсерції в локусі пролактину максимальні відмінності виявлені з лінією 14, що визначається мономорфним характером цього локусу в цій популяції. У свою чергу значення F_{st} між лініями комбінованих напрямів продуктивності не істотні. Значення генетичної диференціації за Райтом (F_{st}) корелюють зі значеннями генетичних дистанцій за Неєм (D_n), що розраховані окремо для локусу пролактину. Значення D_n для популяцій курей яєчного та комбінованого напрямів продуктивності знаходились в межах від 0,66 до 0,97 для 24 Indel та від 0,22 до 0,65 – для C-2402T.

За локусом гормону росту ситуація безпосередньо визначається типом мутації. За поліморфними варіантами у першому інтроні (MspI-поліморфізм) осторонь знаходиться популяція курей породи полтавська глиняста, яка суттєво відрізняється від м'ясо-яєчних ($F_{st} = 0,19$) та яєчно-м'ясних курей (0,23), але не від яєчних (0,09). Між іншими дослідними лініями відмінності незначні.

У свою чергу за AluI-поліморфізмом у четвертому інтроні від загальної маси курей дещо відрізняється лише порода Род-айленд червоний. У цьому випадку

значення F_{st} коливаються від 0,04 до 0,12; в той же час між іншими популяціями – у межах 0,03–0,08.

У випадку із SacI-поліморфізмом у четвертому інтроні *GH* відмінності між породами яєчного та комбінованого напрямку продуктивності виражені найбільш різко, порівняно з іншими мутаціями у цьому локусі, які коливались від 0,23 до 0,33. Для порід комбінованого напрямку характерні практично мінімальні значення F_{st} – 0,02–0,08.

За MspI-поліморфізмом у четвертому інтроні *GH* найбільш подібні між собою виявились породи плімутрок білий з бірківської барвистої (0,03) та з Род-айлендом червоним (0,05), які, в свою чергу, між собою дещо відмінні (0,14). Найбільші різниці спостерігаються між полтавською глинястою та яєчними курями (0,39), а також й плімутроком білим (0,23). Закономірності, що спостерігаються, повністю відповідають значенням генетичних дистанцій за Неєм.

За поліморфізмом генів родини трансформуючих ростових факторів β спостерігається така картина: у випадку з MboII-поліморфізмом екзонів ділянки *TGF- β 1* відокремлюється популяція яєчних курей. У цієї популяції мінімальні відмінності (0,11) з лінією 14 та максимальні – з лінією 38 (0,24); значення F_{st} порівняно з м'ясо-яєчними курями – 0,18. Між популяціями комбінованого напрямку продуктивності відмінності не виражені.

Що до RsaI-поліморфізму промоторного фрагменту *TGF- β 2*, то, у цьому випадку, особливо виражених коливань між дослідними лініями не виявлено. Найбільше значення індексу F_{st} виявлено між популяціями плімутроку білого та полтавської глинястої.

Як й у попередньому випадку, за локусом *TGF- β 3* значення F_{st} між дослідними популяціями незначні. За PstI-поліморфізмом у локусі інсуліноподібного ростового фактору-I значних різниць за показником F_{st} між усіма дослідними популяціями не встановлено.

При дослідженні HinfI-поліморфізму в промоторній ділянці гену інсуліноподібного ростового фактору-I з'ясовано, що у цьому випадку,

найбільші відмінності від усіх інших досліджених популяцій характерні для лінії м'ясо-яєчних курей, за винятком їх порівняння з род-айлендом червоним. Для усіх інших ліній різниці не істотні.

Також і за локусом PIT-1 істотних відмінностей у значеннях показнику F_{st} не виявлено.

За RsaI-поліморфізмом гену Mx у всіх популяціях спостерігається подібна картина – значення F_{st} коливається у межах від 0,01 до 0,08; що, у свою чергу, свідчить про слабку, або середню дивергенцію дослідних популяцій.

У цілому відмінності у розподілі частот алелів у дослідних популяціях курей можуть визначатися як напрямом відбору (у бік яєчної або м'ясної продуктивності тощо), так і породними особливостями. Більш того, селекційна робота, яка проводиться, основана на оцінці особин за фенотипом, дає змогу обирати особин для формування гнізд, найчастіше на основі цілого ряду чинників, кожний із яких пов'язаний з «роботою» сукупності генів (алелів). Кількісні ознаки визначаються сукупною активністю значної кількості генів, тому відібрані особини, які характеризуються бажаними параметрами продуктивності, можуть містити у собі й непродуктивні алелі у складі комплексних генотипів, що особливо проявляється у випадку гетерозигот. Усі ці разом взяті чинники й призводять до подібного розподілу.

На підставі наведених генетичних дистанцій за сукупністю локусів побудували дендрограму (за використання алгоритму найближчого сусіда, Neighbor Joining) генетичних взаємовідношень між дослідними популяціями курей.

Структура філогенетичного дерева в цілому відповідає описаним раніше закономірностям та відображає відмінності дослідних ліній курей за напрямками продуктивності птиці. Як свідчить представлена дендрограма, популяції курей яєчно-м'ясного напрямку продуктивності формують окремий кластер. У той же час кури м'ясо-яєчного та яєчного напрямів продуктивності формують окремі гілки, при цьому порода яєчних курей демонструє найбільші генетичні відмінності порівнянно з іншими лініями (рис. 5.33).

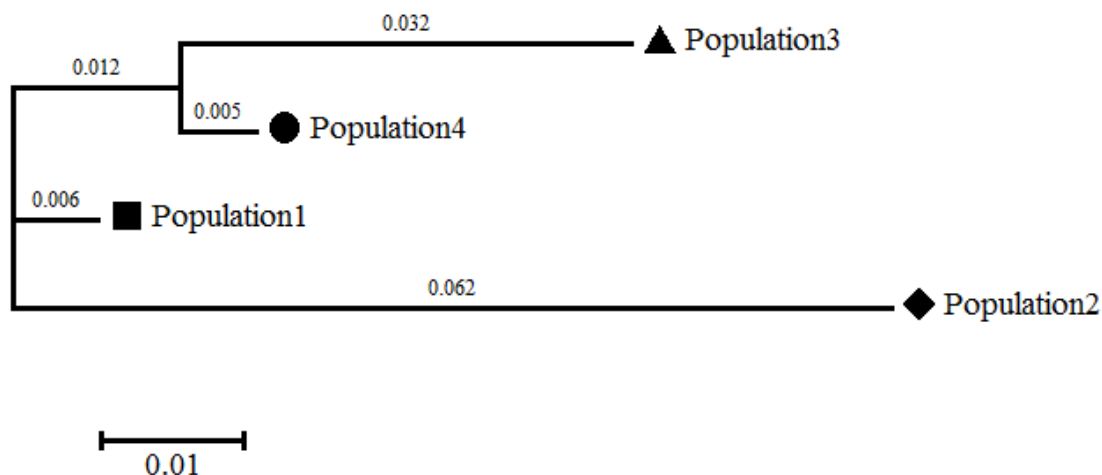


Рис. 5.33 Дендрограма міжпопуляційних взаємин, побудована за аналізом генетичних дисстанцій (Nei) методом приєднання сусідів (Neighbor Joining).

Примітка: Population1 – Плімутрок білий лінія Г-2; Population2 – Бірківська барвиста лінія А; Population3 – Полтавська глиняста лінія 14; Population4 – Род-айленд червоний лінія 38.

Картина, що спостерігається, переконливо вказує на те, що генетична диференціація досліджених популяцій курей за сукупністю вивчених поліморфних локусів, визначається, у першу чергу, напрямом продуктивності птиці. Однак виникає питання про ступінь вираженості цього чинника. Як свідчить практика використання традиційних методів селекційно-племіної роботи, вітчизняні породи курей все ж таки поступаються за показниками продуктивності зарубіжним лініям. Багато в чому це відставання викликано недостатнім впровадженням методів маркер-асоційованої селекції (MAS) у практику вітчизняного птахівництва. Як доведено вище, класичні методи селекції, які засновані на фенотипі, найчастіше не дають змогу відбирати особин з бажаними генотипами та елімінувати особин з непродуктивними алелями за цілою низкою локусів. При цьому, те, що на певному етапі здавалося своєрідною екзотикою, вже становиться цілком рутинним

інструментом, використання якого й дало змогу досягти тих значень продуктивності птиці, які демонструють зарубіжні лінії (які, згідно результатів досліджень зарубіжних авторів, за низкою генів-кандидатів є мономорфними). З іншого боку, наявність вираженої генетичної мінливості у кожній із порід курей, які були вивчені, дає змогу застосовувати їх як основу для проведення спрямованої селекційної роботи за використання результатів молекулярно-генетичних досліджень (типуння особин за рядом локусів кількісних ознак), для отримання експериментальних ліній, які б характеризувались певним набором бажаних генотипів та їх поєднань, що, у свою чергу, призведе до максимально можливого розкриття продуктивного потенціалу різних порід курей вітчизняної селекції.

Матеріали досліджень розділу викладено у наукових публікаціях [439–466].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ЗВ'ЯЗКУ ПОЛІМОРФНИХ ЛОКУСІВ ІЗ ГОСПОДАРСЬКО-КОРИСНИМИ ОЗНАКАМИ КУРЕЙ РІЗНИХ ПОРІД ТА НАПРЯМІВ ПРОДУКТИВНОСТІ

Дослідження генетичної структури дослідних популяцій курей – необхідний перший крок у загальній стратегії маркер-асоційованій селекції. Проведення генетико-популяційних досліджень дає змогу оцінити алельне різноманіття за кожним із цільових локусів, виявити поліморфні та мономорфні варіанти різних генів. Також не менш важливим є визначення факту наявності/відсутності відхилень від стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, що, у свою чергу, дає змогу зробити висновок про наявність/відсутність дії відбору або інших чинників, що впливають на популяційну структуру. Наступний крок у цьому напрямку – вивчення зв'язку різних алельних варіантів цільових генів з господарсько-корисними ознаками курей різних порід та напрямів продуктивності. У цьому контексті ключове значення має факт достатньої кількості особин різних генотипів для проведення порівняльного аналізу. Для кожного із досліджених генів це питання суворо індивідуальне, тому більш детально на його вирішенні зупинимося у відповідному розділі.

У цьому розділі дисертаційної роботи приведений аналіз зв'язку алельних варіантів різних генів (поліморфні варіанти яких були докладно проаналізовані у попередньому розділі дисертаційної роботи) з показниками продуктивності курей порід бірківська барвиста, полтавська глиняста та род-айленд червоний. У кожному випадку проаналізуємо показники, що відображують напрям продуктивності птиці. Для породи бірківська барвиста (як породи яєчного напрямку продуктивності) – показники яєчної продуктивності; для порід полтавська глиняста та род-айленд червоний (як порід комбінованого напрямку продуктивності) – показники яєчної та м'ясної продуктивності.

6.1. Зв'язок генотипів поліморфних локусів з показниками продуктивності курей породи бірківська барвиста

Дослідження яєчної продуктивності курей породи бірківська барвиста проводили шляхом порівняння середніх значень кожного із генотипів за окремим локусом при використанні t-критерію і умови нормального розподілу, інших – за допомогою непараметричного U-критерія Манна-Уїтні.

У табл. 6.1 представлено результати щодо зв'язку генотипів за локусами пролактину, рецептору гормону росту та інсуліноподібного ростового фактору I з показниками яєчної продуктивності курей породи бірківська барвиста.

Таблиця 6.1

Показники яєчної продуктивності курей різних генотипів за локусами PRL, GHR та IGF-I (бірківська барвиста, лінія А)

Локус	Генотип	Показник			
		En ₁₂ (шт.)	En ₄₀ (шт.)	Ew ₃₀ (г)	Ew ₅₂ (г)
<i>PRL</i> 24 indel	II	62,6±1,20 ^a	196,8±3,95 ^a	53,5±0,65 ^a	58,4±0,54 ^a
	ID	63,8±2,13 ^a	202,6±6,65 ^a	52,8±0,66 ^a	58,2±1,18 ^a
	DD	54,0±3,29 ^b	189,4±13,20 ^a	52,4±0,89 ^a	59,4±1,77 ^a
<i>PRL</i> AluI	CC	61,9±1,23 ^a	197,6±3,80 ^a	53,5±0,65 ^a	58,3±0,52 ^a
	CT	63,8±2,13 ^a	202,6±6,65 ^a	52,8±0,66 ^a	58,2±1,18 ^a
	TT	63,4±4,12 ^a	180,00±19,65 ^a	51,8±1,45 ^a	59,4±2,39 ^a
<i>GHR</i> NspI	A0	63,3±1,51 ^a	194,9±5,82 ^a	53,2±0,69 ^a	57,7±0,69 ^a
	B0	62,0±1,33 ^a	198,3±4,07 ^a	53,3±0,64 ^a	58,7±0,63 ^a
<i>IGF-I</i> PstI	C ₁ C ₁	65,2±3,77 ^a	204,4±9,63 ^a	52,9±1,34 ^a	58,9±1,68 ^a
	C ₁ C ₂	61,0±2,49 ^a	203,9±5,66 ^a	54,2±1,57 ^a	58,6±0,99 ^a
	C ₂ C ₂	60,9±1,33 ^a	203,7±3,37 ^a	52,5±1,12 ^a	57,1±0,58 ^a
<i>IGF-I</i> HinfI	AA	62,1±4,14 ^a	206,3±12,21 ^a	47,9±0,92 ^a	57,6±1,81 ^a
	AC	61,6±1,51 ^a	201,9±4,62 ^a	51,5±0,89 ^b	57,2±0,69 ^a
	CC	64,2±1,22 ^a	206,5±3,35 ^a	51,7±0,61 ^b	58,4±0,74 ^a

Примітки: a, b – відмінності вірогідні у межах одного локусу; En₁₂ та En₄₀ – кількість яєць (12 та 40 тижнів несучості); Ew₃₀ та Ew₅₂ – маса яйця (30-й та 52-й тиждень життя).

Як результат проведених досліджень популяції курей породи бірківська барвіста за локусом пролактину за наявністю інсерції встановлено, що яєчна продуктивність за 12 тижнів у особин з генотипом II вірогідно вище, ніж у особин з генотипом DD ($62,6 \pm 1,20$ та $54,00 \pm 3,29$, $p < 0,01$), при цьому найбільшою продуктивністю характеризуються особини з гетерозиготним генотипом. До 40 тижнів продуктивного періоду ця тенденція зберігається, однак, внаслідок незначної кількості особин з генотипом DD відмінності не вірогідні (табл. 6.1).

Для мутації C-2402T у локусі пролактину відмінності за показниками продуктивності впродовж 12 тижнів практично відсутні, однак до 40 тижня стають досить вираженими. Як й у випадку з 24 Indel, найбільш продуктивні були особини з гетерозиготним генотипом, найменш – з генотипом TT.

За обома мутаціями у локусі пролактину різниць за показниками маси яйця на 30 та 52 тиждень життя не виявлено.

Результати щодо зв'язку алелів I та C з показниками яєчної продуктивності птиці підтверджують дані зарубіжних дослідників. Ймовірний механізм – зміна (зниження) рівня експресії гену пролактину за наявності мутацій (Indel, SNP) у промоторній ділянці. У птиці пролактин виконує функції одного із головних регуляторів несучості. Як результат багаточисленних досліджень доведено, що безпосередні ін'єкції пролактину призводять до прояву насиджування у птиці (у цьому випадку індичок) [297]. Феномен насиджування характеризується поступовим зниженням інтенсивності, а потім й повним припиненням несучості з переходом на насиджування яєць. Це явище тісно пов'язано з еволюційною необхідністю виживання птахів у природі, так як воно, за суттю, обмежує загальну кількість знесених яєць та, відповідно, попереджує порожню розтрату ресурсів організму. Однак за умов промислового птахівництва феномен насиджування відіграє негативну роль, призводячи до вираженого недоотримання продукції. Як свідчать результати досліджень, приріст за кількістю яєць досить істотний, що в умовах племінного птахівництва сприяє потенційному збільшенню отриманого прибутку.

На підставі отриманих даних, враховуючи широку розповсюдженість гаплотипу IC у дослідній популяції яєчних курей (розділ 5.2) у подальшому сформували експериментальні мікролінії курей породи бірківська барвиста лінії А з гаплотипами IC та DT, з метою порівняння їх продуктивних показників в умовах фермерського господарства. Докладно результати цих досліджень буде викладено у розділі 6.2.

В свою чергу, за локусом рецептору гормону росту проводили аналіз зв'язку алельних варіантів з показниками продуктивності курей тільки для NspI-поліморфізму в п'ятому інтроні. За HindIII-поліморфізмом у другому інтроні локус виявився мономорфним у дослідній популяції курей, що приводить до неможливості проведення аналізу. За NspI-поліморфізмом у п'ятому інтроні локусу рецептору гормону росту вірогідних відмінностей між особинами з різними генотипами за показниками яєчної продуктивності не виявлено. Наявність мономорфних локусів за обраними поліморфізмами додатково вказує на необхідність проведення генетико-популяційних досліджень, як основи, для подальшого використання маркер-асоційованої селекції.

За локусом інсуліноподібного ростового фактору I за PstI-поліморфізмом в 5'UTR ділянці вірогідних розбіжностей за показниками продуктивності курей різних генотипів не виявлено. У той же час за HinfI-поліморфізмом у промоторній ділянці з'ясовано вірогідні відмінності за показниками маси яйця на 30 тиждень життя між особинами з генотипами AA та CC (табл. 6.1).

Поряд із вищеназваними локусами, проаналізували зв'язок різних SNP в різних ділянках гену гормону росту.

У табл. 6.2 представлено зв'язок генотипів за локусом гормону росту з показниками яєчної продуктивності курей породи бірківська барвиста.

Щодо MspI-поліморфізму в першому інтроні *GH* вірогідних відмінностей між показниками несучості за 12 та 40 тижнів продуктивного періоду не виявлено, однак встановлено, що яєчна продуктивність за 40 тижнів особин з

генотипом ВС мінімальна порівняно з особинами інших генотипів ($169,5 \pm 15,22$).

Таблиця 6.2

Показники яєчної продуктивності курей різних генотипів за локусом гормону росту (бірківська барвиста, лінія А)

Локус	Генотип	Показник			
		En ₁₂ (шт.)	En ₄₀ (шт.)	Еw ₃₀ (г)	Еw ₅₂ (г)
GH 1 інтрон, MspI	AA	63,4±1,48 ^a	200,0±4,94 ^a	53,4±0,73 ^a	58,6±0,81 ^a
	BB	57,0±5,1 ^a	201,2±12,12 ^a	50,2±3,24 ^a	57,1±1,15 ^a
	AB	60,5±1,78 ^a	198,6±4,63 ^a	53,3±0,69 ^a	58,5±0,79 ^a
	AC	67,3±2,84 ^a	200,5±17,69 ^a	55,6±1,76 ^a	56,9±2,56 ^a
	BC	63,3±4,73 ^a	169,5±15,22 ^a	49,9±3,05 ^a	59,5±1,67 ^a
GH 4 інтрон, MspI	AA	63,3±1,27 ^a	198,4±4,39 ^a	53,9±0,56 ^a	58,9±0,69 ^a
	CC	67,3±9,23 ^a	218,0±7,07 ^a	49,4±3,29 ^a	55,5±2,19 ^a
	AB	56,3±3,16 ^a	190,1±8,44 ^a	51,7±2,08 ^a	58,9±1,08 ^a
	AC	63,9±2,03 ^a	202,7±6,72 ^a	52,7±0,99 ^a	57,1±0,89 ^a
	BC	64,5±10,61 ^a	215,0±15,56 ^a	55,1±5,09 ^a	59,6±2,97 ^a
GH 4 інтрон, SacI	AA	63,6±1,53 ^a	198,7±6,77 ^a	54,6±0,87 ^a	59,1±1,03 ^a
	AB	61,7±1,56 ^a	202,7±6,53 ^a	53,3±0,66 ^a	58,6±0,65 ^a
	BB	62,9±2,19 ^a	195,3±4,56 ^a	50,9±1,09 ^b	56,7±0,83 ^a
GH AluI	CT	60,8±2,44 ^a	202,3±7,09 ^a	51,8±2,25 ^a	58,0±1,06 ^a
	TT	63,1±1,08 ^a	204,8±3,03 ^a	52,6±0,76 ^a	57,5±0,55 ^a

Значення цього показника в особин інших проаналізованих генотипів вірогідно не різняться та становлять близько 200 штук яєць. Як було зазначено у дослідженнях зарубіжних колег, алель С, як правило, відсутній у лініях комерційних курей, та виявлений тільки у локальних популяціях (аборигені породи Китаю та Ірану). У окремих випадках мова йде про його контрпродуктивні властивості. На жаль, кількість особин, гомозиготних за

алелем С, у дослідній популяції яєчних курей недостатня ($n=2$) для проведення статистичного аналізу оцінки продуктивних якостей цих особин.

За *MspI*-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту за 12 тижнів продуктивності вірогідних відмінностей за несучістю не виявлено, однак має місце виражена тенденція до збільшення значень цього показника в особин з генотипом СС, та до зменшення – АВ. Виявлена тенденція зберігається й до 40-го тижня продуктивного використання.

У свою чергу за *SacI*-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту з'ясовано, що несучість особин з різними генотипами за 12 тижнів практично не різниться. До 40-го тижня найбільшу кількість яєць отримано від гетерозиготних особин. Слід відзначити, що на відміну від усіх інших вивчених поліморфних локусів, за *GH4-SacI* встановлено вірогідну різницю у значеннях маси яєць на 30 тиждень життя у особин з різними генотипами. Так, для особин з генотипами АА та АВ характерно вірогідно більше значення маси яєць порівняно з генотипом ВВ.

Із усіх досліджених мутацій у локусі гормону росту тільки за *SacI*-поліморфізмом у наявності особини усіх можливих генотипів у кількості, достатній для статистичного аналізу.

У випадку з *AluI*-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту порівнювали значення показників яєчної продуктивності особин з генотипами СТ та ТТ, що, ймовірно, відбилося на картині, яку спостерігали. Вірогідних відмінностей за кожним із досліджених показників не виявлено. Гомозиготні за алелем С особини демонструють деяку перевагу перед гетерозиготами, однак, різниця знаходиться у межах статистичної похибки.

За винятком *SacI*-поліморфізму в четвертому інтроні *GH*, відмін у значеннях показників маси яєць на 30 та 52 тижні життя між особинами з різними генотипами за визначеними алельними варіантами певних локусів не виявлено.

У таблиці 6.3 представлено дані щодо зв'язку генотипів за локусами гіпофізарного фактору транскрипції-1, родини трансформуючих ростових

факторів β та Mx гену з показниками яєчної продуктивності курей дослідної популяції.

Таблиця 6.3

Показники яєчної продуктивності курей різних генотипів за локусами PIT1, родини TGF- β та Mx гену (бірківська барвиста, лінія А)

Локус	Генотип	Показник			
		En ₁₂ (шт.)	En ₄₀ (шт.)	Ew ₃₀ (г)	Ew ₅₂ (г)
PIT1	II	60,8±2,33 ^a	203,4±6,71 ^a	51,2±1,38 ^a	57,9±1,19 ^a
	ID	64,4±1,43 ^a	210,7±3,79 ^a	51,1±0,83 ^a	58,2±0,77 ^a
	DD	62,2±1,51 ^a	205,2±4,21 ^a	51,8±0,67 ^a	57,1±0,76 ^a
TGF- β 1	BB	62,5±1,42 ^a	200,4±4,09 ^a	52,9±1,40 ^a	57,4±0,85 ^a
	BF	61,9±1,59 ^a	205,5±4,19 ^a	51,6±0,66 ^a	57,6±0,71 ^a
	FF	66,1±1,89 ^a	216,4±5,14 ^b	52,4±1,66 ^a	58,4±1,04 ^a
TGF- β 2	BB	62,0±1,61 ^a	202,4±4,26 ^a	51,1±0,66 ^a	58,1±0,75 ^a
	BL	63,5±1,40 ^a	208,3±4,10 ^a	51,6±0,81 ^a	57,5±0,67 ^a
	LL	62,4±2,22 ^a	201,3±5,42 ^a	52,9±1,77 ^a	56,9±1,71 ^a
TGF- β 3	BB	62,7±2,56 ^a	187,7±9,25 ^a	50,5±2,13 ^a	57,2±2,32 ^a
	BL	60,7±1,85 ^a	206,9±3,89 ^a	51,6±1,14 ^a	57,5±0,81 ^a
	LL	64,0±1,17 ^a	208,3±3,48 ^b	51,5±0,59 ^a	57,9±0,64 ^a
Mx	AA	63,2±2,12 ^a	195,0±5,73 ^a	53,1±1,88 ^a	56,9±1,65 ^a
	AG	62,4±1,50 ^a	201,6±3,85 ^a	53,7±1,22 ^a	58,1±0,58 ^a
	GG	62,1±1,81 ^a	215,6±2,52 ^b	52,9±1,39 ^a	57,5±0,92 ^a

За локусом гіпофізарного фактору транскрипції-1 вірогідних відмінностей між показниками продуктивності особин різних генотипів не виявлено. Дещо більші значення за всіма показниками демонструють гетерозиготні особини, однак, як вже було зазначено, у межах значень статистичної помилки.

У той же час за локусом трансформуючого ростового фактору $\beta 1$ виявлено вірогідні відмінності за показниками кількості яєць за 40 тижнів продуктивного періоду. Так, для особин з генотипом FF є характерним більше значення $E_{n_{40}}$ порівняно з особинами з генотипом BB ($216,4 \pm 5,14$ та $200,4 \pm 4,09$). Гетерозиготні особини займають проміжне положення.

За $TGF-\beta 2$ вірогідних відмінностей за кількістю яєць від особин з різними генотипами не встановлено. Гетерозиготні особини характеризуються дещо більшими значеннями $E_{n_{12}}$ та $E_{n_{40}}$.

За локусом трансформуючого ростового фактору $\beta 3$ з'ясовано, що особини з генотипом LL характеризуються вірогідно більшим значенням кількості яєць за 40 тижнів продуктивного періоду порівняно з особинами з генотипом BB ($208,3 \pm 3,48$ та $187,7 \pm 9,25$ відповідно).

За всіма поліморфними локусами генної родини трансформуючих ростових факторів β , що були вивчені, відмінностей у значеннях маси яйця на 30 та 52 тижень життя не виявлено.

У випадку поліморфізму гену Mx як результат проведених досліджень з'ясовано, що у лінії яєчних курей за 12 тижнів продуктивного періоду істотні відмінності між особинами різних генотипів відсутні. Однак за 40 тижнів продуктивності такі вірогідні відмінності мали місце. Так, для особин з генотипом GG характерно більше значення кількості знесених яєць, ніж для особин з генотипами AA та AG. У той же час відмінності за масою яйця між особинами різних генотипів не виражені. При розгляді результатів досліджень за поліморфізмом гену Mx слід акцентувати увагу на той факт, що алель A, у цьому випадку, визначає наявність аспарагіну в положенні 631 білкової молекули, тобто є резистентним (відносно вірусних захворювань), тоді як алель G – чутливим. Однак, як видно з результатів досліджень, продуктивність особин, гомозиготних за алелем G, істотно й вірогідно вище, ніж особин, гомозиготних за алелем A (різниця досягає двох десятків яєць). Таким чином, можна зробити припущення про те, що селекційна робота, що проводиться з птицею у напрямку збільшення яєчної продуктивності, й призвела до вираженої

переваги частоти продуктивного/чутливого алелю G, над резистентним (менш продуктивним) алелем A (0,625 проти 0,375) у дослідній популяції. Слід відмітити, що аналогічний факт знайшов своє відображення й у випадку з птицею комбінованого напрямку продуктивності (розділ 6.3 і 6.5).

Як свідчать результати досліджень, щодо показника кількості яєць, найбільш вираженим ефектом характеризувалися алелі локусу пролактину – інсерція та SNP у промоторній ділянці гену; гену гормону росту – MspI-поліморфізм у першому та четвертому інтронах гену; родини трансформуючих ростових факторів β – MboII-поліморфізм екзону ділянки *TGF- β 1* та BslI-поліморфізм четвертого інтрону *TGF- β 3*; Mx гену – RsaI-поліморфізм 13 екзону. Дані щодо переважних значень превалювання різних генотипів за показниками кількості яєць за 12 та 40 тижнів продуктивного періоду приведено у таблиці 6.4.

Таблиця 6.4

Відмінності у показниках яєчної продуктивності курей дослідної популяції залежно від генотипу за поліморфними локусами

Показник	Найбільш виражені за значеннями показників генотипи						
	<i>PRL</i> 24 Indel	<i>PRL</i> AluI	<i>GH</i> 1 інтрон	<i>GH</i> 4 інтрон	<i>TGF-β1</i>	<i>TGF-β3</i>	<i>Mx</i>
En ₁₂ (шт.)	II>DD на 13,7%	-	-	-	-	-	-
En ₄₀ (шт.)	ID>DD на 6,5%	CT>TT на 11,2%	BB>BC на 15,8%	CC>AB на 12,8%	FF>BB на 7,4%	LL>BB на 9,9%	GG>AA на 9,5%

У таблиці приведено дані за найбільш контрастними значеннями показників різних генотипів у межах кожного із локусів. Аналізуючи картину,

що спостерігається, можна зробити висновок про перспективу використання результатів досліджень у першу чергу елімінації, вилучення особин з найменш продуктивними генотипами за сукупністю поліморфних локусів. За результатами досліджень у більшості випадків, що були досліджені, показники продуктивності гетерозиготних особин займають проміжне положення між показниками гомозигот, що додатково вказує на проміжний характер успадковування ознак.

Лише за локусом пролактину у розрізі кожної з мутацій (Indel та SNP) спостерігалася перевага показників ячної продуктивності у гетерозиготних особин. У окремих випадках (за окремими локусами) особливості генетичної структури дослідної популяції курей накладали певний відбиток на результати досліджень, що виражалося у недостатній кількості особин визначених генотипів для проведення статистичної обробки (що, перш за все, призводило до збільшення похибки середнього значення).

У свою чергу, у випадку з показниками маси яйця (E_{w30}) вірогідні відмінності виявлено між особинами різних генотипів за генами інсуліноподібного ростового фактору-I – HinfI-поліморфізм у промоторній ділянці гену (CC > AA на 7,4 %) та гормону росту – SacI-поліморфізм у четвертому інтроні (AA > BB на 6,8 %).

Як слідує із результатів досліджень, серед усіх вивчених поліморфізмів (15), що були обрані для аналізу зв'язку різних алельних варіантів з продуктивними ознаками дослідної популяції курей, мутації в різних ділянках гену призводять до змін у прояві кількісних ознак. Було вивчено мутації в екзоній ділянці гену – *TGF- β 1* та Mx гену; в інтронах – *GH*, *TGF- β 3*, *IGF-I* (PstI), *PIT1*, *GHR*; у промоторних ділянках – *PRL*, *IGF-I*, *TGF- β 2*. Із усіх розглянутих варіантів мутації у екзонах в максимальній кількості (2 із 2) відобразились на показниках продуктивності курей. У той же час мутації в промоторній ділянці гену та в інтронах – у меншому ступені. Ймовірно, це корелює з тим фактом, що мутації в екзоній частині, за деяким винятком, відображуються у структурі білку, який кодується геном, що, у свою чергу,

може призводити до зміни його біологічної активності (фізіологічних функцій). Мутації в інтронах та промоторах можуть приводити, як правило, до зміни характеру експресії гену, або взагалі не викликають ефекту. З цим явищем пов'язано більш широке розповсюдження мутацій в інтронах порівняно з екзонами, що викликано більш низьким тиском добору, що, в свою чергу, відображається на генетичній структурі дослідних популяцій.

6.2 Виробнича перевірка продуктивних якостей двох експериментальних мікроліній курей породи бірківська барвіста

З урахуванням отриманих результатів, провели виробничу перевірку асоційованих зв'язків господарсько-корисних ознак з виявленими поліморфними локусами у популяції курей породи бірківська барвіста.

Для досягнення поставленої мети було отримано дві експериментальні мікролінії курей породи бірківська барвіста з різними генотипами за локусом пролактину. За результатами досліджень (моніторинг вихідної популяції на наявність відповідних мутацій) із загальної групи курей, яких утримали в умовах віварію лабораторії, було відібрано особин обох статей з гаплотипами ІС та ДТ. Гаплотип ІС відповідає наявності інсерції розміром 24 п.н. у промоторній ділянці (алель І) та наявності цитозину в положенні -2402 гену пролактину (алель С). У свою чергу гаплотип ДТ відповідає відсутності інсерції в промоторі та наявності тиміну в положенні -2402 гену пролактину. Далі провели серію схрещувань, за використання штучного осіменіння, з метою отримання нащадків з заданими гаплотипами. Племінне яйце, яке було отримано, маркували та інкубували. Як результат, були отримані нащадки (F_1) з гаплотипами ІС та ДТ. Для контролю ефективності проведення штучного осіменіння проводили генотипування покоління F_1 у кількості 10 голів із кожної групи, яких було відібрано випадково. Результати дослідження вказують на повну відповідність очікуваним комплексним генотипам у кожній групі.

Сформовані групи курей (групи ІС та ДТ відповідно) утримувались в умовах експериментальної ферми «Збереження державного генофонду птиці» Державної дослідної станції птахівництва Національної академії аграрних наук. Продуктивний період продовжувався з грудня 2014 року до червня 2015 року. Тип утримання птиці – клітковий груповий. Протягом всього періоду утримання оцінювали показники яєчної продуктивності кожної із груп. Результати досліджень приведено у табл. 6.5.

Таблиця 6.5

Показники яєчної продуктивності дослідних груп курей

Гапло-тип	Місяць							Весь період
	грудень	січень	лютий	березень	квітень	травень	червень	
Яєць на початкову несучку, шт.								
DT	3,73	20,62	18,19	20,24	18,29	17,95	15,62	109,59
IC	4,53	23,46	21,19	22,17	21,72	21,36	18,28	129,25
Яєць на середню несучку, шт.								
DT	3,73	20,62	18,19	20,24	18,29	17,95	15,62	114,27
IC	4,55	23,46	21,19	22,50	21,72	21,36	18,28	132,63
Інтенсивність несучості, %								
DT	12,02	66,51	64,97	65,28	60,95	57,91	52,06	53,90
IC	14,68	75,69	75,66	72,58	72,39	68,90	60,94	62,56

Поголівя на початок періоду склало по групах: ІС – 55 особин; ДТ – 22 особини. Збереженість птиці в групі ІС становила 96,4 %; у групі ДТ – 95,5 %; що неістотно різниться від середнього показника збереженості в загальному стаді курей цієї породи за той же період утримання за аналогічних умов (94,8 %).

Отже, результати досліджень підтверджують (на рівні утримання птиці в умовах виробництва) дані, що були отримані раніше, стосовно позитивного

зв'язку алелів І та С у локусі пролактину з показниками яєчної продуктивності курей породи бірківська барвиста.

Слід відзначити, що визначення у дослідній популяції курей «непродуктивних» алелів D та T можливо тільки з використанням молекулярно-генетичних методів досліджень. Методів класичної селекції, які обмежені оцінкою особин за фенотипом, у цьому випадку недостатньо, що підкреслює необхідність комплексного підходу до селекційної роботи з птицею.

Таким чином, як результат проведених досліджень, було визначено найбільш перспективні маркерні алелі, котрі пов'язані з проявом господарсько-корисних ознак яєчних курей породи бірківська барвиста, отримано експериментальні мікролінії, проведено їх апробацію в умовах фермерського утримання.

Результати досліджень можуть слугувати основою для проведення подальшої селекційної роботи з яєчною птицею української селекції в напрямі максимального розкриття її продуктивного потенціалу, за використання виявлених перспективних молекулярно-генетичних маркерів в локусі пролактину.

6.3 Зв'язок генотипів поліморфних локусів з показниками яєчної продуктивності курей породи полтавська глиняста

Враховуючи комбінований тип продуктивності курей породи полтавська глиняста, проводили вивчення зв'язку генотипів за різними локусами з показниками як яєчної, так і м'ясної продуктивності птиці.

У зв'язку з мономорфним характером локусу пролактину за наявності інсерції в промоторній ділянці гену (на відміну від інших дослідних популяцій курей) вивчення зв'язку його алельних варіантів з продуктивними ознаками курей породи полтавська глиняста не проводили у зв'язку з відсутністю поліморфізму в дослідному локусі.

У табл. 6.6 наведено результати досліджень з вивчення зв'язку генотипів за локусами пролактину, рецептору гормону росту та інсуліноподібного ростового фактору I з показниками яєчної продуктивності курей породи полтавська глиняста.

Таблиця 6.6

Показники яєчної продуктивності курей різних генотипів за локусами PRL, GHR та IGF-I (полтавська глиняста, лінія 14)

Локус	Генотип	Показник			
		En ₁₂ (шт.)	En ₄₀ (шт.)	Еw ₃₀ (г)	Еw ₅₂ (г)
<i>PRL</i> AluI	CC	75,4±2,33 ^a	201,5±8,43 ^a	54,8±1,44 ^a	58,6±1,86 ^a
	CT	67,0±1,34 ^b	192,3±3,09 ^a	50,9±0,54 ^b	57,5±0,60 ^a
	TT	67,9±1,21 ^b	188,3±3,45 ^a	52,3±0,65 ^{ab}	59,5±0,82 ^a
<i>GHR</i> NspI	A0	65,6±2,38 ^a	186,9±6,36 ^a	52,3±0,99 ^a	58,4±0,76 ^a
	B0	68,7±0,87 ^a	189,7±2,99 ^a	51,5±0,48 ^a	57,5±1,21 ^a
<i>GHR</i> HindIII	A0	67,1±1,60 ^a	201,6±4,81 ^a	49,9±0,99 ^a	56,2±0,94 ^a
	B0	68,4±1,29 ^a	198,7±6,06 ^a	52,6±0,79 ^b	59,2±0,96 ^b
<i>IGF-I</i> PstI	C ₁ C ₁	65,9±2,55 ^a	186,5±6,32 ^a	53,6±1,28 ^a	58,1±1,59 ^a
	C ₁ C ₂	68,1±1,31 ^a	190,2±5,05 ^a	50,9±0,64 ^a	58,3±0,79 ^a
	C ₂ C ₂	68,4±1,49 ^a	189,6±4,39 ^a	51,1±0,64 ^a	58,5±0,77 ^a
<i>IGF-I</i> HinfI	AC	67,5±1,64 ^a	199,1±4,63 ^a	50,1±0,86 ^a	58,1±0,95 ^a
	CC	68,2±1,43 ^a	212,9±3,71 ^b	52,8±1,03 ^a	58,6±1,27 ^a

За наявності однонуклеотидного поліморфізму в локусі *PRL* (C-2402T) встановлено, що яєчна продуктивність за 12 тижнів у особин генотипу CC перевищувала таку в курей генотипу TT та становила 75,4 ± 2,33 та 67,9 ± 1,21 відповідно (p < 0,01). За 40 тижнів продуктивного періоду яєчна продуктивність особин генотипу CC досягла 201,5 ± 8,43; TT – 188,3 ± 3,45 яєць; однак у цьому

випадку різниця невірогідна, що здебільшого пов'язано з незначною кількістю особин генотипу СС (11 голів з генотипом СС проти 36 з генотипом ТТ).

Дані про позитивний зв'язок генотипу СС з яєчною продуктивністю курей породи полтавська глиняста відповідають результатам, які отримані на породах курей зарубіжної селекції [302, 311].

Також за цим локусом відмічено відмінності за масою яйця на 30 тиждень життя – $54,8 \pm 1,44$ г у особин з генотипом СС проти $50,9 \pm 0,54$ г у особин з генотипом СТ ($p < 0,05$). На 52 тиждень життя вірогідних відмінностей за масою яйця у особин з різними генотипами не виявлено.

Стосовно поліморфізму рецептору гормону росту в дослідній популяції слід відзначити, що порода курей полтавська глиняста – єдина дослідна популяція із усіх вивчених, для якої виявлено HindIII-поліморфізм у другому інтроні гену *GHR*, що дало змогу провести аналіз зв'язку його алельних варіантів з показниками продуктивності птиці. За NspI-поліморфізмом у п'ятому інтроні *GHR* вірогідних відмінностей за показниками яєчної продуктивності у особин з різними генотипами не виявлено. У той же час за HindIII-поліморфізмом встановлено вірогідні відмінності за масою яйця на 30 та 52 тижні життя. Так, для особин з генотипом В0 характерні більші значення маси яйця в обох випадках, ніж для особин з генотипом А0. У свою чергу за кількістю яєць за 12 та 40 тижнів продуктивності вірогідних відмінностей не з'ясовано (табл. 6.6).

За локусом інсуліноподібного ростового фактору I за PstI-поліморфізмом у 5'UTR ділянці вірогідних різниць за показниками продуктивності курей різних генотипів не виявлено.

За HinfI-поліморфізмом у промоторній ділянці *IGF-I* порівнювали показники особин гомозиготних за алелем С та гетерозигот АС. Гомозиготних за алелем А особин не аналізували у зв'язку з їх недостатньою кількістю. За результатами досліджень встановлено, що за кількістю яєць за 40 тижнів продуктивного періоду гомозиготні особини суттєво переважають над

гетерозиготами (212,92 проти 199,06 відповідно). За значеннями маси яйця вірогідних відмінностей не було.

У табл. 6.7 приведено результати досліджень з вивчення зв'язку генотипів за локусом гормону росту з показниками яєчної продуктивності курей породи полтавська глиняста.

Таблиця 6.7

Показники яєчної продуктивності курей різних генотипів за локусом гормону росту (полтавська глиняста, лінія 14)

Локус	Генотип	Показник			
		En ₁₂ (шт.)	En ₄₀ (шт.)	Еw ₃₀ (г)	Еw ₅₂ (г)
<i>GH</i> 1 інтрон, MspI	AA	67,5±1,05 ^a	191,0±2,65 ^a	51,6±0,42 ^a	58,3±0,57 ^a
	AB	66,5±3,62 ^a	181,8±8,57 ^a	51,1±2,81 ^a	58,9±2,91 ^a
	AC	63,0±4,40 ^a	171,5±26,05 ^a	51,3±2,34 ^a	58,9±1,33 ^a
<i>GH</i> 4 інтрон, MspI	CC	67,5±0,82 ^a	200,3±2,42 ^a	51,5±0,43 ^a	58,3±0,59 ^a
	AC	69,8±1,56 ^a	199,4±6,68 ^a	51,7±1,33 ^a	58,4±1,17 ^a
	BC	63,8±2,51 ^a	189,8±4,99 ^a	54,5±2,90 ^a	61,7±2,37 ^a
<i>GH</i> SacI	AB	72,0±1,67 ^a	199,0±10,13 ^a	55,0±1,52 ^a	58,8±1,13 ^a
	BB	66,9±1,05 ^b	187,6±2,83 ^a	51,4±0,42 ^b	58,4±0,53 ^a
<i>GH</i> AluI	CT	67,8±2,68 ^a	191,5±3,04 ^a	56,1±6,15 ^a	59,7±2,01 ^a
	TT	68,0±1,08 ^a	201,6±4,53 ^a	51,2±0,63 ^a	58,0±0,79 ^a

За MspI-поліморфізмом у першому інтроні гену гормону росту значних відмінностей за показниками продуктивності між особинами різних генотипів не виявлено, що, ймовірно, пов'язано з відсутністю в популяції особин генотипів BB, CC та BC (порівнювали продуктивність особин гомозиготних за алелем А з гетерозиготами АВ та АС). У той же час відмічено більш високі

показники за кількістю яєць за 40 тижнів продуктивного періоду для особин з гомозиготним генотипом.

Також, як й у попередньому випадку, *MspI*-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту розглядали за трьома із шести можливих генотипів. Аналізували особин з генотипами *CC*, *AC* та *BC*. Істотних різниць за кількістю яєць, а також масою яйця не було, однак встановлено, що найменша кількість яєць як за 12, так і за 40 тижнів продуктивності птиці, відповідає гетерозиготним особинам *BC*.

У той же час показано вірогідні відмінності в яєчній продуктивності особин з різними генотипами за *SacI*-поліморфізмом четвертого інтрону *GH*. Так, гетерозиготні особини *AB* (*SacI*⁺/*SacI*⁻) характеризувалися більшою яєчною продуктивністю порівняно з особинами з генотипом *BB* (*SacI*⁻/*SacI*⁻) за 12 тижнів продуктивності. За 40 тижнів продуктивного періоду ця картина зберігалася, однак відмінності були не вірогідні. Тенденція превалювання показників гетерозиготних особин над гомозиготними була й у випадку з масою яєць на 30-ий тиждень життя.

При аналізі зв'язку алельних варіантів за *AluI*-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту з показниками продуктивності вірогідних відмінностей не виявлено. Однак, слід враховувати той факт, що генетична структура за цим поліморфізмом, як й у вищенаведеному випадку, призводить до певних обмежень, у зв'язку з чим, порівнювали між собою особин з генотипами *CT* та *TT*. При цьому кількість особин з генотипом *TT* була істотно вищою (що відобразилось на значеннях похибки середнього у випадку з *CT*). Вищі значення показника кількості яєць за 40 тижнів продуктивності демонструють гомозиготні особини порівняно з гетерозиготними (відмінності не вірогідні).

В табл. 6.8 представлено дані про зв'язок генотипів за локусами гіпофізарного фактору транскрипції 1, родини трансформуючих ростових факторів β та *Mx* гену з показниками яєчної продуктивності дослідної популяції курей.

За винятком Мх гену наявність у дослідній популяції особин усіх можливих за кожним з локусів генотипів дало змогу дослідити зв'язок кожного із генотипів з продуктивними ознаками курей.

Таблиця 6.8

Показники яєчної продуктивності курей різних генотипів за локусами PIT1, родини TGF- β та Мх гену (полтавська глиняста, лінія 14)

Локус	Генотип	Показник			
		En ₁₂ (шт.)	En ₄₀ (шт.)	Еw ₃₀ (г)	Еw ₅₂ (г)
PIT1	II	66,6±1,62 ^a	184,2±5,06 ^a	51,1±0,63 ^a	57,2±0,72 ^a
	ID	68,4±1,13 ^a	191,7±3,25 ^a	51,8±0,57 ^a	58,9±0,69 ^a
	DD	69,8±2,44 ^a	195,0±7,03 ^a	51,4±1,61 ^a	60,6±2,15 ^a
TGF- β 1	BB	67,0±2,91 ^a	173,7±8,13 ^a	49,1±1,32 ^a	56,8±2,68 ^a
	BF	66,5±1,84 ^a	190,2±4,32 ^{ab}	51,9±0,69 ^a	58,7±0,75 ^a
	FF	67,8±1,18 ^a	193,2±2,38 ^b	51,9±0,56 ^a	58,6±0,68 ^a
TGF- β 2	BB	66,9±0,91	194,9±2,72 ^a	52,1±0,50 ^a	58,9±0,61 ^a
	BL	69,1±1,06	208,1±4,12 ^b	50,6±0,79 ^a	57,5±0,99 ^a
	LL	70,9±2,45	205,4±3,37 ^b	53,2±1,78 ^a	56,9±0,99 ^a
TGF- β 3	BB	69,9±1,14 ^a	207,3±2,98 ^a	50,7±0,69 ^a	57,1±0,79 ^a
	BL	66,5±0,97 ^b	199,3±2,98 ^{ab}	51,5±0,60 ^a	58,7±0,84 ^{ab}
	LL	67,2±1,36 ^{ab}	195,6±4,36 ^b	52,8±0,84 ^a	59,6±0,84 ^b
Мх	AG	66,0±2,89 ^a	206,0±8,52 ^a	52,4±1,51 ^a	57,9±1,13 ^a
	GG	68,2±1,11 ^a	199,7±3,76 ^a	51,1±0,74 ^a	58,3±0,94 ^a

Як результат досліджень відмічено, що за локусом PIT-1 яєчна продуктивність особин з генотипом DD перевищує таку в особин з генотипом II як за 12, так і за 40 тижнів продуктивності. При цьому, не дивлячись на достатньо виражену різницю (195,0±7,03 шт. та 184,2±5,06 шт.) у значеннях показника En₄₀, у цьому випадку відмінності не вірогідні, що здебільшого

пов'язано з незначною кількістю особин з генотипом DD. Значення показників продуктивності для гетерозиготних особин займають проміжне положення між гомозиготними.

За поліморфізмом генів родини трансформуючих ростових факторів β показано зв'язок кожного із вивчених поліморфних генів з показниками продуктивності. Так, за локусом $TGF-\beta 1$ вірогідними є відмінності за кількістю яєць за 40 тижнів продуктивного періоду. Для особин з генотипом FF характерно істотно більше значення цього показнику, ніж для особин з генотипом BB ($193,2 \pm 2,38$ та $173,7 \pm 8,13$ відповідно). Гетерозиготні особини займають проміжне положення.

У свою чергу за локусом $TGF-\beta 2$ також виявлено вірогідні відмінності за кількістю яєць за 40 тижнів продуктивності. Особини з генотипом LL превалюють над особинами з генотипом BB, причому найбільша продуктивність характерна для гетерозигот BL.

Для обох вивчених локусів ($TGF-\beta 1$ та $TGF-\beta 2$) за показниками маси яєць на 30 та 52 тижні життя виражені відмінності за кожним із локусів відсутні.

За алельними варіантами $TGF-\beta 3$ встановлено вірогідні різниці за кількістю яєць як за 12, так і за 40 тижнів продуктивного періоду. В обох випадках вищі показники продуктивності характерні для особин з генотипом BB. Також для цього локусу з'ясовано вірогідні відміни за масою яйця за 52 тижні життя. Особини з генотипом LL демонструють більші значення маси яйця порівняно з особинами з генотипом BB. Гетерозиготи займають проміжне положення.

При аналізі поліморфізму гену Mx порівняння проводили не між показниками протилежних гомозиготних особин (AA проти GG), а між гомозиготами GG та гетерозиготами AG. Беручи до уваги вірогідність домінантного типу успадкування, у цьому випадку можна припустити, що значення показників особин з генотипами AA та GG будуть значно відрізнятися. Однак, як свідчать результати наших попередніх досліджень, кількість гомозиготних за алелем A особин у дослідних популяціях курей

комбінованого напрямку продуктивності незначна. Тому, враховуючи рівноважний генетичний стан популяції, без проведення спрямованої селекційної роботи, внесок особин з генотипом AA у загальну продуктивність по стаду курей є мінімальним.

За результатами досліджень не виявлено вірогідних відмінностей між показниками, що були вивчені, у особин різних генотипів. У той же час відмічено тенденцію до більшої кількості яєць за 40 тижнів продуктивності для гетерозиготних особин AG порівняно з гомозиготами GG, що, враховуючи специфіку кожного із алелів (яка описана у відповідному розділі), цілком вписується у загальну картину.

За результатами проведених досліджень найбільш виражений ефект на показники кількості яєць за 12 та 40 тижнів продуктивності надавали алелі локусів пролактину (SNP у положенні -2402, C-2402T); інсуліноподібного ростового фактору I (HinfI-поліморфізм у промоторній ділянці гену); гормону росту (SacI-поліморфізм у четвертому інтроні); а також усіх досліджених складових генної родини трансформуючих ростових факторів β (*TGF- β 1*, *TGF- β 2* та *TGF- β 3*). У свою чергу з показниками маси яйця за 30 та 52 тижні життя виявились пов'язані алелі локусів пролактину (C-2402T); рецептору гормону росту (HindIII-поліморфізм у другому інтроні); гормону росту (SacI-поліморфізм у четвертому інтроні); трансформуючого ростового фактору β 3.

У переважній більшості випадків показники гетерозиготних, за кожним із досліджених поліморфних локусів, особин мали проміжне значення між показниками протилежних гомозигот. Виражене виключення характерне для гену гормону росту (SacI-поліморфізм у четвертому інтроні) за ознаками, які викладено вище.

Дані щодо переваги за значеннями кожного із вищеперерахованих генотипів представлені в табл. 6.9.

У таблиці наведено дані стосовно найбільш контрастних значень показників різних генотипів у межах кожного із локусів (вказано лише вірогідні відмінності).

Відмінності у показниках яєчної продуктивності курей дослідної популяції залежно від генотипу за поліморфними локусами

Показник	Найбільш значущі генотипи						
	<i>PRL</i> AluI	<i>GHR</i> HindIII	<i>IGF-I</i> HinfI	<i>GH</i> SacI	<i>TGF-β1</i>	<i>TGF-β2</i>	<i>TGF-β3</i>
En ₁₂ (шт.)	CC>TT на 9,9%	-	-	AB>BB на 7,1%	-	-	BB>LL на 4,9%
En ₄₀ (шт.)	CC>TT на 6,6%	-	CC>AC на 6,5 %	-	FF>BB на 10,1%	LL>BB на 5,1%	BB>LL на 5,6%
Ew ₃₀ (г)	CC>CT на 7,1%	B0>A0 на 5,2%	-	AB>BB на 6,5%	-	-	-
Ew ₅₂ (г)	-	B0>A0 на 5,1%	-	-	-	-	LL>BB на 4,2%

Як і у випадку з яєчними курями породи бірківська барвіста, при аналізі популяції курей породи полтавська глиняста, мутації в самих різних ділянках цільових генів (екзони, інтрони, промоторні ділянки) надали виражений вплив на показники продуктивності птиці.

6.4 Зв'язок генотипів поліморфних локусів з показниками м'ясної продуктивності курей породи полтавська глиняста

Поряд з вивченням показників яєчної продуктивності провели також й аналіз зв'язку поліморфних локусів з показниками м'ясної продуктивності, що особливо актуально у випадку з яєчно-м'ясною (комбінований напрям) спрямованістю курей породи полтавська глиняста.

У табл. 6.10 представлено дані щодо зв'язку генотипів за локусами пролактину, рецептору гормону росту та інсуліноподібного ростового фактору I з показниками м'ясної продуктивності курей дослідної популяції.

Таблиця 6.10

Показники м'ясної продуктивності курей різних генотипів за локусами PRL, GHR та IGF-I (полтавська глиняста, лінія 14)

Генотип птиці	Показни				
	Жива маса, кг	Патрана тушка, кг	Грудні м'язи, г	Стегно, г	Гомілка, г
<i>PRL (C-2402T)</i>					
CC	2,30±0,093 ^a	1,43±0,068 ^a	117,1±4,92 ^a	84,8±6,49 ^a	66,5±2,97 ^a
CT	2,35±0,042 ^a	1,46±0,036 ^a	115,7±2,63 ^a	82,8±1,84 ^a	63,6±1,24 ^a
TT	2,43±0,058 ^a	1,53±0,046 ^a	120,1±3,22 ^a	85,9±2,49 ^a	65,1±1,88 ^a
<i>GHR (NspI, 5 інтрон)</i>					
A0	2,33±0,057 ^a	1,42±0,046 ^a	117,4±3,43 ^a	85,2±3,01 ^a	65,4±1,99 ^a
B0	2,39±0,041 ^a	1,51±0,034 ^a	117,1±2,33 ^a	83,7±1,84 ^a	63,9±1,22 ^a
<i>GHR (HindIII, 2 інтрон)</i>					
A0	2,28±0,087 ^a	1,43±0,071 ^a	110,4±5,29 ^a	78,3±3,89 ^a	62,4±2,44 ^a
B0	2,41±0,062 ^a	1,50±0,051 ^a	120,9±3,27 ^a	89,4±2,96 ^b	67,7±1,71 ^a
<i>IGF-I (PstI, 5'UTR)</i>					
C ₁ C ₁	2,44±0,095 ^a	1,55±0,067 ^a	115,7±4,87 ^a	88,9±4,74 ^a	65,5±2,69 ^a
C ₁ C ₂	2,36±0,048 ^a	1,48±0,040 ^a	119,6±3,05 ^a	83,7±2,19 ^a	64,6±1,64 ^a
C ₂ C ₂	2,36±0,042 ^a	1,46±0,042 ^a	116,2±2,77 ^a	82,8±2,13 ^a	63,9±1,44 ^a
<i>IGF-I (HinfI, промотор)</i>					
AC	2,26±0,052 ^a	1,38±0,042 ^a	113,4±4,43 ^a	80,6±3,78 ^a	62,7±2,03 ^a
CC	2,51±0,081 ^b	1,58±0,066 ^b	123,1±3,58 ^a	90,7±3,29 ^a	70,1±1,91 ^b

За локусом пролактину вірогідних відмінностей за показниками м'ясної продуктивності птиці дослідної популяції не виявлено. За живою масою та масою патраної тушки спостерігається деяка перевага у значеннях цих показників для особин з генотипом ТТ. Показники гетерозиготних особин займають проміжне положення.

За NspI-поліморфізмом у п'ятому інтроні гену рецептору гормону росту за всіма показниками, що були вивчені, вірогідних відмінностей між особинами різних генотипів не виявлено.

У свою чергу за HindIII-поліморфізмом у другому інтроні *GHR* визначено превалювання за значеннями показників м'ясної продуктивності особин з генотипом В0 над А0. За значенням показнику маси м'язів стегна відмінності вірогідні ($p < 0,05$).

Стосовно алельних варіантів локусу інсуліноподібного ростового фактору I, за PstI-поліморфізмом у 5'UTR ділянці гену спостерігалася деяка перевага гомозигот C_1C_1 за значеннями живої маси та маси тушки, однак відмінності знаходились у межах статистичної похибки. У той же час за HinfI-поліморфізмом у промоторі гену встановлено виразні різниці за значеннями показників особин з різними генотипами. Так, гомозиготні особини з генотипом СС істотно превалюють за усіма показниками м'ясної продуктивності, що були вивчені, над гетерозиготами АС. При цьому за значеннями показників живої маси, маси тушки та м'язів гомілки відмінності вірогідні ($p < 0,05$). Слід відзначити, що внаслідок обмежень генетичної структури дослідної популяції курей, порівнянь зі значеннями показників продуктивності особин генотипу АА не проводилося.

У табл. 6.11 приведено дані щодо зв'язку генотипів за локусом гормону росту з показниками м'ясної продуктивності курей дослідної популяції.

За MspI-поліморфізмом у першому інтроні гену гормону росту вірогідних відмінностей за всіма дослідженими показниками не виявлено, однак відмічено, що гетерозиготні особини дещо превалюють над гомозиготами АА, що особливо виражено у випадку з генотипом АС.

**Показники м'ясної продуктивності курей різних генотипів за
локусом гормону росту (полтавська глиняста, лінія 14)**

Генотип	Показник				
	Жива маса, кг	Патрана тушка, кг	Грудні м'язи, г	Стегно, г	Гомілка, г
<i>GH</i> (MspI, 1 інтрон)					
AA	2,36±0,034 ^a	1,47±0,028 ^a	115,9±2,12 ^a	83,2±1,71 ^a	63,3±1,06 ^a
AB	2,40±0,205 ^a	1,49±0,151 ^a	123,4±13,75 ^a	91,63±4,90 ^a	65,3±1,38 ^a
AC	2,43±0,101 ^a	1,53±0,078 ^a	122,7±4,59 ^a	86,9±4,09 ^a	68,9±3,18 ^a
<i>GH</i> (MspI, 4 інтрон)					
CC	2,34±0,035 ^a	1,46±0,030 ^a	114,6±2,18 ^a	82,4±1,69 ^a	62,7±1,04 ^a
AC	2,41±0,090 ^a	1,51±0,071 ^a	122,2±3,81 ^a	86,7±3,98 ^a	67,5±2,74 ^a
BC	2,64±0,244 ^a	1,72±0,187 ^a	133,0±12,59 ^a	97,6±8,99 ^a	76,4±7,16 ^a
<i>GH</i> (SacI, 4 інтрон)					
AB	2,58±0,135 ^a	1,61±0,118 ^a	131,0±5,32 ^a	95,9±4,52 ^a	73,3±3,58 ^a
BB	2,35±0,033 ^a	1,47±0,027 ^a	116,2±1,94 ^b	83,3±1,55 ^b	63,8±1,03 ^b
<i>GH</i> (AluI, 4 інтрон)					
CT	2,59±0,236 ^a	1,65±0,180 ^a	138,9±9,74 ^a	96,0±9,20 ^a	74,4±6,49 ^a
TT	2,35±0,049 ^a	1,46±0,041 ^a	115,1±2,69 ^b	84,7±2,52 ^a	65,3±1,36 ^a

В свою чергу за MspI-поліморфізмом у четвертому інтроні спостерігається аналогічна ситуація – перевага гетерозигот, найбільш виражена для генотипу BC. Однак, внаслідок незначної кількості особин цього генотипу, що призвело до збільшення похибки середнього, вірогідних відмінностей за показниками продуктивності не виявлено.

У випадку SacI-поліморфізму в четвертому інтроні гену гормону росту також встановлено перевагу гетерозиготних особин AB за показниками м'ясної продуктивності над гомозиготами BB (гомозигот AA не аналізували). За

значеннями абсолютної маси грудних м'язів, м'язів стегна та гомілки відмінності вірогідні ($p < 0,05$).

Подібна ситуація спостерігалась й при аналізі алельних варіантів по AluI-поліморфізму четвертого інтрону гену гормону росту. Превалювання гетерозигот СТ над гомозиготами ТТ спостерігалось за всіма дослідженими показниками м'ясної продуктивності. За значенням маси грудних м'язів відмінності вірогідні ($p < 0,05$).

В табл. 6.12 представлено результати досліджень зв'язку генотипів за локусами гіпофізарного фактору транскрипції 1, родини трансформуючих ростових факторів β та Mx гену з показниками м'ясної продуктивності курей дослідної популяції.

За матеріалами проведених досліджень з'ясовано, що за локусом гіпофізарного фактору транскрипції 1 є вірогідні відмінності між особинами генотипів DD та II за масою стегна та гомілки. Також відмічена тенденція щодо переваги особин генотипу DD за живою масою та масою патраної тушки. Показники продуктивності гетерозиготних особин займають, як правило, проміжне положення.

За локусом $TGF-\beta 1$ особини з генотипом FF характеризуються вірогідно більш високими значеннями за живою масою, масою патраної тушки, м'язів стегна, гомілки та м'язового шлунку порівняно з особинами генотипу BB. Продуктивність гетерозиготних особин займає або проміжне положення, що особливо виражено у випадку з масою патраної тушки, або схильється в бік значень більш продуктивного генотипу.

За $TGF-\beta 2$ вірогідних відмінностей між значеннями показниками м'ясної продуктивності не виявлено. Така ж сама картина спостерігається й у випадку з $TGF-\beta 3$ – відміни у значеннях показників продуктивності особин різних генотипів у межах статистичної похибки.

**Показники м'ясної продуктивності курей різних генотипів за
локусами PIT1, родини TGF- β та Mx гену (полтавська глиняста, лінія 14)**

Генотип	Показник				
	Жива маса, кг	Патрана тушка, кг	Грудні м'язи, г	Стегно, г	Гомілка, г
<i>PIT1 (57 Indel)</i>					
II	2,32±0,049 ^a	1,44±0,037 ^a	116,6±3,19 ^a	83,6±2,52 ^a	64,4±1,60 ^a
ID	2,40±0,044 ^a	1,50±0,037 ^a	117,9±2,44 ^a	83,3±1,97 ^a	63,5±1,33 ^a
DD	2,53±0,165 ^a	1,61±0,140 ^a	120,2±9,20 ^a	96,8±4,43 ^b	73,2±3,52 ^b
<i>TGF-β1 (MboII, екзон)</i>					
BB	2,21±0,070 ^a	1,37±0,065 ^a	112,7±5,17 ^a	77,9±3,46 ^a	59,1±1,89 ^a
BF	2,46±0,051 ^{ab}	1,44±0,041 ^b	116,2±2,99 ^a	82,3±2,46 ^{ab}	64,00±1,63 ^{ab}
FF	2,46±0,046 ^b	1,56±0,039 ^c	120,3±2,77 ^a	88,0±2,03 ^b	66,5±1,44 ^b
<i>TGF-β2 (RsaI, промотор)</i>					
BB	2,36±0,040 ^a	1,47±0,033 ^a	116,1±2,24 ^a	82,5±2,02 ^a	64,1±1,32 ^a
BL	2,42±0,063 ^a	1,53±0,046 ^a	118,9±3,89 ^a	86,3±2,32 ^a	65,3±1,72 ^a
LL	2,36±0,148 ^a	1,47±0,160 ^a	126,0±8,35 ^a	89,6±5,16 ^a	65,1±3,81 ^a
<i>TGF-β3 (BslI, 4 інтрон)</i>					
BB	2,34±0,057 ^a	1,47±0,047 ^a	113,9±3,72 ^a	84,5±2,79 ^a	62,3±1,61 ^a
BL	2,40±0,058 ^a	1,50±0,045 ^a	118,5±3,02 ^a	83,5±2,49 ^a	65,7±1,76 ^a
LL	2,38±0,052 ^a	1,49±0,046 ^a	120,5±2,98 ^a	84,9±2,59 ^a	64,5±1,79 ^a
<i>Mx (RsaI, 13 екзон)</i>					
AG	2,34±0,109 ^a	1,42±0,073 ^a	124,6±6,53 ^a	87,1±5,51 ^a	69,2±2,57 ^a
GG	2,37±0,061 ^a	1,49±0,051 ^a	116,1±3,39 ^a	85,0±2,99 ^a	65,2±1,76 ^a

За генотипами *Mx* гену також доведена відсутність вірогідних відмінностей за вивченими показниками. У значеннях маси серця та печінки вірогідних відмінностей за кожним із досліджених локусів не виявлено.

За результатами проведених досліджень найбільш виражений ефект на показники м'ясної продуктивності курей породи полтавська глиняста мали алелі генів рецептору гормону росту (*HindIII*-поліморфізм у 2 інтроні); інсуліноподібного ростового фактору I (*HinfI*-поліморфізм у промоторній ділянці); гормону росту (*SacI*- та *AluI*-поліморфізм у четвертому інтроні); гіпофізарного фактору транскрипції 1 та трансформуючого ростового фактору $\beta 1$. Дані щодо співвідношень значень кожного із зазначених генотипів представлені у табл. 6.13.

Таблиця 6.13

Відмінності у показниках м'ясної продуктивності курей дослідної популяції в залежності від генотипу за поліморфними локусами

Показник	Найбільш перспективні генотипи					
	<i>GHR</i> <i>HindIII</i>	<i>IGF-I</i> <i>HinfI</i>	<i>GH SacI</i> ,	<i>GH AluI</i> ,	<i>PIT1</i>	<i>TGF-β1</i>
Жива маса, кг	-	CC>AC на 10,0%	-	-	-	FF>BB на 10,2%
Патрана тушка, кг	-	CC>AC на 12,7%	-	-	-	FF>BB на 12,2%
Грудні м'язи, г	-	-	AB>BB на 12,3%	CT>TT на 17,1%	-	-
М'язи стегна, г	BO>AO на 12,4%	-	AB>BB на 13,1%	-	DD>II на 13,6%	FF>BB на 14,5%
М'язи гомілки, г	-	CC>AC на 10,6%	AB>BB на 13,0%	-	DD>II на 12,0%	FF>BB на 11,1 %
М'язовий шлунок, г	-	-	-	-	-	FF>BB на 8,5%

У матеріалах, що наведено у таблиці, було враховано лише вірогідні відмінності за показниками м'ясної продуктивності різних генотипів у межах кожного із локусів.

За винятком гену гормону росту (за обома поліморфізмами) за всіма вивченими локусами встановлено перевагу за показниками продуктивності гомозиготних особин. Більші значення показників продуктивності гетерозигот у випадку гену гормону росту можна пояснити відсутністю відповідних гомозиготних особин у кількості, що є достатньою для проведення порівняльного аналізу. Також слід зазначити про гемізіготний характер локусу рецептору гормону росту, що визначає відсутність гетерозиготних особин у самиць птиці.

6.5 Зв'язок генотипів поліморфних локусів з показниками яєчної продуктивності курей породи род-айленд червоний

Так як кури породи род-айленд червоний відносяться до комбінованого (яєчно-м'ясного) типу продуктивності, проводили аналіз зв'язку алельних варіантів цільових генів з показниками як яєчної, так і м'ясної продуктивності.

У табл. 6.14 представлено дані про зв'язок генотипів за локусами пролактину, рецептору гормону росту та інсуліноподібного ростового фактору I з показниками яєчної продуктивності курей дослідної популяції.

У породі род-айленд, на відміну від полтавських глинястих курей, за наявністю інсерції у промоторі якої локус пролактину поліморфний, була нагода проаналізувати зв'язок його алельних варіантів з показниками продуктивності. Однак, як і у деяких проаналізованих раніше випадках, особливості генетичної структури популяції за цим локусом призвели до неможливості порівняння продуктивних якостей особин з різними гомозиготними генотипами. Співставлення показників продуктивності птиці проводили між гомозиготами DD та гетерозиготами ID. Як результат проведених досліджень виявлено, що за кількістю яєць за 40 тижнів

продуктивного періоду гетерозиготні особини істотно превалюють над гомозиготами DD (відмінності вірогідні при $p < 0,05$). У свою чергу, для гомозиготних особин відмічені вірогідно більші значення маси яйця на 52 тиждень життя, порівняно з гетерозиготами ($62,4 \pm 0,61$ г та $59,2 \pm 1,21$ г відповідно).

Таблиця 6.14

Показники яєчної продуктивності курей різних генотипів за локусами PRL, GHR та IGF-I (род-айленд червоний, лінія 38)

Локус	Генотип	Показник			
		En ₁₂ (шт.)	En ₄₀ (шт.)	Ew ₃₀ (г)	Ew ₅₂ (г)
<i>PRL</i> 24 indel	ID	73,3±2,92 ^a	227,6±7,12 ^a	56,9±0,95 ^a	59,2±1,21 ^a
	DD	72,7±0,81 ^a	212,1±2,57 ^b	56,7±0,47 ^a	62,4±0,61 ^b
<i>PRL</i> AluI	CT	74,8±1,54 ^a	221,7±4,37 ^a	56,2±0,86 ^a	59,8±1,08 ^a
	TT	73,1±0,75 ^a	210,6±3,03 ^b	56,9±0,51 ^a	62,8±0,64 ^b
<i>GHR</i> NspI	A0	73,6±1,19 ^a	217,8±5,52 ^a	57,3±0,84 ^a	64,1±1,35 ^a
	B0	72,5±0,94 ^a	212,8±2,72 ^a	56,9±0,59 ^a	61,5±0,61 ^a
<i>IGF-I</i> PstI	C ₁ C ₁	66,9±2,94 ^a	197,9±8,07 ^a	57,2±1,57 ^a	61,6±1,36 ^a
	C ₁ C ₂	75,9±1,01 ^b	216,4±4,14 ^b	57,4±0,67 ^a	62,5±1,12 ^a
	C ₂ C ₂	73,3±0,92 ^{ab}	214,1±3,32 ^{ab}	57,3±1,01 ^a	62,2±0,84 ^a
<i>IGF-I</i> HinfI	AA	73,0±2,44 ^a	210,9±9,57 ^a	56,5±0,96 ^a	63,1±1,52 ^a
	AC	73,3±0,85 ^a	213,8±2,88 ^a	57,2±0,54 ^a	62,5±0,81 ^a
	CC	71,3±1,85 ^a	210,3±5,26 ^a	56,7±0,82 ^a	61,5±0,84 ^a

Схожа картина спостерігалась також і за наявністю однонуклеотидного поліморфізму у положенні -2402 гену пролактину. Як й у випадку з 24 Indel порівнювали між собою значення показників продуктивності гетерозигот CT та гомозигот TT. Як результат досліджень також доведено перевагу гетерозигот за показником кількості яєць за 40 тижнів продуктивності (відмінності вірогідні,

$p < 0,05$). Більш того, значення середньої маси яйця на 52 тиждень життя, також вірогідно більше у випадку з гомозиготами, порівняно з гетерозиготними особинами. Подібна картина взаємозалежності між двома мутаціями у локусі пролактину спостерігається, як результат переважного розповсюдження у дослідній популяції курей особин з гаплотипом DT (у популяції род-айленду червоного значення D' становило 0,86), що докладно описано у відповідному розділі дисертаційної роботи 5.2.

Локус рецептору гормону росту за HindIII-поліморфізмом у другому інтроні у дослідній популяції курей виявився мономорфним, відповідно аналіз зв'язку показників продуктивності курей різних генотипів не проводився.

За NspI-поліморфізмом у п'ятому інтроні гену рецептору гормону росту істотних відмінностей між особинами різних генотипів за дослідженими ознаками не встановлено.

У свою чергу, за PstI-поліморфізмом у 5'UTR гену інсуліноподібного ростового фактору I виявлено вірогідні відмінності між особинами різних генотипів за кількістю яєць за 12 та 40 тижнів продуктивності. В обох випадках найбільшу продуктивність продемонстрували гетерозиготні особини C_1C_2 , найменшу – гомозиготи C_1C_1 . При цьому відмінності за кількістю яєць за 40 тижнів між особинами з генотипами C_1C_2 та C_1C_1 були досить істотні та досягали двох десятків яєць. Значення цих показників (E_{n12} та E_{n40}) для гомозигот C_2C_2 були близькі до таких у гетерозигот, вірогідних різниць не встановлено. Суттєвих відмінностей за значеннями маси яйця на 30 та 52 тижні життя між особинами різних генотипів не з'ясовано.

За HinfI-поліморфізмом у промоторній ділянці гену інсуліноподібного ростового фактору I вірогідних відмін за вивченими показниками між особинами різних генотипів не виявлено.

У табл. 6.15 підсумовано результати досліджень зв'язку генотипів за локусом гормону росту з показниками яєчної продуктивності курей дослідної популяції.

На відміну від інших популяцій, які було вивчено, за MspI-поліморфізмом у першому інтроні гену гормону росту в лінії курей породи род-айленд червоний присутні особини з генотипом CC, причому у достатній для проведення статистичних досліджень кількості, що дало змогу провести вивчення їх продуктивності.

Таблиця 6.15

Показники яєчної продуктивності курей різних генотипів за локусом гормону росту (род-айленд червоний, лінія 38)

Локус	Генотип	Показник			
		En ₁₂ (шт.)	En ₄₀ (шт.)	Ew ₃₀ (г)	Ew ₅₂ (г)
<i>GH</i> 1 інтрон, MspI	AA	71,2±2,07 ^a	211,2±7,63 ^a	56,9±1,12 ^a	61,3±1,78 ^a
	CC	71,9±1,64 ^a	216,6±3,91 ^a	56,9±0,77 ^a	62,3±0,90 ^a
	AB	73,2±1,54 ^a	213,7±6,44 ^a	57,8±0,99 ^a	62,7±1,35 ^a
	AC	73,5±1,25 ^a	214,1±3,77 ^a	56,4±0,76 ^a	62,1±1,23 ^a
	BC	74,1±3,42 ^a	224,7±8,29 ^a	57,3±1,28 ^a	62,5±2,46 ^a
<i>GH</i> 4 інтрон, MspI	AA	75,2±2,49 ^a	220,2±9,17 ^a	54,9±0,83 ^a	61,3±1,63 ^a
	BB	73,9±2,49 ^a	211,6±9,56 ^a	57,1±1,51 ^a	61,8±0,92 ^a
	CC	71,9±2,31 ^a	208,6±7,93 ^a	55,8±1,63 ^a	61,0±1,96 ^a
	AB	74,1±1,41 ^a	215,0±5,35 ^a	58,8±1,33 ^a	63,3±1,39 ^a
	AC	73,1±1,10 ^a	212,2±3,92 ^a	57,0±0,82 ^a	62,5±1,05 ^a
	BC	74,0±1,83 ^a	211,9±6,50 ^a	56,6±0,95 ^a	62,2±1,78 ^a
<i>GH</i> SacI	AB	72,7±0,86 ^a	213,9±2,85 ^a	56,9±0,52 ^a	62,2±0,69 ^a
	BB	72,9±1,97 ^a	211,8±4,71 ^a	56,1±0,71 ^a	61,7±0,94 ^a
<i>GH</i> AluI	CC	73,9±2,49 ^a	211,6±9,56 ^a	57,1±1,51 ^a	61,8±0,92 ^a
	CT	73,3±1,25 ^a	215,4±3,96 ^a	57,2±0,62 ^a	62,7±1,04 ^a
	TT	72,1±1,11 ^a	212,5±3,19 ^a	56,3±0,65 ^a	62,1±0,78 ^a

За результатами досліджень не виявлено вірогідних відмінностей у значеннях показників кількості яєць та маси яйця між особинами різних генотипів. Водночас за кількістю яєць за 40 тижнів продуктивності найбільше значення демонструють особини з генотипом ВС, найменше – з генотипом АА, однак відмінності у значеннях між ними не вірогідні, що імовірно пов'язано з незначною кількістю особин цих генотипів (більшим значенням похибки середнього).

Щодо MspI-поліморфізму у четвертому інтроні гену гормону росту. На відміну від усіх досліджених популяцій у породі род-айленд червоний були наявні особини всіх можливих генотипів (шість із шести) у кількості, достатній для аналізу. При проведенні досліджень встановлено, що вірогідних різниць за кожним із вивчених показників продуктивності не виявлено. За сорок тижнів продуктивності найбільше значення кількості яєць відмічено для особин з генотипом АА ($220,2 \pm 9,17$ шт.), найменше – з генотипом СС ($208,6 \pm 7,93$ шт.), однак відмінності не вірогідні.

Як і з популяцією курей породи полтавська глиняста у дослідній популяції за SacI-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту аналізували особин двох генотипів – гетерозигот АВ та гомозигот ВВ. За всіма вивченими показниками продуктивності вірогідних відмінн між особинами з різними генотипами не з'ясовано.

У дослідній популяції курей, стосовно AluI-поліморфізму у четвертому інтроні гену гормону росту, порівняно з іншими дослідними породами (бірківська барвіста та полтавська глиняста) наявні особини всіх трьох можливих генотипів у кількості, достатній для проведення досліджень, що дає змогу порівняти продуктивність гомозиготних особин СС та ТТ. Однак, як свідчать результати досліджень, вірогідних різниць за показниками кількості яєць та маси яйця не виявлено.

У табл. 6.16 представлено матеріали щодо вивчення зв'язку генотипів за локусами гіпофізарного фактору транскрипції 1, родини трансформуючих

ростових факторів β та Mx гену з показниками яєчної продуктивності курей дослідної популяції.

Таблиця 6.16

Показники яєчної продуктивності курей різних генотипів за локусами $PIT1$, родини $TGF-\beta$ та Mx гену (род-айленд червоний, лінія 38)

Локус	Генотип	Показник			
		$E_{n_{12}}$ (шт.)	$E_{n_{40}}$ (шт.)	$E_{w_{30}}$ (г)	$E_{w_{52}}$ (г)
<i>PIT1</i>	II	73,9±0,96 ^a	215,4±3,48 ^a	56,6±0,55 ^a	61,5±0,87 ^a
	ID	72,4±1,23 ^a	209,8±3,93 ^a	57,0±0,81 ^a	62,9±0,84 ^a
	DD	70,1±2,99 ^a	214,4±8,71 ^a	56,7±0,97 ^a	61,3±1,49 ^a
<i>TGF-β1</i>	BF	72,1±1,04 ^a	209,1±5,09 ^a	55,9±0,78 ^a	62,3±1,26 ^a
	FF	73,0±1,03 ^a	214,2±3,05 ^a	57,3±0,46 ^a	62,2±0,59 ^a
<i>TGF-β2</i>	BB	72,8±1,27 ^a	210,3±4,08 ^{ab}	56,7±0,64 ^a	62,1±1,14 ^a
	BL	74,7±0,79 ^a	218,6±3,44 ^b	56,7±0,54 ^a	61,9±0,79 ^a
	LL	70,0±1,83 ^a	204,4±5,47 ^a	56,9±1,89 ^a	63,5±1,49 ^a
<i>TGF-β3</i>	BB	72,1±2,33 ^a	209,2±7,85 ^a	52,6±2,43 ^a	60,4±2,69 ^a
	BL	73,5±1,29 ^a	216,3±3,70 ^a	56,7±0,54 ^{ab}	61,7±0,72 ^a
	LL	71,8±1,01 ^a	211,7±3,52 ^a	57,7±0,59 ^b	62,9±1,01 ^a
<i>Mx</i>	AG	72,1±1,51 ^a	213,1±4,69 ^a	58,3±0,54 ^a	63,5±0,87 ^a
	GG	74,0±0,71 ^a	218,0±2,38 ^a	56,3±0,53 ^b	61,6±0,59 ^a

За наявності інсерції у другому інтроні гену гіпофізарного фактору транскрипції 1 вірогідних відмінностей між показниками продуктивності не виявлено.

За локусом $TGF-\beta 1$ порівнювали значення показників гетерозигот BF з гомозиготами FF. Вірогідних різниць не виявлено, однак для гомозигот з'ясовано більшу кількість яєць за 40 тижнів продуктивного періоду та дещо більше значення маси яйця на 30 тиждень життя.

У свою чергу для локусу TGF- β 2 встановлено вірогідні відмінності за показниками продуктивності особин різних генотипів. Так, за кількістю яєць за 40 тижнів продуктивного періоду найбільше значення характерно для особин з генотипом BL, найменше – з генотипом LL. В цілому за кількістю яєць найбільші значення продемонстрували гетерозиготні особини.

За локусом трансформуючого ростового фактору β 3 виявлено превалювання значень показнику кількості яєць (E_{n12} та E_{n40}) у гетерозиготних особин. Щодо маси яйця – для гомозигот LL значення середньої маси яйця на 30 тиждень життя вірогідно більше, ніж для гомозигот BB. За масою яйця гетерозиготні особини займають проміжне положення.

Також, як й у випадку з полтавськими курями, за поліморфізмом Mx гену аналізували дані за гетерозиготними особинами AG та гомозиготами GG. У цілому за кількістю яєць за 12 та 40 тижнів продуктивного періоду встановлено превалювання гомозигот за алелем G над гетерозиготами, що є загальним як для решти гомозигот (відмінності не вірогідні). У той же час за масою яйця на 30 тиждень життя з'ясовано вірогідні різниці. У цьому випадку гетерозиготні особини демонструють більші значення показника.

За результатами проведених досліджень, найбільш виражений ефект на показники кількості яєць за 12 та 40 тижнів продуктивності курей породи род-айленд червоний надали алелі пролактину (інсерція у 24 п.н. у промоторній ділянці, SNP у положенні -2402); інсуліноподібного ростового фактору I (PstI-поліморфізм у 5'UTR); трансформуючого ростового фактору β 2 та гену Mx (на рівні тенденції). У свою чергу з показниками маси яйця на 30 та 52 тижні життя виявились пов'язані алелі пролактину (інсерція у 24 п.н. у промоторній ділянці; SNP в положенні -2402); трансформуючого ростового фактору β 3 та гену Mx.

Дані щодо переваги за значеннями кожного із вищеперерахованих генотипів представлені в табл. 6.17.

У цій таблиці наведено дані стосовно найбільш контрастних значень показників різних генотипів у межах окремих локусів за кожним із досліджуваних показників.

Відмінності за показниками яєчної продуктивності курей дослідної популяції залежно від генотипу за поліморфними локусами

Показник	Переважаючі генотипи					
	<i>PRL</i> 24 Indel	<i>PRL</i> C-2402T	<i>IGF-1</i> PstI	<i>TGF-β2</i>	<i>TGF-β3</i>	<i>Mx</i>
En ₁₂ (шт.)	-	-	C ₁ C ₂ >C ₁ C ₁ на 11,9%	-	-	-
En ₄₀ (шт.)	ID>DD на 6,8%	CT>TT на 5,1%	C ₁ C ₂ >C ₁ C ₁ на 8,5%	BL>LL на 6,5%	-	-
Ew ₃₀ (г)	-	-	-	-	LL>BB на 8,8%	AG>GG на 3,4%
Ew ₅₂ (г)	DD>ID на 5,1%	TT>CT на 4,8%	-	-	-	-

Порівняно з іншими вивченими породами курей (бірківська барвіста, полтавська глиняста) у дослідній популяції породи род-айленд частіше за все найбільшими значеннями вивчених показників продуктивності характеризувались гетерозиготні особини. Так, наприклад, із таблиці 5.17 слідує, що переважна більшість генотипів за різними локусами, що пов'язані з показниками продуктивності, відносяться саме до гетерозигот. При цьому слід вказати, що у випадку локусу пролактину та *Mx* гену, перевага гетерозиготних особин, ймовірно, може бути наслідком обмежень, які накладаються генетичною структурою дослідної популяції за відповідними локусами, так як продуктивність особин гомозиготних за полярним/протилежним алелем невідома (наслідок повної відсутності, або незначної кількості особин цих генотипів).

6.6 Зв'язок генотипів поліморфних локусів з показниками м'ясної продуктивності курей породи род-айленд червоний

Беручи до уваги комбінований тип напряму продуктивності курей породи род-айленд, поряд з показниками яєчної продуктивності, проводили й вивчення параметрів м'ясних якостей.

Щодо поліморфних варіантів пролактину, в обох випадках (24 Indel та C-2402T) вірогідних відмінностей за показниками м'ясної продуктивності між особинами різних генотипів не виявлено. Однак, у кожному випадку, встановлено деяке превалювання показників у гомозиготних особин DD та TT порівняно з гетерозиготами ID та CT. Водночас, слід враховувати факт відсутності гомозигот II та CC для порівняння.

За NspI-поліморфізмом у п'ятому інтроні гену рецептору гормону росту вставлено, що вивчені показники м'ясної продуктивності дещо вищі у особин з генотипом A0. Однак, відмінності, що спостерігались, не вірогідні.

За поліморфізмом інсуліноподібного ростового фактору I, показники м'ясної продуктивності особин різних генотипів як за PstI-, так й за HinfI-поліморфізмом вірогідно не різняться. Єдиний виняток – маса печінки. Так, для особин з генотипом CC (HinfI, промотор) характерно вірогідно більше ($p < 0,05$) значення маси печінки – $30,7 \pm 1,53$ г відносно особин генотипу AA – $26,8 \pm 1,07$ г. Гетерозиготні особини AC займають проміжне положення – $28,5 \pm 0,83$ г.

Зв'язок генотипів за локусами пролактину, рецептору гормону росту та інсуліноподібного ростового фактору I з показниками м'ясної продуктивності курей дослідної популяції приведено в табл. 6.18.

За значенням маси серця вірогідних відмінностей між особинами різних генотипів за всіма дослідженими локусами не виявлено.

**Показники м'ясної продуктивності курей різних генотипів за
локусами PRL, GHR та IGF-I (род-айленд червоний, лінія 38)**

Генотип	Показник				
	Жива маса, кг	Патрана тушка, кг	Грудні м'язи, г	Стегно, г	Гомілка, г
<i>PRL 24 Indel</i>					
ID	1,74±0,044 ^a	1,27±0,034 ^a	94,4±2,82 ^a	63,7±2,19 ^a	54,7±2,06 ^a
DD	1,80±0,027 ^a	1,30±0,016 ^a	95,4±1,79 ^a	65,4±1,05 ^a	55,8±0,80 ^a
<i>PRL (C-2402T)</i>					
CT	1,74±0,051 ^a	1,27±0,023 ^a	93,4±2,35 ^a	64,2±1,41 ^a	54,3±1,40 ^a
TT	1,81±0,029 ^a	1,30±0,019 ^a	95,9±2,07 ^a	65,9±1,23 ^a	56,1±0,89 ^a
<i>GHR (NspI, 5 інтрон)</i>					
A0	1,87±0,070 ^a	1,35±0,049 ^a	98,3±4,29 ^a	66,0±2,69 ^a	56,0±2,03 ^a
B0	1,77±0,026 ^a	1,28±0,015 ^a	94,6±1,75 ^a	65,1±1,02 ^a	55,6±0,79 ^a
<i>IGF-I (PstI, 5'UTR)</i>					
C ₁ C ₁	1,82±0,061 ^a	1,30±0,033 ^a	95,9±3,77 ^a	66,5±2,21 ^a	56,3±1,69 ^a
C ₁ C ₂	1,78±0,048 ^a	1,30±0,027 ^a	98,3±2,56 ^a	67,6±1,74 ^a	56,2±1,24 ^a
C ₂ C ₂	1,81±0,040 ^a	1,30±0,026 ^a	95,1±2,72 ^a	63,9±1,50 ^a	55,6±1,28 ^a
<i>IGF-I (HinfI, промотор)</i>					
AA	1,82±0,068 ^a	1,32±0,054 ^a	94,1±5,29 ^a	66,5±3,28 ^a	57,9±2,26 ^a
AC	1,76±0,030 ^a	1,28±0,019 ^a	96,5±2,07 ^a	65,2±1,13 ^a	55,4±0,98 ^a
CC	1,84±0,051 ^a	1,30±0,027 ^a	93,8±3,02 ^a	64,7±1,92 ^a	55,0±1,34 ^a

У таблиці 6.19 представлено дані про зв'язок генотипів за локусом гормону росту з показниками м'ясної продуктивності курей дослідної популяції.

**Показники м'ясної продуктивності курей різних генотипів за
локусом гормону росту (род-айленд червоний, лінія 38)**

Генотип	Показник				
	Жива маса, кг	Патрана тушка, кг	Грудні м'язи, г	Стегно, г	Гомілка, г
<i>GH (MspI, 1 інтрон)</i>					
AA	1,87±0,077 ^a	1,39±0,057 ^a	105,6±4,81 ^a	69,5±2,73 ^a	58,2±2,53 ^a
CC	1,76±0,046 ^a	1,25±0,027 ^b	91,8±3,13 ^b	63,9±1,86 ^a	54,2±1,08 ^a
AB	1,84±0,091 ^a	1,31±0,042 ^{ab}	99,1±4,15 ^{ab}	66,6±2,59 ^a	56,9±2,25 ^a
AC	1,77±0,038 ^a	1,28±0,023 ^{ab}	92,2±2,69 ^b	63,5±1,71 ^a	54,9±1,33 ^a
BC	1,77±0,053 ^a	1,31±0,034 ^{ab}	94,8±4,56 ^{ab}	66,2±2,75 ^a	56,4±2,49 ^a
<i>GH (MspI, 4 інтрон)</i>					
AA	1,77±0,110 ^a	1,27±0,050 ^{ab}	97,0±3,54 ^{abc}	67,3±3,47 ^a	52,9±1,87 ^a
BB	1,69±0,084 ^a	1,20±0,056 ^a	87,1±5,41 ^{ac}	62,7±3,08 ^a	53,8±2,53 ^a
CC	1,87±0,084 ^a	1,39±0,062 ^b	104,6±5,09 ^b	69,6±2,95 ^a	58,6±2,70 ^a
AB	1,78±0,042 ^a	1,29±0,026 ^{ab}	93,7±3,62 ^{abc}	64,9±2,05 ^a	55,9±1,38 ^a
AC	1,82±0,058 ^a	1,30±0,030 ^{ab}	99,5±3,26 ^{abc}	65,1±2,03 ^a	55,3±1,62 ^a
BC	1,77±0,049 ^a	1,28±0,027 ^{ab}	89,1±3,02 ^c	63,9±2,08 ^a	55,7±1,69 ^a
<i>GH (SacI, 4 інтрон)</i>					
AB	1,78±0,054 ^a	1,29±0,031 ^a	96,9±3,84 ^a	65,5±2,44 ^a	53,9±1,29 ^a
BB	1,80±0,028 ^a	1,30±0,018 ^a	95,1±1,83 ^a	65,3±1,06 ^a	56,1±0,89 ^a
<i>GH (AluI, 4 інтрон)</i>					
CC	1,69±0,084 ^a	1,20±0,056 ^a	87,1±5,41 ^a	62,7±3,08 ^a	53,8±2,53 ^a
CT	1,77±0,030 ^a	1,28±0,018 ^{ab}	91,4±2,31 ^{ab}	64,2±1,40 ^a	55,8±1,02 ^a
TT	1,83±0,041 ^a	1,33±0,025 ^b	100,6±2,32 ^b	66,7±1,46 ^a	56,2±1,19 ^a

При аналізі показників м'ясної продуктивності курей дослідної популяції за MspI-поліморфізмом у першому інтроні гену гормону росту більш високою продуктивністю відрізнялись особини з генотипом AA, найменшою – CC. Так,

для показнику маси тушки виявлено вірогідні відмінності між гомозиготними особинами АА та СС. Також за масою грудних м'язів показано вірогідні різниці між особинами генотипів АА та СС, а також АА та АС. За всіма іншими показниками статистично вірогідних відмін не виявлено. Результати досліджень вказують на алель С, як на «контрпродуктивний» щодо м'ясної продуктивності птиці, що відповідає даним про генетичну структуру комерційних ліній курей, що було розглянуто раніше у відповідному розділі [5.3].

За MspI-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту відмічені вірогідні різниці за масою тушки між особинами генотипів ВВ та СС. Також виявлено статистично суттєві зміни за значенням маси грудних м'язів. Так, для особин з генотипом СС це значення максимальне та становить $104,6 \pm 5,09$ г, у той час як для особин з генотипом ВВ – значення мінімальне серед усіх генотипів ($87,1 \pm 5,41$ г), що були вивчені. Серед усіх гетерозигот найменша продуктивність відмічена для особин генотипу ВС.

У випадку з SacI-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту статистично суттєвих відмінностей між особинами різних генотипів (АВ та ВВ) за всіма показниками, що були вивчені, не виявлено.

Стосовно AluI-поліморфізму в четвертому інтроні гену гормону росту – за всіма дослідженими показниками перевага була на боці особин, гомозиготних за алелем Т. Гетерозиготи займають проміжне положення. За значеннями маси патраної тушки та грудних м'язів виявлено вірогідні відмінності між гомозиготними особинами СС та ТТ. За іншими показниками м'ясної продуктивності вірогідних різниць не встановлено.

За всіма дослідженими поліморфізмами у локусі гормону росту за значеннями маси серця та печінки статистично вірогідних відмінностей в особин з різними генотипами не виявлено.

У табл. 6.20 представлено дані про зв'язок генотипів за локусами гіпофізарного фактору транскрипції 1, родини трансформуючих ростових

факторів β та Mx гену з показниками м'ясної продуктивності курей дослідної популяції.

Таблиця 6.20

Показники м'ясної продуктивності курей різних генотипів за локусами PIT1, родини TGF- β та Mx гену (род-айленд червоний, лінія 38)

Генотип	Показник				
	Жива маса, кг	Патрана тушка, кг	Грудні м'язи, г	Стегно, г	Гомілка, г
<i>PIT1 (57 Indel)</i>					
II	1,78±0,035 ^a	1,29±0,022 ^a	93,7±2,69 ^a	64,3±1,42 ^a	55,2±1,20 ^a
ID	1,79±0,039 ^a	1,28±0,022 ^a	96,2±2,34 ^a	65,2±1,44 ^a	55,5±1,02 ^a
DD	1,83±0,081 ^a	1,35±0,053 ^a	97,9±4,01 ^a	68,3±3,06 ^a	57,4±2,28 ^a
<i>TGF-β1 (MboII, екзон)</i>					
BF	1,84±0,050 ^a	1,32±0,033 ^a	97,8±3,62 ^a	65,1±2,16 ^a	55,8±1,49 ^a
FF	1,77±0,028 ^a	1,29±0,017 ^a	94,3±1,77 ^a	65,3±1,06 ^a	55,6±0,87 ^a
<i>TGF-β2 (RsaI, промотор)</i>					
BB	1,83±0,048 ^a	1,33±0,031 ^a	96,4±3,48 ^a	65,8±1,89 ^a	56,9±1,47 ^a
BL	1,78±0,032 ^a	1,28±0,031 ^a	95,5±2,06 ^a	65,1±1,30 ^a	54,9±0,94 ^a
LL	1,73±00,55 ^a	1,28±0,019 ^a	92,1±3,07 ^a	63,2±1,53 ^a	53,9±1,62 ^a
<i>TGF-β3 (BslI, 4 інтрон)</i>					
BB	1,76±0,129 ^a	1,32±0,095 ^a	87,5±5,83 ^a	63,8±5,12 ^a	56,1±3,84 ^a
BL	1,80±0,037 ^a	1,30±0,022 ^a	97,4±2,51 ^a	66,6±1,40 ^a	56,5±1,12 ^a
LL	1,78±0,033 ^a	1,28±0,018 ^a	94,5±2,22 ^a	63,9±1,29 ^a	54,6±0,98 ^a
<i>Mx (RsaI, 13 екзон)</i>					
AG	1,78±0,059 ^a	1,32±0,041 ^a	97,2±3,25 ^a	65,4±1,68 ^a	56,2±1,61 ^a
GG	1,79±0,027 ^a	1,29±0,016 ^a	94,9±1,92 ^a	65,1±1,17 ^a	55,6±0,86 ^a

Як результат проведених досліджень встановлено, що за локусом гіпофізарного фактору транскрипції 1 вірогідних відмінностей між особинами різних генотипів за всіма показниками, що були вивчені, не виявлено.

За локусом трансформуючого ростового фактору $\beta 1$ ситуація аналогічна – статистично вірогідні різниці відсутні.

У свою чергу за *TGF- $\beta 2$* спостерігається, в цілому, превалювання значень показників м'ясної продуктивності особин, гомозиготних за алелем В, однак статистично вірогідних відмінностей не з'ясовано. Єдиний виняток – показник маси м'язового шлунку. Так, для особин з генотипом ВВ він становив $35,4 \pm 1,13$ г, що вірогідно ($p < 0,05$) більше, ніж у особин з генотипом ВL – $32,3 \pm 0,78$ г.

Для локусу *TGF- $\beta 3$* в цілому характерна перевага гетерозиготних особин ВL за низкою показників але найбільш виражена за масою грудних м'язів. Ці відмінності у значеннях невірогідні. При цьому, за масою печінки виявлено статистично суттєві відмінності. Зокрема, у особин з генотипами ВL та LL, вірогідно більше ($p < 0,05$) значення цього показнику ($29,3 \pm 0,97$ і $29,1 \pm 1,09$ г), порівняно з особинами генотипу ВВ ($25,3 \pm 1,55$ г). За масою серця також спостерігаються істотні відміни. Маса серця у курей з генотипом ВВ становила $11,3 \pm 1,06$ г; ВL – $10,3 \pm 0,32$ г; LL – $9,4 \pm 0,31$ г. Відмінності у значеннях цього показника в особин генотипів ВL та LL вірогідні ($p < 0,05$).

За генотипами гену Мх (AG та GG) істотних різниць за дослідженими показниками не відмічено.

За винятком *TGF- $\beta 3$* , за всіма локусами, що були вивчені, вірогідних відмінностей за показниками маси печінки й серця між особинами з різними генотипами не виявлено.

За результатами проведених досліджень найбільш виражений ефект на показники м'ясної продуктивності курей породи род-айленд червоний мали алелі генів гормону росту (MspI-поліморфізм у першому та четвертому інтронах, AluI-поліморфізм у четвертому інтроні), трансформуючих ростових факторів $\beta 2$ та $\beta 3$.

Результати щодо переваги за значеннями кожного з перерахованих генотипів представлено в табл. 6.21.

Таблиця 6.21

Відмінності за показниками м'ясної продуктивності курей дослідної популяції залежно від генотипу за поліморфними локусами

Показник	Найбільш перспективні генотипи				
	<i>GH</i> (MspI, 1 інтрон)	<i>GH</i> (MspI, 4 інтрон)	<i>GH</i> (AluI, 4 інтрон)	<i>TGF-β2</i>	<i>TGF-β3</i>
Патрана тушка, кг	AA>CC на 10,1%	CC>BB на 13,7%	TT>CC на 9,8%	-	-
Грудні м'язи, г	AA>CC на 13,1%	CC>BB на 10,1%	TT>CC на 13,4%	-	-
Печінка, г	-	-	-	-	LL>BB на 13,1%
Серце, г	-	-	-	-	BB>LL на 16,8%
М'язовий шлунок, г	-	-	-	BB>BL на 8,8%	-

В представлених даних було враховано лише вірогідні відмінності за показниками м'ясної продуктивності різних генотипів у межах кожного із локусів.

За результатами досліджень встановлено, що найбільш виражені відмінності за показниками м'ясної продуктивності дослідної популяції курей, демонструють, як правило, гомозиготні особини. М'ясна продуктивність курей представлена проміжними, між показниками гомозигот, значеннями, що повністю відповідає типу взаємодії алелів досліджених локусів (неповне домінування).

6.7 Порівняльний аналіз зв'язку різних алельних варіантів функціональних генів з показниками продуктивності курей різних порід

Після вивчення зв'язку різних алельних варіантів цільових генів з продуктивними ознаками курей різних порід, перейдемо до аналізу «внеску» кожного із превалюючих генотипів та алелів у порівняльному аспекті. Молекулярні маркери, що пов'язані з локусами кількісних ознак, не відносяться до універсальних індикаторів продуктивності тварин. Тобто внаслідок складної полігенної структури кількісних ознак, до яких належать й господарсько-корисні якості курей, можливе виразне варіювання «внеску» кожного із алелів у ознак (його прояв, експресія). Мова йде, у цьому контексті, про породну специфічність кожного з молекулярно-генетичних маркерів. Феномен породоспецифічності дещо обмежує можливості використання досягнень маркер-асоційованої селекції в птахівництві. Це призводить до неможливості використання однієї, «зразкової» популяції курей будь-якої породи, як моделі для проведення селекційного процесу в цілому для інших порід та ліній. Стійка генетична структура високопродуктивної лінії яєчних курей породи білий леггорн може працювати у напрямі максимальної реалізації продуктивного потенціалу, перш за все, саме в цій породі. Можливість екстраполяції результатів на інші породи дещо обмежена чинником модифікуючого впливу «генного оточення» на сукупність бажаних алелів відповідних локусів, що пов'язані з підвищеними господарсько-корисними ознаками птиці. Цей чинник, крім того, вказує на необхідність проведення генетико-популяційних досліджень нативних (генофондних) ліній і порід птиці. Дослідження генетичної структури за сукупністю потенційно перспективних локусів, з наступним аналізом зв'язку їх алельних варіантів з показниками продуктивності птиці, дає змогу виявити оптимальні гені-кандидаті для використання у подальшій селекційній роботі. Кожна окрема порода курей може характеризуватися власним унікальним спектром алелів різних QTL, що визначають її продуктивний потенціал. Аналізуючи проведені дослідження,

перейдемо до порівняння перспективних алелів відповідних поліморфних локусів у курей різних порід української селекції різних напрямів продуктивності.

На підставі отриманих результатів перш за все проведемо аналіз загальних (що співпадають) алелів різних локусів, які мають найбільший вплив на показники яєчної продуктивності птиці. Локусом, алелі якого пов'язані з показниками кількості яєць за 12 та 40 тижнів продуктивного періоду, є пролактин. В цілому, беручи до уваги ту ключову роль, яку відіграє цей гормон у регуляції репродуктивного циклу птиці, не викликає сумніву те, що його різні алельні варіанти, так або інакше, проявляють себе у самих різних породах курей. В контексті досліджень дисертаційної роботи слід враховувати той факт, що, не дивлячись на здійснений аналіз продуктивних ознак курей трьох різних порід, за наявності інсерції в промоторній ділянці пролактину порівнювали лише дві породи – бірківську барвисту та род-айленд червоний. Цей факт визначається мономорфним характером *PRL* у популяції курей породи полтавська глиняста (у наявності тільки особини з генотипом DD). У свою чергу, за однонуклеотидним поліморфізмом у локусі пролактину (C-2402) поліморфні варіанти присутні в кожній із трьох порід. В усіх дослідних популяціях, за показником кількості яєць, вірогідно більші значення продемонстрували особини, що мають алелі I (24 Indel) та C (C-2402T) як у гомозиготному, так й у гетерозиготному стані. При цьому перевага була істотно виражена й досягала 10 %. У популяції курей породи полтавська глиняста гомозиготні за алелем C особини характеризувалися більшою масою яєць, у той час як у популяції курей породи род-айленд червоний більші значення маси яєць були властиві для носіїв алелів D та T. Отже, як свідчать результати досліджень, у курей породи род-айленд червоний більші значення показників кількості яєць і маси яйця пов'язані з різними алелями одного локусу. Між тим у популяції яєчних курей породи бірківська барвиста зв'язку алелів *PRL* з масою яєць не виявлено. Додатково до вищевикладеного, на зв'язок алелів I (24 Indel) та C (C-2402T) із показниками яєчної продуктивності птиці

опосередковано вказує також і генетична структура дослідних популяцій. Для яєчних курей характерні переважні частоти алелів І та С; для курей комбінованого напрямку продуктивності – D та T (розділи 5.1 та 5.2). Також додатковим підтвердженням зв'язку алелів І та С з показниками підвищеної продуктивності птиці слугує переважна частота гаплотипу ІС у популяції яєчних курей, що можна пояснити результатом спрямованої дії відбору (селекційного процесу) у бік більших показників яєчної продуктивності птиці.

Поряд із локусом пролактину, ген трансформуючого фактору росту β також зарекомендував себе таким, що має відношення до показників яєчної продуктивності у більш ніж в одній породі курей. Як результат проведених досліджень встановлено, що алель F корелює з показником більшої кількості яєць за 40 тижнів продуктивності у курей порід бірківська барвиста та полтавська глиняста. У полтавських курей алель F також пов'язаний з м'ясними якостями – для гомозиготних за цим алелем особин характерні більші значення живої маси, маси тушки, м'язів стегна, гомілки та м'язового шлунку. У свою чергу для іншої породи комбінованого напрямку продуктивності, род-айленда червоного, таких зв'язків не виявлено.

У птиці комбінованого напрямку продуктивності зв'язок з кількістю яєць відмічений і для локусу $TGF-\beta 2$, однак, у цьому випадку, переважні генотипи різні. Так, для полтавських курей гомозиготні за алелем L особини демонструють більшу яєчну продуктивність, тоді як для курей породи род-айленд червоний характерно превалювання значення цього показника у гетерозиготних особин. Також у цієї породи виявлено більше значення маси м'язового шлунку в гомозиготних за алелем В особин. Разом із цим, в яєчних курей зв'язку алелів $TGF-\beta 2$ з вивченими показниками не з'ясовано.

Дещо схожа ситуація була і для локусу $TGF-\beta 3$. Так, для бірківської барвистої, більш продуктивні особини, гомозиготні за алелем L, попри це як для полтавських курей – гомозиготні за алелем В. Для род-айленду відмічено більше значення маси яйця на 30 тижень життя та маси печінки для особин з генотипом LL, а також більше значення маси серця для особин з генотипом ВВ.

Як видно, для різних порід курей та напрямів продуктивності у межах одного локусу різні алелі можуть чинити протилежну дію. Отже, у межах однієї породи можлива різна дія альтернативних алелів одного локусу на вивчені показники.

За геном Mx встановлено виразну, в напрямі більшої яєчної продуктивності, дію алелю G для породи бірківська барвіста. Для курей комбінованого напрямку продуктивності також відмічено дещо більші значення показнику яєчної продуктивності для алелю G, однак, лише у гетерозиготному стані, так як гомозигот GG у дослідних популяціях не виявлено у кількості, достатній для проведення статистичного аналізу. Не дивлячись на це, загальна тенденція зв'язку алелю G з показниками продуктивності, на власний погляд, є очевидною.

Щодо яєчної продуктивності за локусом гормону росту загальних алельних варіантів за кожною із чотирьох мутацій у всіх дослідних породах курей не виявлено. Для породи бірківська барвіста значення мають алелі за MspI-поліморфізмом у першому та четвертому інтронах; для полтавської глинястої – за SacI-поліморфізмом у четвертому інтроні GH. У той же час з'ясовані зв'язки алелів GH у яєчно-м'ясних курей з м'ясними якостями. Так у полтавських курей за SacI-поліморфізмом встановлено істотне превалювання значень показників маси грудних м'язів, м'язів стегна та гомілки у гетерозиготних особин АВ. У свою чергу для род-айленду відмічено вплив алельних варіантів за MspI-поліморфізмом у першому та четвертому інтронах GH та AluI-поліморфізму в четвертому інтроні на показники живої маси та маси патраної тушки (у кожному випадку перевага значень на боці гомозиготних за відповідними алелями особин).

Для курей породи род-айленд червоний щодо яєчної продуктивності до перспективних належить також і *IGF-I*.

Додатково до вищеперерахованих локусів для полтавських курей, за показниками яєчної та м'ясної продуктивності, до перспективних також

відносяться алельні варіанти *IGF-I* (HinfI-поліморфізм у промоторному фрагменті) та *GHR* (HindIII-поліморфізм у другому інтроні); за м'ясною – *PIT1*.

Таким чином, підсумовуючи все вищевикладене, можна відмітити, що внесок алелю кожного із функціональних генів може бути як загальним для різних порід та напрямів продуктивності, так і породоспецифічним. За результатами проведених досліджень на дослідних популяціях курей різних порід української селекції до загального випадку належать лише алелі пролактину та гену Мх. Інші алельні варіанти різних локусів проявляють породоспецифічні властивості. При цьому слід відзначити, що відмінності в алельній структурі відображають, переважно, нарівні з напрямом продуктивності (загальним спрямуванням селекційного процесу), також й історію походження породи. Більш того, результати досліджень свідчать про необхідність доповнення класичної селекції, яка ґрунтується на оцінці особин за фенотипом, сучасними молекулярно-генетичними методами, що дають змогу підбирати особин з бажаними генотипами за сукупністю різних локусів, пов'язаних з основними господарсько-корисними ознаками птиці. Результати досліджень, що представлені у дисертаційній роботі, можна використовувати як основу для проведення подальшої селекційної роботи, що забезпечить отримання ліній курей, які характеризуються досить визначеною генетичною структурою та відповідним рівнем продуктивності (що було продемонстровано на прикладі двох експериментальних ліній курей породи бірківська барвіста з гаплотипами ІС та ДТ за локусом пролактину).

Матеріали досліджень викладено у наукових публікаціях [467–474].

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вивчення і обґрунтування основ генетичної мінливості – запорука успішності селекційної роботи, спрямованої на досягнення максимально можливого результату за показниками продуктивності з метою формування висококонкурентної продукції птахівництва. Розуміння особливостей генетичної складової племінного ядра відноситься до найактуальніших завдань вітчизняної птахівничої науки. Більше того, виявлення особливостей генетичної структури локальних порід курей української селекції є необхідним з позиції питання про збереження генофонду, у зв'язку з наявністю низки ризиків для орієнтованого на вітчизняні породи птахівництва. У зв'язку з цим, необхідність у розширенні спектра генетичних маркерів, що використовуються, є одним з першочергових завдань. Подібної думки дотримується і Подстрешний О.П. зі співавторами, який вказує на змогу використання різних класів молекулярно-генетичних маркерів для вивчення закономірностей динаміки генетичної структури при проведенні контролю за збереженістю генофонду [475]. Як відзначає Буркат В.П. зі співавторами, використання сучасних методів досліджень дає змогу проводити генетичний моніторинг, який безпосередньо передбачає перехід від популяційного рівня до індивідуального [476]. У свою чергу, аналіз на індивідуальному рівні дає змогу досліджувати зв'язок різних алелів з господарсько-корисними ознаками, що є необхідною складовою для проведення ефективної селекційної роботи.

На фоні значної низки різних досліджень за використання сучасних досягнень молекулярної генетики у найрізноманітніших галузях вітчизняного тваринництва, зокрема у птахівництві, спостерігається значний дефіцит робіт з генотипування вітчизняних порід курей, що також відмічає Філенко А.Л. зі співавторами [477]. Так, зокрема, вивчення мікросателітної мінливості українських порід курей проводилось фрагментарно, з незначною кількістю

робіт, що охоплювали лише окремі породи. В дослідженнях, що проведено Romanov M.N. та Hillel J. із співавторами, як об'єкт (поряд з іншими дослідними лініями закордонної селекції) використовували лише популяцію яєчно-м'ясних курей породи полтавська глиняста [7, 478]. Окрім зазначеного, поліморфізм локусів кількісних ознак у вітчизняних популяціях курей не вивчено взагалі.

У виконаній роботі вперше проведено комплексні дослідження, що включають завдання з вивчення мікросателітної мінливості та поліморфізму локусів кількісних ознак у популяціях курей локальних порід української селекції.

Для ефективного генотипування особин дослідних популяцій за мікросателітними локусами проведено роботу з оптимізації техніки ДНК-типування, що включає питання стосовно виникнення артефактних молекул у процесі ампліфікації динуклеотидних тандемних повторів.

Проблема утворення артефактів при проведенні ампліфікації досить широко розповсюджена та залежить від цілої низки чинників, до найважливіших з яких належить тип ДНК-маркерів, а також загальні параметри проведення ампліфікації [479]. Особливості структури мікросателітних локусів суттєво впливають на цю проблему [480]. Високий рівень поліморфності мікросателітних локусів, пов'язаний зі зміною кількості елементів мотиву, не лише суттєво підвищує ефективність їх практичного використання для вирішення широкого кола завдань, але й призводить до певних труднощів в питаннях інтерпретації даних електрофореграм, тобто до помилок генотипування. Рутинна ампліфікація, яка на сучасний момент відноситься до безальтернативних інструментів отримання необхідної для досліджень кількості ДНК, не може в повній мірі відтворювати процес реплікації у живій клітині. За відсутності систем репарації ДНК в умовах *in vitro* виникають побічні продукти, які в окремих випадках можуть призводити до помилкових результатів, зокрема, до виникнення артефактних молекул. Артефакти проявляються у вигляді утворення додаткових, тобто таких, які не відповідають

цільовим, фрагментів ДНК, наявність яких може призводити до помилок генотипування. У контексті цих досліджень вивчено питання утворення особливого класу конформаційних артефактних молекул у процесі ампліфікації динуклеотидних мікросателітних локусів – нелінійної гомодуплексної ДНК. Як результат проведеної роботи з'ясовано, що виникнення нелінійної гомодуплексної ДНК є характерним для більшої кількості динуклеотидних мікросателітних локусів різних видів тварин – як для *Gallus gallus* (MCW0104, LEI0094, MCW0123, MCW0245, MCW0034), так й для *Bos taurus* (RM185, MB027).

На основі отриманих експериментальних даних було висунуто припущення та доведено механізм утворення нелінійної дуплексної ДНК шляхом взаємодії ланцюгів молекули, але не внаслідок помилок ДНК-полімерази в процесі ампліфікації. При проведенні аналізу нуклеотидних послідовностей, виділених з поліакриламідного гелю фрагментів, з'ясовано їх повну ідентичність, на що вказує подібність кількості елементів мотиву (ідентичність секвенованих мікросателітних алелів). За результатами досліджень виявлено залежність утворення нелінійної гомодуплексної ДНК від концентрації ампліфікованих фрагментів. Вірогідність утворення нелінійних гомодуплексів суттєво зростає після перших 20 циклів ампліфікації та до фінального циклу ПЛР (35 циклів) їх кількість можна порівняти з виходом цільових фрагментів.

Результати проведених досліджень підтверджуються даними, що отримані іншими авторами з питань вивчення різних конформаційних станів фрагментів ДНК, що містять тринуклеотидні повтори [416]. За думкою низки науковців, ці новоутворення, зокрема Slipped-stranded DNA, виникають як результат ефекту проковзування (slippage) ланцюгів ДНК один відносно одного, що й призводить до утворення конформаційних химерних молекул [417]. У свою чергу, різниця в конформації ДНК призводить до відмінностей в їх електрофоретичній рухливості, що й є чинником утворення додаткових фрагментів на електрофореграмах.

На підставі власних результатів розроблено спосіб контролю денатурації ДНК під час електрофорезу у денатуруючих поліакриламідних гелях (патент України на корисну модель № 123147), використання якого дає змогу звести до мінімуму помилки генотипування, пов'язані з утворенням конформаційних химерних молекул.

Використання оптимізованих методичних підходів до проведення ДНК-типуювання сприяло успішному проведенні роботи з вивчення мікросателітної мінливості в дослідних популяціях курей локальних порід української селекції.

За сукупністю мікросателітних маркерів, як селективно-нейтральних (LEI0094, LEI0166, LEI0192, ADL268, ADL278, MCW034, MCW081, MCW104, MCW123, MCW330 – є рекомендованими ISAG-FAO), так й пов'язаних з проявом стійкості до неопластичних захворювань (MCW0245, MCW0257, MCW0282, MCW0288), проводили вивчення загальних генетико-популяційних параметрів ліній курей різних напрямів продуктивності порід плімутрок білий, бірківська барвиста, полтавська глиняста й род-айленд червоний. За результатами досліджень загальна кількість алелів за всіма локусами в усіх дослідних популяціях становила 66. Найбільша кількість алелів виявлено для породи плімутрок білий (64), найменша – для бірківської барвистої та род-айленду червоного (50). За значенням середньої кількості алелів на локус за всіма дослідними популяціями курей найменше значення відмічене для локусу MCW0257 (2), найбільше – для LEI0192 (6,75).

Серед усіх локусів тільки для трьох є характерним ексцес гетерозигот, за іншими спостерігається достатньо виражений надлишок гомозиготних особин ($F_{is} > 0$), який відображає особливості селекційної роботи, що проводиться з птицею (інбридинг, розведення у собі). Середні значення показника F_{it} становили 27,5 %, максимальні значення відмічені для локусів MCW0245 та MCW0257. Серед усіх дослідних ліній найбільше значення ексцесу гомозиготних особин (середні значення за всіма локусами) виявлено для породи бірківська барвиста, найменше – для род-айленду червоного.

За результатами аналізу показників F-статистики (F_{st}) з'ясовано, що дослідні популяції характеризуються значною дивергенцією (19,5 % загальної генетичної мінливості є розподіленою між породами, у той час як 80,5 % припадає на внутрішньопородну складову).

За величинами генетичних дистанцій (Nei) доведено, що породи плімутрок білий та род-айленд червоний характеризуються найбільшими генетичними відмінностями (65,9 % відмінностей), тоді як плімутрок білий та полтавська глиняста – найменшими (32,3 %). Між породами яєчно-м'ясного напрямку продуктивності (полтавська глиняста та род-айленд червоний) виявлено 35,9 % відмінностей. Для яєчних курей породи бірківська барвиста найбільшу відмінність встановлено з породою род-айленд червоний (58,8 %). За побудови філогенетичного дерева на основі методу приєднання ближніх сусідів (NJ, Neighbor-Joining) відзначено, що загальна топологія відповідає напрямку продуктивності птиці. Популяції курей яєчно-м'ясного напрямку продуктивності порід полтавська глиняста та род-айленд червоний формують окремий кластер. При цьому популяції курей порід плімутрок білий (м'ясо-яєчний напрям продуктивності) та бірківська барвиста (яєчні кури) формують окремі гілки.

Поряд із визначенням мікросателітної мінливості в популяціях курей різних напрямів продуктивності проаналізували генетичну диференціацію субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей (Г-1, Г-2, Г-3, Г-4 та С) на основі восьми, рекомендованих ISAG-FAO, мікросателітних маркерів (MCW081, MCW034, LEI0192, MCW104, MCW020, ADL268, LEI0166, ADL278, LEI0094, MCW330, MCW123). За результатами досліджень загальний алелефонд всіх досліджених субпопуляцій за обраними локусами представлений 38 окремими алелями. При цьому в субпопуляції Г-4 знайдено найменшу кількість алелів за всіма локусами (30), й найбільшу – в субпопуляції Г-2 (35). Мінімальне генетичне різноманіття за кількістю алелів на локус серед всіх дослідних популяцій курей виявлено для маркеру ADL278 (3 алеля на локус), найбільше – для MCW104 (6,4 алеля на локус). За результатами досліджень визначено два

приватних алеля в субпопуляції Г-2 за локусом LEI094, та в субпопуляції Г-1 за локусом MCW123.

У кожній з вивчених субпопуляцій виявлено дефіцит гетерозиготних особин, що є найбільш вираженим у субпопуляції С (15,6 %). Субпопуляції Г-2 та Г-3 займають проміжне положення і фактично співпадають за значенням цього показнику (7,5 %), у той час як для Г-1 є характерним його мінімальне значення (5,3 %), що, в цілому, свідчить про поступове збільшення ступеня інбредності дослідних груп птиці, внаслідок використання в селекційному процесі методу розведення у собі.

За результатами використання, для розрахунків генетичної диференціації, F-статистик Райту встановлено, що більша частина виявленої генетичної мінливості припадає на внутрішньопопуляційну складову, на що вказують значення показника F_{st} (9,2 % генетичного різноманіття розподіляється між субпопуляціями й 91,8 % – в межах субпопуляцій).

За матеріалами розрахунків генетичних дистанцій за Nei виявлено, що до найбільш генетично віддалених відносяться субпопуляції Г-1 та Г-4 (28,8 % відмінностей), між тим як до найбільш близьких – субпопуляції Г-2 та Г-3 (13,3 % відмінностей). Отримані дані підтверджено загальною структурою філогенетичного дерева, побудованого за використання методу незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA).

Подібні дослідження проведено й на дослідних лініях (лінії 02 та 38) курей породи род-айленд червоний за використання восьми мікросателітних локусів, рекомендованих ISAG-FAO. За результатами цих досліджень лінії 02 та 38 виявилися досить схожими. Для лінії 02 визначено 29 алелів за сукупністю маркерів, для лінії 38 – 28. Мінімальну кількість алелів на локус для обох ліній встановлено для LEI094 (2) та MCW081 (2); максимальну – для MCW104 (6 для лінії 02 та 7 для лінії 38). В лінії 02 показник індексу фіксації має негативне значення в локусах LEI094 (-0,05), LEI166 (-0,05) та MCW034 (-0,07). Разом з цим, за локусами MCW0081, MCW0104 та MCW0123 виявлений

надлишок гомозигот (0,25; 0,09 та 0,15 відповідно). За всіма іншими маркерами були незначні відхилення від стану генетичної рівноваги.

Значення показника генетичної дистанції за N_e між лініями 02 та 38 становило 0,079; тоді як значення генетичної подібності – 0,924. За значенням показника F_{st} з'ясовано, що тільки 2,7 % загальної генетичної мінливості за всіма локусами розподілено між популяціями. Отримане значення F_{st} вказує на слабку дивергенцію між лініями 02 та 38 породи род-айленд червоний.

Поряд із визначенням генетико-популяційних аспектів дослідних ліній курей проведено дослідження з вивчення поліморфізму основних генів локусів кількісних ознак в популяціях курей яєчного й комбінованого напрямів продуктивності. На чотирьох локальних породах курей української селекції вперше проведено дослідження поліморфізму генів гормону росту (*GH*), пролактину (*PRL*), рецептору гормону росту (*GHR*), рецептору пролактину (*PRLR*), інсуліноподібного ростового фактору I (*IGF-I*), гіпофізарного фактору транскрипції 1 (*PIT-1*), членів родини трансформуючих ростових факторів бета (*TGF-β1*, *TGF-β2* та *TGF-β3*) та *Mx* гену (*Mx*). Крім того виконано аналіз асоціативних зв'язків виявлених поліморфних локусів з господарсько-корисними ознаками курей різних порід та напрямів продуктивності.

За локусом пролактину в дослідних популяціях курей виявлено два типи мутацій – однунуклеотидний поліморфізм в положенні -2402 та інсерція розміром 24 п.н. у промоторному фрагменті гену. За результатами проведених досліджень з'ясовано, що для курей яєчного напрямку продуктивності є характерним різко виражене превалювання частоти алелів I та C відносно комбінованих ліній. При цьому кількість особин, що є гомозиготними за алелями I та C, мінімальна. Подібний розподіл частот алелів найбільш різко виражений в популяції курей породи полтавська глиняста, в межах якої локус пролактину за Indel-поліморфізмом промоторної ділянки виявився взагалі мономорфним (в наявності тільки особини з генотипом DD). У свою чергу, як результат проведених досліджень з аналізу нерівноваги за зчепленням між різними алелями в локусі пролактину встановлено суттєву нерівновагу за

зчепленням в дослідних популяціях. Для яєчних курей є характерною перевага частоти гаплотипу IC, в той час як для порід комбінованого напряму продуктивності – гаплотипу DT. Більше того, висока частота алелів I та C в популяції яєчних курей корелює з показниками яєчної продуктивності, що кореспондується з дослідженнями закордонних вчених, проведених як на комерційних, так і на локальних породах [302, 309]. Асоційований зв'язок вищеназваних алелів з показниками продуктивності встановлено для різних порід курей української селекції. Для лінії А породи бірківська барвіста алелі I та C корелюють з кількістю яєць за 40 тижнів продуктивності. Для лінії 14 породи полтавська глиняста особини, гомозиготні за алелем C, характеризуються вищими значеннями показників кількості яєць за 12 та 40 тижнів продуктивності, а також масою яйця на 30 тиждень життя. У свою чергу, для курей лінії 38 породи род-айленд червоний з'ясовано перевагу гетерозигот ID і CT над гомозиготами DD і TT за показниками яєчної продуктивності.

За локусом гормону росту проведено дослідження поліморфізму в інтронних ділянках гену – MspI-поліморфізм у першому та четвертому інтронах; SacI-поліморфізм в четвертому. Як результат досліджень виявлено суттєву різницю між дослідними популяціями курей. Так, у випадку з MspI-поліморфізмом у першому інтроні за розподілом алелів найбільші відмінності між собою демонструють популяції курей порід полтавська глиняста й род-айленд червоний. В усіх дослідних популяціях є наявним алель C, який за результатами досліджень низки інших науковців відсутній в комерційних лініях курей та характеризує, в першу чергу, нативні породи [237]. При цьому найбільшу частоту цього алелю відмічено для лінії 38, найменшу – для полтавської глинистої.

За SacI-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту виявлена подібність за значенням частот алелів між всіма дослідними популяціями комбінованого напряму продуктивності (є характерним суттєве переваження частоти алелю B). У досліджених лініях особини, що є гомозиготними за

алелем А, відсутні. В той же час у популяції яєчних курей наявне паритетне значення частот алелів А й В.

Методом рестрикційного аналізу з наступним секвенуванням вивчено MspI-поліморфізм у четвертому інтроні гену гормону росту в дослідних популяціях курей. У ході проведеної роботи виявлено помилковість гіпотези Shahnaz S. зі співавторами про наявність дуплікації гену гормону росту курей, запропонованої на основі аналізу додаткового патерну рестрикції четвертого інтрону гену для MspI [437]. Зокрема, встановлено, що наявність додаткового генотипу (патерну рестрикції) не пов'язана з дуплікацією гену гормону росту. З'ясовано можливість утворення в процесі ампліфікації зразків гетерозигот ВС, що утримують сайт CCGG, гетеродуплексної ДНК двох різних типів, що призводить до утворення додаткового фрагменту ДНК, який не містить у своєму складі сайту CCGG, що, у свою чергу, є чинником утворення додаткового патерну рестрикції. Визначення нуклеотидної послідовності виділених з гелю фрагментів ДНК, дало змогу обґрунтувати та підтвердити правильність припущення відносно природи додаткових генотипів, на підставі чого визначено генетичну структуру дослідних популяцій курей. Виявлено значну відмінність породи полтавська глиняста за розподілом частот алелів. Для лінії 14 є характерним виражене превалювання частоти алеля С, внаслідок наявності значної кількості особин з генотипом СС, в той час як для інших популяцій подібна тенденція не спостерігається. У свою чергу для яєчних курей лінії А є властивим переважання частоти алеля А.

В процесі аналізу отриманих нуклеотидних послідовностей четвертого інтрону гену гормону росту визначено нову, раніше не описану, мутацію у сайті рестрикції для AluI (транзиція С→Т у положенні Chr27:1788455). Підібрано олігонуклеотиди, що фланкують фрагмент четвертого інтрону гену розміром 460 п.н., який містить поліморфний сайт рестрикції для AluI, що, у свою чергу, дало змогу розробити ефективний метод (PCR-RFLP) визначення цього поліморфізму. За результатами досліджень виявлено, що ген гормону росту за цією мутацією є поліморфним в усіх дослідних популяціях курей вітчизняної

селекції. Частота алелю С (сайт рестрикції відсутній) у дослідних популяціях курей різнилась у межах від 4 % (полтавська глиняста) до 30 % (род-айленд червоний). Наявність транзиції С→Т була характерною для переважної кількості особин. За розподілом частот алелів популяція род-айленда червоного відрізнялася від загального масиву, при цьому найбільше – від полтавських курей.

За значенням показників яєчної продуктивності для лінії А особини, що є гомозиготними за алелями В (MspI-поліморфізм у першому інтроні) та С (SacI-поліморфізм у четвертому), демонструють більшу кількість яєць за 40 тижнів продуктивності. У той же час для полтавських курей виявлене превалювання показників у гетерозигот АВ порівняно з ВВ за SacI-поліморфізмом. Для інших мутацій асоційованих зв'язків з показниками яєчної продуктивності не виявлено. Те ж відноситься й до лінії 38 породи род-айленд червоний. У свою чергу, за показниками м'ясної продуктивності ситуація дещо відрізняється. Так, для лінії 14 з'ясовано перевагу значень гетерозигот АВ над ВВ за SacI-поліморфізмом й СТ над ТТ за AluI-поліморфізмом. Для популяції курей породи род-айленд червоний відмічено вірогідне переважання значень показників м'ясної продуктивності для гомозигот АА (MspI, перший інтрон), СС (MspI, четвертий інтрон) й ТТ (AluI, четвертий інтрон) над особинами інших генотипів. Тоді як за SacI-поліморфізмом вірогідних відмінностей між значеннями показників продуктивності особин з різними генотипами не виявлено.

Поряд із стандартними аутосомними локусами визначали поліморфізм генів, локалізованих у статевих хромосомах. До таких локусів відносяться гени рецепторів гормону росту та пролактину. Розміщення *GHR* та *PRLR* в статевих хромосомах визначає їх гемізіготний характер, що призводить до відсутності гетерозиготних особин у самиць курей.

За NspI- та HindIII-поліморфізмом гену рецептору гормону росту в п'ятому і в другому інтронах різні алельні варіанти з'ясовані лише для курей породи полтавська глиняста. Інші дослідні популяції за HindIII-поліморфізмом

GHR були мономорфними. Схожу ситуацію розподілу алельних частот показано також у роботах інших авторів для різних порід курей [263, 271]. За показниками маси яйця та маси м'язів стегна (HindIII-поліморфізм *GHR*) виявлено вірогідну різницю між показниками особин з різними генотипами в популяції курей лінії 14. В інших породах відмінностей не встановлено.

У свою чергу при вивченні BamHI-поліморфізму в п'ятому екзоні гену рецептору пролактину з'ясовано мономорфний характер *PRLR* в усіх дослідних популяціях курей. Відсутність алельних варіантів *PRLR* за цим поліморфізмом висвітлено також в роботі Hassanane M. S., на локальних популяціях курей Судану [436].

За наявністю інсерції в другому інтроні гену гіпофізарного фактору транскрипції 1 визначено подібність всіх дослідних популяцій за значенням частот алелів. Тоді як за розподілом генотипів кури яєчно-м'ясного напряму продуктивності різняться від інших ліній вищими значеннями частоти гомозигот II відносно DD. У той же час лінії А та Г-2 практично однакові за співвідношенням частот гомозиготних генотипів. При аналізі асоційованої залежності встановлено зв'язок генотипу DD з показниками м'ясної продуктивності курей породи полтавська глиняста.

За PstI-поліморфізмом у 5'UTR гену інсуліноподібного ростового фактору I доведено переважання частоти алелю C_2 над C_1 в усіх дослідних популяціях курей, що досягає свого максимального значення в лінії Г-2 породи плімутрок білий. Аналогічний розподіл (наявність поліморфних варіантів за PstI) встановлено, окрім того, в комерційних, а також локальних породах курей в дослідженнях закордонних авторів [281, 282]. Разом із тим за HinfI-поліморфізмом у промоторній ділянці *IGF-I* переважання частоти алелю А над С відзначено тільки для популяції плімутрока білого, у всіх інших дослідних лініях спостерігали більші значення частоти алелю С. Асоційований зв'язок генотипів з показниками яєчної продуктивності виявлено тільки для породи род-айленд червоний (PstI-поліморфізм) та полтавська глиняста (HinfI-поліморфізм). Також у лінії 14 відзначено зв'язок генотипів за HinfI-

поліморфізмом з показниками м'ясної продуктивності. Результати досліджень щодо асоційованого зв'язку алелів та генотипів *IGF-I* корелюють з даними, отриманими при роботі з популяціями курей яєчних порід закордонної селекції [286].

За поліморфізмом складових генної родини трансформуючих ростових факторів бета виявлено різні алельні варіанти в кожній з дослідних популяцій курей. За поліморфізмом гену *TGF-β1* з'ясовано, що в лінії А присутні практично паритетні значення частот алелів В і F, в той час як для інших ліній є характерним переважання значень частоти алелю F. При цьому в усіх дослідних популяціях, за виключенням род-айленду червоного, встановлено асоційований зв'язок алелю F з показниками яєчної та м'ясної продуктивності птиці.

За *RsaI*-поліморфізмом у промоторі *TGF-β2* виявлено близькі значення частот алелів В та L в лінії Г-2, тоді як для інших популяцій є характерним переважання частоти алелю В. У популяціях курей порід бірківська барвіста та род-айленд червоний відзначався позитивний зв'язок генотипів LL та VL відповідно з показниками яєчної продуктивності. Також для лінії 38 характерні більші значення маси м'язового шлунку для особин з генотипом ВВ. Зв'язок гомозиготних за алелем L особин з підвищеними значеннями показників яєчної продуктивності показано також й в роботі Li H. зі співавторами на комерційних лініях курей [376].

За локусом *TGF-β3* виявлено переважання значення частоти алелю L над В в усіх дослідних популяціях за винятком лінії 14, для якої відмічені паритетні значення частот алелів. У кожній із дослідних популяцій з'ясовано позитивний зв'язок алелю L з показниками яєчної продуктивності птиці, що підтверджує дані, отримані в роботі Li H. [376]. При цьому в лінії 38 встановлені більш високі значення маси печінки для особин з генотипом LL, в той час як більші значення маси серця є характерними для особин з генотипом ВВ.

Проведено аналіз зустрічаємості мутації S631N в Mx гені за допомогою вивчення *RsaI*-поліморфізму у 13 екзоні. Як результат проведених досліджень з'ясовано, що Mx ген є поліморфним в усіх вивчених популяціях курей різних

напрямів продуктивності. Найбільший рівень поліморфності (за показником ефективної кількості алелів) виявлено в лінії А. При цьому найбільшу частоту зустрічаємості резистентного алелю А визначено в популяції яєчних курей породи бірківська барвиста, найменшу – в популяціях яєчно-м'ясних курей порід род-айленд червоний та полтавська глиняста. За розподілом частот алелів і генотипів лінії 14 та 38 демонструють стабільну генетико-популяційну структуру протягом декількох генерацій. Тоді як за вивчення зв'язку генетичних варіацій з господарсько-корисними ознаками встановлено, що алельні варіанти гену Мх корелюють з показниками яєчної продуктивності курей породи бірківська барвиста. Для курей яєчно-м'ясного напряму продуктивності, при порівнянні значень продуктивних показників особин з генотипом GG з гетерозиготами AG виявлено вірогідні відмінності за показниками маси яйця та маси печінки (для курей породи род-айленд червоний). За іншими показниками вірогідних різниць не було. Результати досліджень підтверджують дані Luan D.Q. зі співавторами, що вказують на наявність позитивного зв'язку алелю G з показниками продуктивності курей різних локальних порід [344].

На основі отриманих даних за частотами алелів різних поліморфних локусів розраховали генетичні дистанції між дослідними лініями курей різних напрямів продуктивності. Найбільш віддаленими між собою виявилися породи бірківська барвиста та род-айленд червоний (у середньому 24,9 % відмінностей). При цьому максимально виражену різницю з породами яєчно-м'ясного напряму продуктивності (23–25 % відмінностей). Відмінності між породами курей м'ясо-яєчного та яєчно-м'ясного напряму продуктивності є достатньо згладженими. У цьому контексті, максимальні відміни спостерігаються між породами полтавська глиняста та плімутрок білий (11,2 %), мінімальні – між род-айлендом червоним та плімутроком білим (4,2 %). У свою чергу, значення показника генетичної дистанції між двома породами яєчно-м'ясного напряму продуктивності займає проміжне положення (7,1 %).

Аналогічна закономірність спостерігається і за аналізом дендрограми, побудованої на основі вищенаведених генетичних дистанцій за використання алгоритму Neighbor Joining. Виявлено, що загальна структура філогенетичного дерева, головним чином, відповідає особливостям диференціації дослідних ліній птиці, що в цілому відображає різні напрями продуктивності курей. Популяції курей порід полтавська глиняста та род-айленд червоний (яєчно-м'ясний напрям продуктивності) групуються в окремий кластер. У той же час лінії курей м'ясо-яєчного та яєчного напрямів продуктивності формують окремі гілки, при цьому порода яєчних курей демонструє найбільші генетичні відмінності при порівнянні з іншими лініями.

Картина, що спостерігається, переконливо доводить, що генетична диференціація дослідних популяцій курей за сукупністю досліджених поліморфних локусів (*GH*, *PRL*, *IGF-1*, *PIT-1*, *TGF- β 1*, *TGF- β 2*, *TGF- β 3* та *Mx*) визначається, в першу чергу, напрямом продуктивності птиці, внаслідок проведеної селекційної роботи з птицею (дендрограма за локусами кількісних ознак практично співпадає за структурою з дендрограмою за SSR).

На основі отриманих результатів досліджень щодо генетичної структури дослідних популяцій курей за сукупністю поліморфних функціональних генів за використання співвідношення значень очікуваної та фактичної гетерозиготності за кожним з поліморфних локусів проводили аналіз загальної селекційної роботи з птицею. Встановлено, що співвідношення значень показників гетерозиготності в кожній із дослідних популяцій курей є достатньо варіабельними за більшою частиною вивчених маркерів. Відзначено як повну відсутність відмінностей у популяції курей породи род-айленд червоний, так й незначні відхилення в усіх інших лініях, що вказує на недостатню виражену дію добору, яка так чи інакше зачіпає основні локуси кількісних ознак. Отже, на цьому етапі відбувається підтримання вивчених ліній курей у стані «розведення у собі», при якому суттєвих змін генетичної структури популяцій не відбувається. Відсутність активних формоутворюючих процесів у популяціях м'ясо-яєчних курей відмічена також у роботах Подстрешного О.П.

зі співавторами та Хвостика В.П. зі співавторами при аналізі генетичної структури дослідних ліній за поліморфізмом овобілків [393, 481]. Отже, результати аналізу генетичної структури популяцій на рівні ДНК підтверджуються даними з вивчення біохімічного поліморфізму.

Результати досліджень генетичної структури дослідних популяцій курей за використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів, а також аналіз зв'язку виявлених поліморфних локусів з господарсько-корисними ознаками курей яєчного та комбінованого напрямів продуктивності надали змогу розробити й апробувати загальну схему комплексної системи використання MAS (маркер-асоційована селекція) у сучасному селекційному процесі на локальних породах курей української селекції. Обґрунтовано загальні принципи, послідовне використання яких дає змогу проводити генетичний моніторинг в процесі створення нових ліній птиці, здійснювати контроль динаміки генетичної структури популяцій, визначати чистоту лінійного розведення птиці, оцінювати особин для підбора пар для схрещувань з метою отримання мікроліній із заданими комплексами генотипів на основі поліморфізму локусів кількісних ознак для яєчного, м'ясного чи комбінованого напрямків продуктивності птиці. На рисунку 7.1 представлено загальну схему комплексної системи використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів (PCR-RFLP, Indel, SSR) у маркер-асоційованій селекції курей локальних порід української селекції.

У цілому цю систему можна функціонально розподілити на декілька послідовних етапів. На першому етапі проводиться оцінка генетико-популяційних параметрів дослідних ліній курей за використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів. В цьому контексті проводиться аналіз як загального поліморфізму різних функціональних генів, що пов'язані з проявом господарсько-корисних ознак за використання PCR-RFLP та Indel маркерів, так і визначення рівня мікросателітної мінливості в дослідних популяціях. В залежності від породи, в першу чергу проводиться дослідження поліморфізму генів, алельні варіанти яких безпосередньо пов'язані з проявом господарсько-

корисних ознак за заданими напрямками продуктивності. За результатами проведених досліджень у напрямі аналізу зв'язку виявлених поліморфних локусів з господарсько-корисними ознаками курей визначені перспективні комплексні генотипи залежно від напрямку продуктивності птиці.



Рис. 7.1 Загальна схема основних етапів комплексної системи використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів у маркер-асоційованій селекції українських локальних порід курей

Як свідчать результати проведених досліджень, для курей породи бірківська барвиста лінії А у напрямі яєчної продуктивності доцільно визначати поліморфізм наступних маркерних систем – локуси пролактину (24 Indel та C-2402T), гормону росту (MspI-поліморфізм в першому та четвертому інтроні), трансформуючих ростових факторів бета 1 й бета 3, гену Mx.

Формула бажаних комплексних генотипів для цієї лінії курей така:

$$PRL^{\text{II}} PRL^{\text{CC}} GH1 (\text{MspI})^{\text{BB}} GH4 (\text{MspI})^{\text{CC}} TGF-\beta 1^{\text{FF}} TGF-\beta 3^{\text{LL}} Mx^{\text{GG}}.$$

Для курей породи полтавська глиняста лінії 14 у напрямі яєчної продуктивності – локуси пролактину (C-2402T), гормону росту (SacI-поліморфізм в четвертому інтроні), рецептору гормону росту (HindIII-поліморфізм в другому інтроні), інсуліноподібного ростового фактору I (HinfI-поліморфізм у промоторній ділянці гену), родини трансформуючих ростових факторів бета.

Формула бажаних комплексних генотипів наступна:

$$PRL^{\text{CC}} GHR (\text{HindIII})^{\text{B0}} GH (\text{SacI})^{\text{AB}} IGF-I (\text{HinfI})^{\text{CC}} TGF-\beta 1^{\text{FF}} TGF-\beta 2^{\text{LL}} TGF-\beta 3^{\text{BB}}.$$

У напрямі м'ясної продуктивності – локуси гормону росту (SacI-поліморфізм в четвертому інтроні), рецептору гормону росту (HindIII-поліморфізм в другому інтроні), гіпофізарного фактору транскрипції 1 (інсерція в 57 п.н. у другому інтроні), трансформуючого ростового фактору бета 1.

Формула бажаних комплексних генотипів така:

$$GH4 (\text{SacI})^{\text{AB}} GHR (\text{HindIII})^{\text{B0}} IGF-I (\text{HinfI})^{\text{CC}} PIT-1^{\text{DD}} TGF-\beta 1^{\text{FF}}.$$

У свою чергу, для курей породи род-айленд червоний лінії 38 у напрямі яєчної продуктивності – локуси пролактину (24 Indel та C-2402T), інсуліноподібного ростового фактору I (PstI-поліморфізм у 5'UTR), трансформуючих ростових факторів бета 2 і бета 3, гену Mx.

Формула бажаних комплексних генотипів наступна:

$$PRL^{\text{ID}} PRL^{\text{CT}} IGF-I (\text{PstI})^{\text{C1C2}} TGF-\beta 2^{\text{BL}} TGF-\beta 3^{\text{LL}} Mx^{\text{AG}}.$$

У напрямі м'ясної продуктивності – локуси гормону росту (MspI-поліморфізм в першому та четвертому інтроні, AluI-поліморфізм в четвертому інтроні), трансформуючого ростового фактору бета 2 і бета 3.

Формулою бажаних комплексних генотипів є:

$$GH1 (MspI)^{AA} GH4 (MspI)^{CC} GH4 (AluI)^{TT} TGF-\beta 2^{BB} TGF-\beta 3^{BB}.$$

Одночасно з вивченням поліморфізму цільових генів проводять аналіз мікросателітної мінливості в дослідних популяціях курей. Використання мікросателітних маркерів дає значні можливості у питаннях контролю походження, лінійної належності птиці, а також для визначення загальних генетико-популяційних параметрів дослідних ліній, що визначається високим рівнем поліморфності мікросателітів взагалі. Використання наявного інструментарію (комплексу різних ДНК-маркерів) дає змогу успішно виконувати як генетичний моніторинг за проведенням селекційної роботи, так й оцінку мікроеволюційних процесів у дослідних популяціях. У цьому контексті має значення виявлення породоспецифічних алелів мікросателітних локусів, що, у свою чергу, забезпечує ефективну ідентифікацію порід курей, а також проводити їх паспортизацію. Використання цих генетичних паспортів різних популяцій сприяє ефективному, з мінімальними відхиленнями, проведенню контролю чистоти лінійного розведення у племінному птахівництві. Доцільність використання маркерних ознак у селекційному процесі відмічена також у роботі Подстрешного О.П. зі співавторами [482].

На наступному етапі, на основі виявлених комплексних генотипів за сукупністю молекулярно-генетичних маркерів, проводиться відбір особин з перспективними генотипами залежно від напрямку продуктивності птиці. Як основу доцільно використовувати розроблені формули комплексних генотипів, що вищеописані. Отже, з урахуванням результатів аналізу мікросателітної мінливості, визначається група особин, яка характеризується специфічним для конкретної породи курей алельним профілем. Також проводиться підбір за комплексом бажаних генотипів за низкою цільових генів, алельні варіанти яких пов'язані з проявом господарсько-корисних ознак.

Відбір відповідних дослідних груп дає змогу перейти до третього, завершального етапу, у ході реалізації якого отримують експериментальні мікролінії курей з бажаними комплексними генотипами та проводять оцінку їх господарсько-корисних ознак за використання класичних селекційних методів. Таким чином, результат використання запропонованої моделі полягає в отриманні ліній курей, які мають специфічний спектр алелів за сукупністю поліморфних локусів (як цільових генів, так і мікросателітів) й характеризуються відповідним рівнем прояву господарсько-корисних ознак за обраним напрямом продуктивності птиці (яєчний чи комбінований).

Врешті-решт, підсумовуючи результати, викладені в цьому розділі дисертаційної роботи, можна відзначити, що теоретичне обґрунтування та практична реалізація маркер-асоційованої селекції українських локальних порід курей створює необхідну основу для проведення подальшої роботи, яка заснована на використанні специфічних особливостей організації спадкового матеріалу птиці вітчизняного генофонду, з метою створення високопродуктивних та конкурентоспроможних ліній.

ВИСНОВКИ

1. На основі проведених досліджень теоретично обґрунтована та запропонована до реалізації комплексна система застосування різних типів молекулярно-генетичних маркерів (PCR-RFLP, Indel, SSR) у маркер-асоційованій селекції українських локальних порід курей яєчного та комбінованого напрямів продуктивності.

2. Доведено, що утворення нелінійної гомодуплексної ДНК характерно для більшості динуклеотидних мікросателітних локусів (MCW0104, LEI0094, MCW0123, MCW0245, MCW0034 та інші). Встановлено, що причиною утворення цього типу артефактів ПЛР є безпосередня взаємодія антипаралельних ланцюгів молекули ДНК.

3. За використання 14 мікросателітних локусів досліджено генетичну мінливість у популяціях курей різних порід української селекції. Загальна кількість алелів за всіма локусами становила 66. Всі локуси виявилися поліморфними. За значеннями показника інформаційного поліморфізму (PIC) загальна кількість високоінформативних маркерів становила ~ 45 %. Кількість алелів на локус коливалась від 2 (MCW0257) до 9 (LEI0192).

4. Виявлено значну дивергенцію ($F_{st} = 0,19$) між дослідними популяціями курей. Найбільші генетичні відмінності встановлено між породами плімутрок білий та род-айленд червоний (65,9 % відмінностей), найменші – між породами плімутрок білий та полтавська глиняста (32,3 %). Між лініями 14 та 38 виявлено 35,9 % відмінностей. Популяція яєчних курей (лінія А) максимально відрізняється від породи род-айленд червоний (58,8 %), тоді як з лініями Г-2 та 14 відмінності спостерігаються на рівні 32,8 та 37,9 % відповідно.

5. Визначено рівень генетичної диференціації субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей (Г-1, Г-2, Г-3, Г-4 та С), а також ліній 02 та 38 породи род-айленд червоний за використання 8 мікросателітних маркерів

(LEI0094, LEI0166, ADL0268, ADL0278, MCW0034, MCW0081, MCW0104, MCW0123). З'ясовано, що до найбільш генетично віддалених відносяться субпопуляції Г-1 та Г-4 (28,8 % відмінностей) порівняно з більш близькими субпопуляціями Г-2 та Г-3 (13,3 %). Лінії 02 та 38 породи род-айленд червоний демонструють мінімальні відмінності (7,9 %).

6. Виявлено поліморфізм локусів гормону росту (*GH*), рецептору гормону росту (*GHR*), пролактину (*PRL*), інсуліноподібного ростового фактору I (*IGF-I*), гіпофізарного фактору транскрипції 1 (*PIT-1*), родини трансформуючих ростових факторів бета (*TGF-β1*, *TGF-β2* і *TGF-β3*) та Мх-гену (*Mx*) у популяціях курей порід бірківська барвиста (лінія А), плімутрок білий (лінія Г-2), полтавська глиняста (лінія 14) та род-айленд червоний (лінія 38).

7. З'ясовано, що локус рецептору пролактину (*PRLR*) за *Bam*HI-поліморфізмом у п'ятому екзоні є мономорфним у всіх дослідних популяціях курей. За наявністю інсерції розміром 24 п.н. локус пролактину є мономорфним у популяції курей породи полтавська глиняста та поліморфним у всіх інших дослідних популяціях. За *Hind*III-поліморфізмом у другому інтроні гену рецептору гормону росту встановлено, що за винятком популяції курей породи полтавська глиняста всі дослідні лінії є мономорфними.

8. Встановлено загальні генетико-популяційні показники дослідних ліній курей за поліморфізмом локусів кількісних ознак. Доведено відсутність спрямованої дії традиційних методів селекції на зміну частот алелів основних генів-кандидатів, пов'язаних з продуктивними ознаками птиці. За більшістю досліджених локусів популяції знаходяться в рівноважному стані, що свідчить про відсутність дії мікроеволюційних процесів, в тому числі й штучного відбору.

9. За результатами аналізу нуклеотидних послідовностей четвертого інтрону гену гормону росту курей визначено нову мутацію в сайті рестрикції для *AluI* (транзиція С→Т у положенні Chr27:1788455). З'ясовано, що ген гормону росту за обраним поліморфізмом є поліморфним в усіх дослідних

популяціях курей. Наявність транзиції С→Т характерна для переважної кількості особин та становить 70–96 % залежно від лінії птиці.

10. Проведено аналіз розподілу частот гаплотипів за *PRL* та *IGF-I* у дослідних лініях курей. Встановлено, що для яєчних курей є характерним переважання частоти гаплотипу IC в локусі пролактину, в той час як для порід комбінованого напрямку продуктивності – гаплотипу DT. Виявлено нерівновагу за зчепленням у локусі *PRL* для порід бірківська барвиста та род-айленд червоний ($D' = 1$). У локусі *IGF-I* відхилення від стану рівноваги в розподілі гаплотипів з'ясовано для ліній А ($D' = 0,89$), 14 ($D' = 0,70$) та 38 ($D' = 0,56$).

11. Доведено, що наявність додаткового патерну рестрикції для MspI у четвертому інтроні гену гормону росту не пов'язана з дуплікацією гену, а є наслідком утворення гетеродуплексної ДНК у процесі ампліфікації цільового фрагменту.

12. За результатами аналізу поліморфізму локусів кількісних ознак частка від загального різноманіття, обумовлена породними відмінностями (F_{st}), становила 0,14. Значення F_{st} , що відповідають вираженій дивергенції, виявлено для *PRL* та *GH*; середній рівень дивергенції відзначено для *IGF-I* (HinfI-поліморфізм), складових родини *TGF- β* та Mx-гену. Для *PIT-1* і *IGF-I* (PstI-поліморфізм) виявлено слабку дивергенцію.

13. З'ясовано, що особливості генетичної диференціації дослідних ліній курей за сукупністю локусів кількісних ознак відображають відмінності у напрямку продуктивності птиці. За результатами проведеного аналізу показано, що за будовою філогенетичного дерева (алгоритм Neighbor Joining) популяції курей порід полтавська глиняста та род-айленд червоний групуються в окремий кластер, в той час як кури м'ясо-яєчного та яєчного напрямку продуктивності формують окремі гілки, при цьому порода бірківська барвиста демонструє найбільші генетичні відмінності порівняно з іншими групами.

14. Виявлено породні особливості зв'язку алельних варіантів поліморфних локусів з проявом господарсько-корисних ознак курей різних напрямів продуктивності. Показано, що для курей породи бірківська барвиста з

підвищеними показниками продуктивності асоційовані окремі генотипи за *PRL* (24 Indel та C-2402T), *GH* (MspI-поліморфізм у першому та четвертому інтроні), *TGF-β1*, *TGF-β3*, *Mx* ($p < 0,01$); для породи полтавська глиняста – *PRL* (C-2402T), *GH* (SacI-поліморфізм у четвертому інтроні), *GHR* (HindIII-поліморфізм у другому інтроні), *IGF-I* (HinfI-поліморфізм у промоторному фрагменті гену), *PIT-1*, *TGF-β1*, *TGF-β2* та *TGF-β3* ($p < 0,05$); для породи род-айленд червоний – *PRL* (C-2402T), *GH* (MspI-поліморфізм у першому та четвертому інтронах, AluI-поліморфізм у четвертому інтроні), *IGF-I* (PstI-поліморфізм у 5'UTR), *TGF-β2*, *TGF-β3*, *Mx* ($p < 0,05$).

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. У практичній роботі лабораторій з генетики та молекулярної діагностики для підвищення ефективності генотипування за мікросателітними локусами як у моно-, так й у мультиплексних реакціях, при електрофоретичному розділенні продуктів ампліфікації у денатуруючих поліакриламідних гелях рекомендовано використовувати розроблений спосіб контролю ефективності денатурації (патент України на корисну модель № 123147).

2. Для проведення типування особин курей за AluI-поліморфізмом четвертого інтрону гену гормону росту (транзиція С→Т в положенні Chr27:1788455) рекомендовано використовувати розроблений і апробований оригінальний метод PCR-RFLP та для ампліфікації відповідного фрагменту такі олігонуклеотиди – ctgagggacgtgggttatgggcac та gacctcaaggattgcaggct (температура відпалу становить 63 °С; розмір ампліфікованого фрагменту – 460 п.н.) з подальшою рестрикцією AluI.

3. За інтенсивної селекції на підвищення яєчної продуктивності рекомендувати подальше широке виробниче використання курей породи бірківська барвиста (лінія А) з комплексним генотипом $PRL^{II} PRL^{CC} GH1 (MspI)^{BB} GH4 (MspI)^{CC} TGF-\beta 1^{FF} TGF-\beta 3^{LL} Mx^{GG}$.

4. З метою покращення показників господарсько-корисних ознак курей комбінованого напрямку продуктивності порід полтавська глиняста (лінія 14) та род-айленд червоний (лінія 38) рекомендовано у селекційній роботі формувати групи курей за наступними комплексними генотипами: $PRL^{CC} GHR (HindIII)^{B0} GH (SacI)^{AB} IGF-I (HinfI)^{CC} TGF-\beta 1^{FF} TGF-\beta 2^{LL} TGF-\beta 3^{BB}$ та $GH4 (SacI)^{AB} GHR (HindIII)^{B0} IGF-I (HinfI)^{CC} PIT-I^{DD} TGF-\beta 1^{FF}$ (лінія 14, яєчна та м'ясна продуктивність); $PRL^{ID} PRL^{CT} IGF-I (PstI)^{C1C2} TGF-\beta 2^{BL} TGF-\beta 3^{LL} Mx^{AG}$ та $GH1 (MspI)^{AA} GH4 (MspI)^{CC} GH4 (AluI)^{TT} TGF-\beta 2^{BB} TGF-\beta 3^{BB}$ (лінія 38, яєчна та м'ясна продуктивність відповідно).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fulton J. E., Genomic selection for poultry breeding. *Animal Frontiers*. 2012. Vol. 2, No. 1. P. 30–36.
2. Wolc A. Understanding genomic selection in poultry breeding, *World's Poultry Sci. J.* 2014. Vol. 70. P. 309–314.
3. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17, № 4/2. С. 1044–1054.
4. Копилов К. В. Поліморфізм генів асоційованих з господарсько корисними ознаками (QTL) у трьох порід великої рогатої худоби. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2010. Вип. 7 (17). С. 51–57.
5. Почерняев К. Ф., Ломако Д. В. Генетичне різноманіття мітохондріальних геномів свиней великої чорної породи. *Свинарство*. 2012. Вип. 61. С. 46–51.
6. Метлицька О. І., Поліщук В. П., Таран С. І. Застосування методів морфометрії та молекулярно-генетичної оцінки при визначенні чистопородності українських бджіл. *Біологія тварин*. 2010. Т. 12, № 1. С. 254–259.
7. Romanov M. N., Weigend S. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers. *Poultry science*. 2001. Vol. 80. P. 1057–1063.
8. Филенко А. Л., Васильев В. В., Миделашвили В. В., Моисеева И. Г., Севастьянова А. А., Семенова С. К. ДНК-фингерпринтинг и генетическая дифференциация нескольких пород домашней курицы (*Gallus Gallus L.*). *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія*. 2010. Вип. 12, № 920. С. 42–46.

9. Шельов А. В., Спиридонов В. Г., Мельничук С. Д., Бородай В. П., Пономаренко Н. П. Генотипування курей кросу "Ломан білий". *Біологія тварин: науково-теоретичний журнал*. 2009. Т. 11, № 1. С. 276–280.
10. Шельов А. В., Пономаренко Н. П., Бородай В. П., Мельник В. В., Спиридонов В. Г., Мельничук С. Д. Використання мікросателітних маркерів ДНК для контролю походження та однорідності популяцій сільськогосподарської птиці. *Сучасне птахівництво*. 2013. № 2 (123). С. 16–19.
11. Ткачик Т. Е. Імуногенетичний контроль при створенні нової популяції бірквівських м'ясо-яєчних курей. *Науковий вісник ЛНАВМ імені Гжицького*. 2006. Т. 8, № 2 (29), ч. 3. С. 210–216.
12. Подстрешний О. П., Сахацький М. І., Паскевич Г. А. Генетичний поліморфізм в лініях і гібридах кросів яєчних курей. *Птахівництво: Міжвід. темат. наук. зб.* (Матеріали IV Укр. конф. по птахівництву з міжнарод. участю, 15-19 вересня 2003 р., Алушта). 2003. Вип. 53. С. 167–174.
13. Хвостик В. П., Бондаренко Ю. В. Генетичні особливості м'ясо-яєчних курей поліпшеної популяції. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія "Тваринництво"*. 2013. Вип. 7 (23). С. 200–203.
14. Паскевич Г. А., Ковальський Ю. В., Сахацький М. І. Генетична структура кросів яєчних курей та їх господарськи-корисні ознаки. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2016. Т. 18, № 1 (65). ч. 3. С. 85–91.
15. Терещенко О. В., Катеринич О. О., Рожковський О. В. Україна і світові тенденції розвитку ринку племінного птахівництва. *Птахівництво. Міжвідомчий науковий тематичний збірник*. 2009. № 63. С. 26–37.
16. Вініченко І. І., Маховський Д. В. Стан та перспективи розвитку птахівничих підприємств в Україні. *Агросвіт*. 2015. № 24. С. 3–6.
17. Буяров В. С., Буяров А. В., Клейменов А. В., Шалимова О. А. Состояние и перспективы развития мясного птицеводства. *Вестник Орел ГАУ*. 2012. № 1 (34). С. 49–61.
18. Сахацький М. І., Абдуллаєва Е. С. Виробництво м'яса бройлерів у світі: обсяги, технології, стан та перспективи. *Науковий вісник Національного*

університету біоресурсів і природокористування України. Серія : Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. 2014. Вип. 202. С. 148–158.

19. Нечаев В., Мисюра Н. Программно-целевой подход в развитии промышленного птицеводства. *АПК: экономика, управление*. 2010. № 4. С. 41–48.

20. Ільчук М. М., Коновал І. А., Мельникова І. В., Кирилюк О. Ф., Титарчук І. М., Коновал О. І., Євтушенко В. Д. Конкурентоспроможність продукції скотарства і птахівництва України в системі євроінтеграції : монографія. Київ: Аграр Медіа Груп, 2015. 321 с.

21. Беженар І. М., Васюта Т. М. Стан та перспективи розвитку птахівництва в Україні. *Агросвіт*. 2015. № 18. С. 41–51.

22. Пірог С. В. Тенденції розвитку галузі птахівництва в Україні. *Інвестиції: практика та досвід*. 2017. № 10. С. 61–63.

23. Карпенко С. М. Стан галузі та перспективи розвитку птахівництва в Україні. *Корми і факти*. 2015. № 10 (62). С. 6–7.

24. Карпенко С. М. Основні тенденції розвитку птахівництва. *Тваринництво сьогодні*. 2016. № 7. С. 2–9.

25. Терещенко О. В. Стан і перспективи розвитку птахівництва. *Сучасне птахівництво*. 2011. № 7-8. С. 4–8.

26. Терещенко О. В., Катеринич О. О., Панькова С. М., Бородай В. П. Формування генетичних ресурсів вітчизняних порід сільськогосподарської птиці в контексті продовольчої безпеки держави. *Сучасне птахівництво*. 2014. № 7-8. С.19–21.

27. Задорожній А. А., Туринський В. М. Тенденції розвитку племінного птахівництва. *Сучасне птахівництво*. 2012. № 2 (111). С. 9–12.

28. Методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин / за наук. ред. І. В. Гузева. Київ: Аграрна наука, 2007. 120 с.

29. Гуменний В. Д., Шаловило С. Г., Кирилів Я. І. Проблема збереження і удосконалення генофонду локальних, аборигенних порід

сільськогосподарських тварин і її значення для теорії і практики селекції відповідно до вимог СОТ. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2013. Т. 15, № 1 (63). Частина 2. С. 61–80.

30. Жукорський О., Костенко О., Катеринич О. Інформаційне забезпечення і украління селекційно-племінною роботою у птахівництві. *Тваринництво України*. 2014. № 5. С. 2–4.

31. Катеринич О. О., Панькова С. М., Захарченко О. П., Лютий Ю. С. Порівняльний аналіз відтворних якостей курей вітчизняної селекції. *Птахівництво. Міжвідомчий науковий тематичний збірник*. 2013. № 69. С. 134–138.

32. Хвостик В. П., Захарченко О. П., Лютий Ю. С., Печеніжська Т. Б., Фесенко Н. А. Господарсько корисні ознаки курей вітчизняного генофонду. *Птахівництво. Міжвідомчий науковий тематичний збірник*. 2013. № 70. С. 30–34.

33. Катеринич О. О., Прозорова Н. В. Економічна ефективність використання курей вітчизняної селекції у племінних господарствах. *Економіка АПК*. 2014. № 1. С. 30–32.

34. Терещенко О. В., Катеринич О. О., Панькова С. М. Напрями розвитку галузі птахівництва. *Вісник аграрної науки*. 2015. № 5 (747). С. 27–30.

35. Simrinder S. S., Jeong D. K., Sharma N., Lee J. H., Kim J. H., Kim S. H., Kim S. W., Oh S. J. Marker assisted selection-applications and evaluation for commercial poultry breeding. *Korean J. Poult. Sci.* 2013. Vol. 40, № 3. P. 223–234.

36. Wakchaure R., Ganguly S., Praveen P. K., Kumar A., Sharma S., Mahajan T., Marker Assisted Selection (MAS) in Animal Breeding: A Review. *J. Drug. Metab. Toxicol.* 2015. Vol. 6. e127.

37. Wolc A., Kranis A., Settar P., Fulton J. E., O'Sullivan N. P., Watson K. A., Hickey J., de los Campos G., Fernando R. L., Garrick D. J., Dekkers J. C. M. Implementation of genomic selection in the poultry industry. *Animal Frontiers*. 2016. Vol 6, № 1. P. 23–31.

38. Yeo J. S., Kim J. W., Chang T. K., Park Y. A., Nam D. H., Utilization of DNA Marker-Assisted Selection in Korean Native Animals. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2000. Vol. 5. P. 71–78.
39. Bahmanimehr A. Inheritance of Important Economic Traits in Chickens Under Short Term Selection. *International Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2012. Vol. 4, No. 2. P. 109–112.
40. Меркурьева Е. К. Генетические основы селекции в скотоводстве. Москва: Колос, 1977. 240 с.
41. Хедрик Ф. Генетика популяций. Москва: Техносфера, 2003. 592 с.
42. Kinghorn B. P., Kennedy B. W., Smith C. A method for screening for genes of major effect. *Genetics.* 1993. Vol. 134. P. 351–360.
43. Kinghorn B. P., Van Arendonk J. A. M., Hetzel J. Detection and use of major genes in animal breeding. *AgBiotech News and Information.* 1994. Vol. 6, No 12. P. 297–302.
44. Kerje S. Mapping genes affecting phenotypic traits in chicken. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the faculty of medicine 1304. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2003. 40 p.
45. Montaldo H. H., Meza-Herrera C. A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Journal of Biotechnology.* 1998. Vol. 1, No 2. P. 1–7.
46. Сулимова Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения. *Усп. соврем. биологии.* 2004. Т. 124. С. 260–271.
47. Dekkers J. C. M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J. Anim. Sc.* 2004. Vol. 82. E-Suppl. P. E313–E328.
48. Naqvi A. N. Application of Molecular Genetic Technologies in Livestock Production: Potentials for Developing Countries. *Advances in biological research.* 2007. Vol. 1 (3-4). P. 72–84.

49. Marker-Assisted Selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish / ed. E. P. Guimaraes et. al. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations, 2007. 494 p.

50. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. Москва: Мир, 1984. 232 с.

51. Генетика: підручник / за ред. А. В. Сиволюба. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 320 с.

52. Копилов К. В. ДНК-діагностика генетичних ресурсів великої рогатої худоби: дис. ... д-ра с.-г. наук: 03.00.15 / Ін-т розведення і генетики тварин. Чубинське, 2011. 304 с.

53. Schulman N. F., De Vries M. J., Dentine M. R. Linkage disequilibrium in two-stage marker-assisted selection. *J. Anim. Breed. Genet.* 1999. Vol. 116. P. 99–110.

54. Schulman N. F., Dentine M. R. Linkage disequilibrium and selection response in two-stage marker-assisted selection of dairy cattle over several generations. *J. Anim. Breed. Genet.* 2005. Vol. 122. P. 110–116.

55. Zhao H., Nettleton D., Soller M., Dekkers J. C. M. Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between markers and QTL. *Genet. Res. Camb.* 2005. Vol. 86. P. 77–87.

56. Meuwissen T. H. E., Goddard M. E. The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genet. Sel. Evol.* 1996. Vol. 28. P. 161–176.

57. Mishra S. P., Mishra C., Mishra D. P., Rosalin B. P., Bhuyan C. Application of advanced molecular marker technique for improvement of animal: A critical review. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 2017. Vol. 5 (5). P. 1283–1295.

58. Marshall K., van der Werf J. H. J., Henshall J. Exploring major gene-marker phase-typing strategies in marker-assisted selection schemes. *Animal science.* 2004. Vol. 78. P. 213–227.

59. Zakizadesh S., Nejati-Javaremi A., Reissmann M., Rahimi G., Jahan Bakhshi A. Analysis of selection effect based on kappa casein gene on milk yield production of Iranian Sarabi cattle breed using stochastic simulation. *Pakistan journal of biological sciences*. 2007. Vol. 10 (6). P. 941–945.
60. Ribaut J. M., Betran J. Single large-scale marker-assisted selection (SLS-MAS). *Molecular breeding*. 1999. Vol. 5 P. 531–541.
61. Collard B. C. Y., Mackill D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2008. Vol. 363. P. 557–572.
62. Servin B., Martin O. C., Mezard M., Hospital F. Toward a Theory of Marker-Assisted Gene Pyramiding. *Genetics*. 2004. Vol. 168. P. 513–523.
63. Xu L. Y., Zhao F. P., Sheng X. H., Ren H. X., Zhang L., Wei C. H., Du L. X. Optimal design for marker-assisted gene pyramiding in cross population. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 2012. Vol. 25, No. 6. P. 772–784.
64. Hobson F. A., Land D. G., Griffiths N. M., Curtis R. F. Egg taints: association with trimethylamine. *Nature*. 1973. Vol. 243. P. 304–305.
65. Hobson F. A., Fenwick R. G., Land D. G., Curtis F., Gulliver A. L. Rapeseed meal and egg taint. *British Poultry Science*. 1975. Vol. 16. P. 219–222.
66. Butler E. J., Fenwick G. R. Trimethylamine and fishy taint in eggs. *World's poultry science journal*. 1984. Vol. 40 (1). P. 38–51.
67. Bolton W., Carter T. C., Morley Jones R. The hen's egg: genetics of taints in eggs from hens fed on rapeseed meal. *Br. Poult. Sci*. 1976. Vol. 17. P. 313–320.
68. Pearson A. W., Butler E. J., Curtis R. F., Fenwick G. R., Hobson-Frohock A., Land D. G. Effect of rapeseed meal on hepatic trimethylamine oxidase activity in the domestic fowl in relation to egg taint. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1979. Vol. 30. P. 291–298.
69. Фисинин В. И., Егоров И. А., Драганов И. Ф. Кормление сельскохозяйственной птицы: учебник / Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 344 с.
70. Honkatukia M., Reese K., Preisinger R., Tuiskula-Haavisto M., Weigend S., Roito J., Mäki-Tanila A., Vilkki J. Fishy taint in chicken eggs is associated with a

substitution within a conserved motif of the FMO3 gene. *Genomics*. 2005. Vol. 86. P. 225–232.

71. Kretzschmar K., Reese K., Honkatukia M., Eding H., Preisinger R., Karl H., Danicke S., Weigend S. Effect of Flavin containing monooxygenase (FMO3) genotype on trimethylamine (TMA) content in the chicken egg yolk. *Arch. Geflügelk.* 2007. Vol. 71 (5). P. 200–206.

72. Ward A. K., Classen H. L., Buchanan F. C. Fishy-egg tainting is recessively inherited when brown-shelled layers are fed canola meal. *Poultry Science*. 2009. Vol. 88. P. 714–721.

73. Hamid M. A., Wang X., Zhao X. Genotyping of flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and mismatch amplification mutation assay (MAMA-PCR) in chickens. *African Journal of Biotechnology*. 2012. Vol. 11 (7). P. 1823–1828.

74. Chu Q., Zhang J., Zhu S., Zhang Y., Wang H., Geng A., Liu H. The detection and elimination of flavin-containing monooxygenase 3 gene T329S mutation in the Beijing You chicken. *Poultry Science*. 2013. Vol. 92. P. 3109–3112.

75. Метлицька О. І., Гиря В. М. Генетико-селекційні аспекти прогнозування племінної цінності кнурів. *Вісник Полтавської державної академії*. 2011. № 2. С. 87–91.

76. Костенко С. О., Копилова К. В. Перспективи використання геноміки свійських тварин у селекції. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Тваринництво*. 2011. Вип. 7 (19). С. 53–57.

77. Добрянська М. Л. Генетична структура м'ясних порід великої рогатої худоби за різними типами ДНК-маркерів. *Розведення і генетика тварин*. 2014. Вип. 48. С. 183–189.

78. Гузеєв Ю. В., Мельник О. В., Спиридонов В. Г., Мельничук С. Д. Порівняльний аналіз генетичної структури мікропопуляції сірої української породи великої рогатої худоби за ДНК-маркерами. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2015. Т. 17, № 3 (63). С. 166–171.

79. Балацький В. М., Корінний С. М., Баньковська І. Б., Гіболенко О. С. Асоціація гену рилізінг-фактора гормону росту з якістю м'яса свиней великої білої породи української селекції. *Свинарство. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Інституту свинарства і АПВ НААН*. 2015. Вип. 67. С. 107–112.
80. Копилов К. В. Характеристика тварин української чорно-рябої молочної породи за поліморфізмом генів (QTL). *Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С.З. Гжицького*. 2010. Т. 12, № 2 (44). С. 98–103.
81. Топиха В. С., Крамаренко С. С., Луговой С. И. Оценка неравновесия по сцеплению и эффекта «Bottleneck» по локусам микросателлитов ДНК в разводимых в Украине популяциях свиней. *Свинарство. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Інституту свинарства і АПВ НААН*. 2012. Вип. 61. С. 57–61.
82. Березовський О. В., Полупан Ю. П., Рубан С. Ю., Копилов К. В. Зв'язок поліморфізму за генами *k-CN*, *TG5*, *LEP* з молочною продуктивністю корів українських молочних порід. *Розведення і генетика тварин*. 2015. Вип. 49. С. 154–164.
83. Шельов А. В. Поліморфізм мікросателітних локусів ДНК у різних видів сільськогосподарських тварин. *Розведення і генетика тварин*. 2015. Вип. 50. С. 183–190.
84. Саранцева Н. К., Балацький В. М., Нор В. Ю., Олійниченко Є. К. Генетико-популяційне обґрунтування доцільності використання *LEPR* (с.232Т>А) у вітчизняній маркерної селекції великої білої і миргородської порід свиней. *Розведення і генетика тварин*. 2016. Вип. 52. С. 176–181.
85. Метлицька О. І., Копилова К. В. Поліморфізм мітохондріальної ДНК для оцінки генетичної структури і підвидової класифікації українських бджіл. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2012. № 2. С. 113–117.
86. Метлицька О. І., Копилов К. В., Березовський О. В. Сучасні молекулярно-генетичні підходи для підвищення ефективності селекційного

процесу в тваринництві України. *Розведення і генетика тварин*. 2016. Вип. 51. С. 193–200.

87. Копилова К. В., Подоба Ю. В., Почерняев К. Ф., Подоба Л. В., Россоха В. І. Використання мітохондріальної ДНК у молекулярно-генетичному аналізі походження тварин великої рогатої худоби. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2011. № 105. С. 79–85.

88. Подоба Б. Є. Генетичні дослідження: здобутки, сучасний стан та перспективи розвитку. *Розведення і генетика тварин*. 2012. Вип. 46. С. 59–63.

89. Рубан С. Ю., Федота О. М. Напрями організації селекційної роботи в молочному та м'ясному скотарстві України. *Розведення і генетика тварин*. 2013. Вип. 47. С. 5–13.

90. Матюков В. С., Тырина Ю. О., Кантанен Ю., Столповский Ю. А. О генетических особенностях и селекционной ценности местного скота (на примере холмогорской породы). *Сельскохозяйственная биология*. 2013. № 2. С. 19–30.

91. Долматова И. Ю., Валитов Ф. Р. Оценка генетического потенциала крупного рогатого скота по маркерным генам. *Вестник Башкирского университета*. 2015. Т. 20, № 3. С. 850–853.

92. Василюк О. Я., Гридюшко И. Ф., Гридюшко Е. С., Лобан Н. А. Продуктивность свиней материнских пород по комплексу молекулярно-генетических маркеров, детерминирующих воспроизводительные качества. *Зоотехническая наука Белоруссии*. 2016. Т. 1 (ч. 1). С. 11–22.

93. Зиновьева Н. А., Гладырь Е. А. Генетическая экспертиза сельскохозяйственных животных: применение тест-систем на основе микросателлитов. *Достижения науки и техники АПК*. 2011. № 09. С. 19–20.

94. Глазко В. И. Геномная селекция крупного рогатого скота: исследовательские и прикладные задачи. *Известия ТСХА*. 2011. Вып. 5. С. 126–135.

95. Шендаков А. И. Результаты комплексной оценки биологических параметров в селекции сельскохозяйственных животных. *Вестник Орел ГАУ*. 2012. № 6 (39). С. 53–63.
96. Зиновьева Н. А. Молекулярно-генетические методы и их использование в свиноводстве. *Достижения науки и техники АПК*. 2008. № 10. С. 34–36.
97. Киселева Т. Ю., Подоба Б. Е., Заблудовский Е. Е., Терлецкий В. П., Воробьев Н. И., Кантанен Ю. Анализ 30 микросателлитных маркеров у шести популяций крупного рогатого скота. *Сельскохозяйственная биология*. 2010. № 6. С. 20–25.
98. Крюков В. И., Пикунова А. В., Друшляк Н. Г. Использование ДНК маркеров в селекции свиней. *Вестник Орел ГАУ*. 2011. № 1. С. 36–40.
99. Сулимова Г. Е., Лазебная И. В., Перчун А. В., Воронкова В. Н., Рузина М. Н., Бадин Г. А. Уникальность Костромской породы крупного рогатого скота с позиции молекулярной генетики. *Достижения науки и техники АПК*. 2011. № 09. С. 52–54.
100. Кисилева Т. Ю., Kantanen J., Воробьев Н. И., Подоба Б. Е., Терлецкий В. П. Неравновесие по сцеплению микросателлитных локусов у шести локальных популяций крупного рогатого скота. *Генетика*. 2014. Т. 50, № 4. С. 464–473.
101. Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наукова думка, 1983. 560 с.
102. Солбриг О., Солбриг Д. Популяционная биология и эволюция / пер. с англ. Т. И. Штилькин. Москва: Мир, 1982. 488 с.
103. Notter D. R. The Importance of Genetic Diversity in Livestock Populations of the Future. *J. Anim. Sci.* 1999. Vol. 77. P. 61–69.
104. Клаг У. С., Каммингс М. Р. Основы генетики / пер. с англ. А. А. Лушникова, С. М. Мусаткин. Москва: Техносфера, 2007. 896 с.
105. Eltanany M., Distil O. Genetic diversity and genealogical origins of domestic chicken. *World's Poultry Science Journal*. 2010. Vol. 66. P. 715–726.

106. Ройтер Я. С. Использование генофонда сельскохозяйственной птицы в селекционной работе. *Птица и птицепродукты*. 2016. № 3. С. 45–47.
107. Semik E., Krawczyk J. The state of poultry genetic resources and genetic diversity of hen populations. *Ann. Anim. Sci.* 2011. Vol. 11 (2). P.181–191.
108. Селекційні, генетичні та біотехнологічні методи удосконалення і збереження генофонду порід сільськогосподарських тварин / за ред.: М. В. Гладій, Ю. П. Полупан. Полтава: ТОВ «Фірма Техсервіс», 2018. 791 с.
109. Баранов А. В. Проблемы сохранения биоразнообразия в животноводстве. *Достижения науки и техники АПК*. 2011. № 9. С. 21–22.
110. Столповский Ю. А. Популяционно-генетические основы сохранения генофондов domesticированных видов животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. № 17 (4/2). С. 900–915.
111. Паронян И. А. Основные аспекты сохранения, восстановления и использования малочисленных и редких пород кур. *Генетика и разведение животных*. 2014. № 3. С. 43–48.
112. Резникова Н. Л. Навіщо нам аборигенні породи? *Розведення і генетика тварин*. 2017. Вип. 53. С. 50–61.
113. Loewe L., Hill W. G. The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. *Phil. Trans. R. Soc.* 2010. Vol. 365. P. 1153–1167.
114. Voet D., Voet J. G. *Biochemistry*. New York: Wiley & Sons, 2010. 1248 p.
115. Single nucleotide polymorphisms. *Methods and protocols* / ed. A. A. Komar. New York: Humana press, 2009. 478 p.
116. *Poultry genetics, breeding, and biotechnology* / ed.: W. M. Muir, S. E. Aggrey. Wallingford: CABI publishing, 2003. 744 p.
117. Cheng S. Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends in endocrinology and metabolism*. 2005. Vol. 16, No. 14. P. 176–182.

118. Ishida T. Effects of Point Mutation on Enzymatic Activity: Correlation between Protein Electronic Structure and Motion in Chorismate Mutase Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Vol. 132. P. 7104–7118.

119. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn. J. Genet.* 1991. Vol. 66. P. 367–386.

120. Mullaney J. M., Mills R. E., Pittard W. S., Devine S. E. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Human Molecular Genetics*. 2010. Vol. 19. Review Issue 2. P. R131–R136.

121. Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*. 1987. Vol. 235. P. 1616–1622.

122. Nakamura Y., Carlson M., Krapcho K., Kanamori M., White R. New approach for isolation of VNTR markers. *Am. J. Hum. Genet.* 1988. Vol. 48. P. 854–859.

123. Ramel C. Mini- and microsatellites. *Environmental health perspectives*. 1997. Vol. 105. P. 781–789.

124. Debrauwere H., Gendrel C. G., Lechat S., Dutreix M. Differences and similarities various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites. *Biochimie*. 1997. Vol. 79. P. 577–586.

125. Wright J. M. Mutation at VNTRs: are minisatellites the evolutionary progeny of microsatellites? *Genome*. 1994. Vol. 37. P. 345–347.

126. Mittal N., Dubey A. K. Microsatellite markers – a new practice of DNA based markers in molecular genetics. *Phcog. Rev.* 2009. Vol. 3 (6). P. 235–246.

127. Зиновьева Н. А., Кленовицкий П. М., Гладырь Е. А., Никишов А. А. Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификация племенного материала в животноводстве: учебное пособие. Москва: РУДН, 2008. 329 с.

128. Dodgson J. B., Cheng H. H., Okimoto R. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science*. 1997. Vol. 76. P. 1108–1114.

129. Teneva A. Molecular markers in animal genome analysis. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 2009. Vol. 25. P. 1267–1284.

130. Fulton J. E. Molecular genetics in a modern poultry breeding organization. *World's poultry science journal*. 2008. Vol. 64. P. 171–176.

131. Mohamed L. DNA markers and their application in animal genetics: an overview. *The Sudan J. Vet. Res.* 2006. Vol. 21. P. 1–13.

132. Duran C., Appleby N., Edwards D., Batley J. Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualization. *Current bioinformatics*. 2009. Vol. 4. P. 16–27.

133. Liua Z. J., Cordes J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*. 2004. Vol. 238. P. 1–37.

134. Beuzen N. D., Stear M. J., Chang K. C. Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*. 2000. Vol. 160. P. 42–52.

135. Wakchaure R., Ganguly S., Para P. A., Praveen P. K., Qadri K. Molecular Markers and their Applications in Farm Animals: A Review. *International Journal of Recent Biotechnology*. 2015. Vol. 3 (3). P. 23–29.

136. Подстрешный А. П. Перспективы использования молекулярно-генетических маркеров в птицеводстве. *Обзор статей по материалам XXII Всемирного конгресса по птицеводству*. 2005. С. 27–34.

137. Метлицька О. І., Копилов К. В. Для ефективної селекції тварин важливо керуватися генетичною структурою. *Тваринництво України*. 2010. № 4. С. 8–11.

138. Копилова К. В. Молекулярно-генетичні маркери в системі збереження біорізноманіття сільськогосподарських тварин: дис. ... д-ра с.-г. наук: 03.00.15 / Ін-т розведення і генетики тварин. Чубинське, 2012. 307 с.

139. Метлицька О. І. Методологія ДНК-паспортизації генофондів сільськогосподарських тварин за гіперваріабельними локусами геному: дис. ... д-ра с.-г. наук: / Ін-т свинарства і агропром. вир-ва. Полтава, 2012. 376 с.

140. Montaldo H. H., Meza-Herrera C. A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1998. Vol. 1, № 2. P. 83–89.
141. Al-Samarai F. R., Al-Kazaz A. A. Molecular Markers and Its Applications in Animal Breeding: A review. *American Journal of Applied Scientific Research*. 2015. Vol. 1, № 1. P. 1–5.
142. Kumar N. S., Gurusubramanian G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci Vis*. 2011. Vol. 11 (3). P. 116–124.
143. Mollah M. B. R., Islam F. B., Islam M. S., Ali M. A., Alam M. S. Analysis of genetic diversity in Bangladeshi chicken using RAPD markers. *Biotechnology*. 2009. Vol. 8 (4). P. 462–467.
144. Calvo J. H., Zaragoza P., Osta R. Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pate. *Poultry science*. 2001. Vol. 80. P. 522–524.
145. Monira K. N., Islam M. N., Khatum R., Ashmed S. Genetic relationship and similarity of some selected chicken strains. *J. Bangladesh Agril. Univ*. 2011. Vol. 9 (2). P. 217–220.
146. Ahlawat S. P., Sunder J., Kundu A., Chatterjee R. N., Rai R. B., Kumar B., Senani S., Saha S. K., Yadav S. P. Use of RAPD-PCR for genetic analysis of Nicobari fowl of Andamans. *British Poultry Science*. 2004. Vol. 45, № 2. P. 194–200.
147. Olowofeso O., Wang J. Y., Zhang P., Dai G. J., Sheng H. W., Wu R., Wu X. Genetic Analysis of Haimen Chicken Populations Using Decamer Random Markers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 2006. Vol. 19, № 11. P. 1519–1523.
148. Pipalia D. L., Joshi C. G., Khanna K., Rank D. N., Thakkar K. M., Brahmkshtri B. P., Solanki J. V. RAPD profiling of Bantam, White Leghorn and Bantamised White Leghorn birds. *Indian Journal of Poultry Science*. 2006. Vol. 41 (2). P. 111–114.

149. Abdulrazaq H. S., Suliaman N. M. Polymorphism between five local chicken in Erbil using RAPD markers. *ZANCO Journal of Pure and Applied Sciences*. 2016. Vol. 28 (1). P. 65–69.
150. Tunca R. I., Bilgen G. Estimation of Genetic Distance in Meat and Layer Pure Lines Using Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2002. Vol. 26. P. 1117–1120.
151. Okumus A., Kaya M. Genetic similarity by RAPD between pure lines of chickens. *Journal of biological sciences*. 2005. Vol. 5 (4). P. 424–426.
152. Fadhil I., Dakheel M. H., Hussein T. H. Detection of Genetic Diversity through Two Poultry Breeds by using RAPD-PCR Technique. *Journal of Babylon University Pure and Applied Sciences*. 2016. Vol. 24, № 9. P. 2661–2668.
153. Basha H. A., Naby A., Heikal H. S. M. Genetic diversity and phylogenetic relationship among three duck breeds and geese using RAPD markers. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2016. Vol. 4 (9). P. 462–467.
154. Yap F. C., Yan Y. J., Loon K. T., Zhen J. L., Kamau N. W., Kumaran J. V. Phylogenetic Analysis of Different Breeds of Domestic Chickens in Selected Area of Peninsular Malaysia Inferred from Partial Cytochrome b Gene Information and RAPD Markers. *Animal Biotechnology*. 2010. Vol. 21. P. 226–240.
155. Roussan D. A., Zakaria H., Khawaldeh G., Shaheen I. Differentiation of Avian Pathogenic Escherichia coli Strains from Broiler Chickens by Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) and Random Amplified Polymorphic (RAPD) DNA. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 2014. Vol. 4. P. 211–219.
156. Reinosoa E., Betteraa S., Frigerio C., DiRenzo M., Calzolari A., Boqni C. RAPD-PCR analysis of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine and human hosts. *Microbiological Research*. 2004. Vol. 159. P. 245–255.
157. Ляшенко Ю. В. Оцінка рівня генетичної мінливості у вітчизняних породних групах сірих та глинястих качок з використання RAPD-маркерів. *Сучасне птахівництво*. 2015. № 10 (155). С. 16–18.

158. Ляшенко Ю. В. Методичні аспекти використання RAPD-технології для дослідження геномного поліморфізму гусей української селекції. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2015. № 114. С. 83–90.

159. Bhagyawant S. S. RAPD-SCAR Markers: An Interface Tool for Authentication of Traits. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2016. Vol. 4. P. 1–9.

160. Dhanya K., Syamkumar S., Siju S., Sasikumar B. Sequence characterized amplified region markers: A reliable tool for adulterant detection in turmeric powder. *Food Research International*. 2011. Vol. 44 (9). P. 2889–2895.

161. Xu M., Huaracha E., Korban S. S. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the Vf gene in apple. *Genome*. 2001. Vol. 44 (1). P. 63–70.

162. Ogawa A., Murata K., Mizuno S. The location of Z- and W-linked marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosomes of the ostrich and the emu. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. Vol. 95. P. 4415–4418.

163. Hinckley J. D., Park R. L., Xiong S., Andersen W. R., Kooyman D. L. Identification and development of sex specific DNA markers in the ostrich using polymerase chain reaction. *International journal of poultry science*. 2005. Vol. 4 (9). P. 663–669.

164. Malago W., Medaglia A., Matheucci E., Henrique-Silva F. New PCR multiplexes for sex typing of ostriches. *Braz. J. Biol.* 2005. Vol. 65 (4). P. 743–745.

165. Wu C. P., Horng Y. M., Yang K. T., Huang C. W., Huang M. C. Female-specific DNA sequences in ostriches. *Molecular and cellular probes*. 2006. Vol. 20. P. 307–310.

166. 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.

167. 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.

168. Ye C., Yu Z., Kong F., Wu S., Wang B. R-ISSR as a new tool for genomic fingerprinting, mapping, and gene tagging. *Plant molecular biology reporter*. 2005. Vol. 23. P. 167–177.

169. Bornet B., Branchard M. Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related Brassica taxa and Arabidopsis thaliana. *Hereditas*. 2004. Vol. 140. P. 245–248.

170. Tunca R. I., Taskin A. A comparison of genetic variations among native and some local chicken populations in Turkey. *Indian J. Anim. Res.* 2016. Vol. 50 (5). P. 652–657.

171. Eissa E. A., Farahat G. S., Mahmoud B. Y., El-Full E. A. Productive traits and molecular genetics characterization (RAPD and ISSR) of selected long shank length and control lines in the 6th generation of Japanese quail. *Egypt. J. Genet. Cytol.* 2014. Vol. 43. P. 301–325.

172. Weber J. L., May P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 1989. Vol. 44. P. 388–396.

173. Senan S., Kizhakayil D., Sasikumar B., Sheeja T.E. Methods for development of microsatellite markers: an overview. *Not Sci Biol.* 2014. Vol. 6 (1) P. 1–13.

174. Cregan P. B., Bhagwat A. A., Akkaya M. S., Rongwen J. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. *Methods in molecular and cellular biology*. 1994. Vol. 5. P. 49–61.

175. Arif I. A., Khan H. A., Shobrak M., Al Homaidan A. A., Al Sadoon M., Al Farhan A. H., Bahkali A. H. Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the Arabian Oryx. *Genetics and Molecular Research*. 2010. Vol. 9 (1). P. 259–265.

176. Schlotterer C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature reviews: genetics*. 2004. Vol. 5. P. 63–69.

177. Rajendrakumar P., Biswal A. K., Balachandra S. M., Srinivasarao K., Sundaram R. M. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics*. 2007. Vol. 23. P.1–4.
178. Li Y., Korol A. B., Fahima T., Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 2004. Vol. 21 (6). P. 991–1007.
179. Miret J. J., Pessoa-Brandá L., Lahue R. S. Instability of CAG and CTG Trinucleotide Repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 1997. Vol. 17, No. 6. P. 3382–3387.
180. Животовский Л. А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения. *Вестник ВОГиС*. 2006. Т. 10, № 1. С. 74–96.
181. FAO. 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO animal production and health guidelines. No. 9. Rome, Italy. URL: <http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf> (Last accessed: 25.10.2017).
182. Measurement of domestic animal diversity (MoDAD): new recommended microsatellite markers. New microsatellite marker sets – recommendations of joint ISAG/FAO standing committee. 2004. URL: <http://www.fao.org/3/a-aq569e.pdf> (Last accessed: 25.10.2017).
183. Рубцова Г. А., Пономарева Е. В., Афанасьев К. И., Шайхаев Е. Г., Холодова М. В., Павлов С. Д., Животовский Л. А. Выявление аллельных вариантов микросателлитных маркеров методами капиллярного и традиционного электрофореза. *Генетика*. 2016. Т. 52, № 4. С. 482–487.
184. Smith J. S. C., Chin E. C. L., Shu H. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree. *Theor Appl Genet*. 1997. Vol. 95. P. 163–173.
185. Chistiakov D. A., Hellemans B., Volckaert F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 2006. Vol. 255. P. 1–29.
186. Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R., Dhawan A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 2011. Vol. 177. P. 309–334.

187. Шкавро Н. М., Россоха В. І., Радко А. Аналіз генетичної структури м'ясних порід великої рогатої худоби на основі використання мікросателітних маркерів ДНК. *Науково-технічний бюлетень ІТ НААН*. 2009. № 99. С. 129–135.

188. Луговий С. І. Оцінка внутрішньопородної мінливості української м'ясної породи свиней за локусами мікросателітів ДНК. *Збірник наукових праць ВНАУ*. 2013. Вип. 2 (72). С. 109–114.

189. Чокан Т. В., Радко А., Тарасюк С. І., Шумець А., Рубіс Д. Генетична структура української гірськокарпатської породи овець за використання мікросателітних локусів. *Розведення і генетика тварин*. 2016. № 51. С. 225–230.

190. Мохначова Н. Б. Застосування мікросателітних маркерів для генотипування великої рогатої худоби. *Розведення і генетика тварин*. 2008. Вип. 42. С. 198–203.

191. Новгородова И. П., Фисинин В. И., Зиновьева Н. А., Гладырь Е. А., Михайлов М. В., Ройтер Я. С., Брем Г. Исследование информативности мультиплексных тест-систем анализа микросателлитов кур с различным числом локусов. *Достижения науки и техники АПК*. 2012. № 08. С. 62–65.

192. Новгородова И. П., Зиновьева Н. А., Гладырь Е. А., Фисини В. Е. Анализ генетического разнообразия декоративных пород кур на основе микросателлитных маркеров. *Достижения науки и техники АПК*. 2016. Т. 30, № 1. С. 69–71.

193. Muchadeyi F., Eding H., Wollny C., Groeneveld E., Makuza S. M., Shamseldin R., Simianer H., Weigend S. Absence of population substructuring in Zimbabwe chicken ecotypes inferred using microsatellite analysis. *Animal Genetics*. 2007. Vol. 38, No. 4. P. 332–339.

194. Gholizadeh M., Mianji G. R. Use of microsatellite markers in poultry research. *International Journal of Poultry Science*. 2007. Vol. 6 (2). P. 145–153.

195. Wardecka B., Olszewski R., Jaszczak K., Zieba G., Pierzchala M., Wicinska K. Relationship between microsatellite marker alleles on chromosomes 1-5 originating from the Rhode Island Red and Green-legged Partridge breeds and

egg production and quality traits in F2 mapping population. *J. Appl. Genet.* 2002. Vol. 43 (3). P. 319–329.

196. Loywyck V., Bed'hom B., Pinard-van der Laan M. H., Pitel F., Verrier E., Bijma P. Evolution of the polymorphism at molecular markers in QTL and non-QTL regions in selected chicken lines. *Genet. Sel. Evol.* 2008. Vol. 40. P. 639–661.

197. McElroy J. P., Dekkers J. C., Fulton J. E., O'Sullivan N. P., Soller M., Lipkin E., Zhang W., Koehler K. J., Lamont S. J., Cheng H. H. Microsatellite Markers Associated with Resistance to Marek's Disease in Commercial Layer Chickens. *Poultry Science.* 2005. Vol. 84. P. 1678–1688.

198. Bumstead N. Genomic mapping of resistance to Marek's disease. *Avian Pathology.* 1998. Vol. 27. P. S78–S81.

199. Roberts R. J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A. S., Bickle T. A., Bitinaite J., Blumenthal R. M., Degtyarev S. Kh., Dryden D. T., Dybvig K., Firman K., Gromova E. S., Gumport R. I., Halford S. E., Hattman S., Heitman J., Hornby D. P., Janulaitis A., Jeltsch A., Josephsen J., Kiss A., Klaenhammer T. R., Kobayashi I., Kong H., Krüger D. H., Lacks S., Marinus M. G., Miyahara M., Morgan R. D., Murray N. E., Nagaraja V., Piekarowicz A., Pingoud A., Raleigh E., Rao D. N., Reich N., Repin V. E., Selker E. U., Shaw P. C., Stein D. C., Stoddard B. L., Szybalski W., Trautner T. A., Van Etten J. L., Vitor J. M., Wilson G. G., Xu S. Y. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research.* 2003. Vol. 31, No. 7. P. 1805–1812.

200. Ota M., Fukushima H., Kulski J. K., Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature protocols.* 2007. Vol. 2, No. 11. P. 2857–2864.

201. Okhravi N., Adamson P., Matheson M. M., Towler H. M., Lightman S. PCR-RFLP-Mediated Detection and Speciation of Bacterial Species Causing Endophthalmitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2000. Vol. 41, No. 6. P. 1438–1447.

202. Sato T., Sato M., Matsuyama J., Hoshino E. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Genes Coding for 16s rRNA in *Veillonella* spp. *International journal of systematic bacteriology*. 1997. Vol. 47, No. 4. P. 1268–1270.
203. Nathans D., Smith H. O. Restriction endonuclease in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 1975. Vol. 44. P. 273–293.
204. Yuan R. Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. *Annu. Rev. Biochem.* 1981. Vol. 50. P. 285–315.
205. Gasser R. B., Hu M., Chilton N. B., Campbell B. E., Jex A. J., Otranto D., Cafarchia C., Beveridge I., Zhu X. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols*. 2006. Vol. 1, No. 6. P. 3121–3128.
206. Niraj D. K., Kumar P., Mishra C., Narayan R., Bhattacharya T. K., Shrivastava K., Bhushan B., Kumar A. Single nucleotide polymorphism mining and nucleotide sequence analysis of Mx1 gene in exonic regions of Japanese quail. *Veterinary World*. 2015. Vol. 8, No. 12. P. 1435–1443.
207. Muhagheh M. D., Goswami S. L., De S. Single strand conformation polymorphism (SSCP) in 3' region of growth hormone gene in five breeds of Indian buffalo. *Animal Science Papers and Reports*. 2006. Vol. 24. P. 159–162.
208. Farag I. M., Darwish A. M., Darwish H. R., AbdelAziz K. B., Ramadan W. A., Mohamed M. I., Othman O. E. Polymorphism of growth hormone gene and its association with wool traits in Egyptian sheep breeds. *African Journal of Biotechnology*. 2016. Vol. 15, No. 14. P. 549–556.
209. Wu X., Yan M. J., Lian S. Y., Liu X. T., Li A. GH gene polymorphisms and expression associated with egg laying in Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Hereditas*. 2014. Vol. 151. P. 14–19.
210. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natd. Acad. Sci. USA*. 1989. Vol. 86. P. 2766–2770.
211. Humphries S. E., Gudnason V., Whittall R. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation

detection in familial hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry*. 1997. Vol. 43, No. 3. P. 427–435.

212. Larsen L. A., Jespersgaard C., Andersen P. S. Single-strand conformation polymorphism analysis using capillary array electrophoresis for large-scale mutation detection. *Nature Protocols*. 2007. Vol. 2, No. 6. P. 1458–1466.

213. Kobak P., Sablik P., Zukiewicz A., Syczewski A., Lechowicz W. Analysis of indel polymorphism of the PRNP gene in water buffalo, *Bubalus bubalis*. *Acta Sci. Pol., Zootechnica*. 2014. Vol. 13 (1). P. 51–56.

214. Lumatauw S., Mu'in M. A. A 24-bp Indel (Insertion-Deletion) Polymorphism in Promoter Prolactin Gene of Papua Local Chickens. *Animal Production*. 2016. Vol. 18 (1). P. 1–7.

215. Meng H. T., Zhang Y. D., Shen C. M., Yuan G. Y., Yang C. H., Jin R., Yan J. W., Wang H. D., Liu W. J., Jing H., Zhu B. F. Genetic polymorphism analyses of 30 InDels in Chinese Xibe ethnic group and its population genetic differentiations with other groups. *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5 (8260). P. 1–6.

216. Mullaney J. M., Mills R. E., Pittard W. S., Devine S. E. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Human Molecular Genetics*. 2010. Vol. 19. (2). P. R131–R136.

217. Bhangale T. R., Rieder M. J., Livingston R. J., Nickerson D. A. Comprehensive identification and characterization of diallelic insertion–deletion polymorphisms in 330 human candidate genes. *Hum. Mol. Genet.* 2005. Vol. 14. P. 59–69.

218. Brandstrom M., Ellegren H. The Genomic Landscape of Short Insertion and Deletion Polymorphisms in the Chicken (*Gallus gallus*) Genome: A High Frequency of Deletions in Tandem Duplicates. *Genetics*. 2007. Vol. 176. P. 1691–1701.

219. Rao Y. S., Wang Z. F., Chai X. W., Wu G. Z., Nie Q. H., Zhang X. Q. Indel segregating within introns in the chicken genome are positively correlated with the recombination rates. *Hereditas*. 2010. Vol. 147. P. 53–57.

220. Griffiths R., Double M. C., Orr K., Dawson R. J. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*. 1998. Vol. 7. P. 1071 – 1075.
221. Dubiec A., Zagalska-Neubauer M. Molecular techniques for sex identification in birds. *Biological let.* 2006. Vol. 43 (1). P. 3–12.
222. Cerit H., Avanus K. Sex Determination by CHDW and CHDZ Genes of Avian Sex Chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2007. Vol. 31 (6). P. 371–374.
223. Kahn N. W., John J. S. T., Quinn T. W. Chromosome-specific Intron Size Differences in the Avian CHD Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds. *The Auk*. 1998. Vol. 115 (4). P. 1074–1078.
224. Ellegren H. Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z or W? *EMBO*. 2001. Vol. 2. P. 192–196.
225. Cerit H., Avanus K. Sex identification in avian species using DNA typing methods. *World's Poultry Science Journal*. 2007. Vol. 63. P. 91–99.
226. Saxena V. K., Sachdev A. K., Gopal R., Pramod A. B. Roles of important candidate genes on broiler meat quality. *World's Poultry Sci. J.* 2009. Vol. 65. P. 37–50.
227. Mehdi A., Ali Reza F. Single nucleotide polymorphisms in intron 1 of growth hormone gene and it's association with economic important traits in Iranian Fars native fowl. *Annals of biological research*. 2012. Vol. 3 (8). P. 4028–4032.
228. Hassanane M. S., Alam S. S., Ajang O. A., Mohamed K. A. B., Sid-Ahmed S. E., Abdoon S. Genetic polymorphism of GH; PIT1 and PRLR genes in six lines of Sudanese chickens. *International journal of biosciences and technology*. 2017. Vol. 10 (6). P. 43–52.
229. Kansaku N., Hiyama G., Sasanami T., Zadqorny D. Prolactin and growth hormone in birds: protein structure, gene structure and genetic variation. *The journal of poultry science*. 2008. Vol. 45. P. 1–6.
230. Kim J. W. The endocrine regulation of chicken growth. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2010. Vol. 23, No. 12. P. 1668–1676.

231. Scanes C. G. Ontogeny of the hypothalamic-pituitary (Growth Hormone)-Insulin-Like Growth Factor-I axis in birds. *Amer. Zool.* 1997. Vol. 37. P. 524–535.

232. Teran E., Chesner J., Rapaport R. Growth and growth hormone: an overview. *Growth horm. IGF res.* 2016. Vol. 28. P. 3–5.

233. Kuhnlein U., Ni L., Weigend S., Gavora J. S., Fairfull W., Zadworny D. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. *Animal Genetics.* 1997. Vol. 28. P. 116–123.

234. Feng X. P., Kuhnlein U., Aggrey S. E., Gavora J. S., Zadworny D. Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain. *Poultry Science.* 1997. Vol. 76. P. 1770–1775.

235. Mu'in M. A., Lumatauw S. Identification of MspI polymorphism in the forth intron of chicken growth hormone gene and their associations with growth traits in Indonesia native chickens. *Animal production.* 2013. Vol. 15 (1). P. 1–7.

236. Liu H. C., Kung H. J., Fulton J. E., Morgan R. W., Cheng H. H. Growth hormone interacts with the Marek's disease virus SORF2 protein and its associated with disease resistance in chicken. *Proc. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98 (16). P. 9203–9208.

237. Ip S. C. Y., Zhang X., Leung F. C. Genomic growth hormone gene polymorphisms in native Chinese chickens. *Exp Biol Med.* 2001. Vol. 226 (5). P. 458–462.

238. Nie Q., Sun B., Zhang D., Luo C., Ishaq N. A., Lei M., Yang G., Zhang X. High diversity of the Chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. *Journal of Heredity.* 2005. Vol. 96 (6). P. 698–703.

239. Nie Q., Ip S. C. Y., Zhang X., Leung F. C., Yang G. New Variations in Intron 4 of Growth Hormone Gene in Chinese Native Chickens. *The Journal of Heredity.* 2002. Vol. 93 (4). P. 277–279.

240. Yan B., Deng X., Fei J., Hu X., Wu C., Li N. Single nucleotide polymorphism analysis in chicken growth hormone gene and its associations with

growth and carcass traits. *Chinese Science Bulletin*. 2003. Vol. 48, No. 15. P. 1561–1564.

241. Nie Q., Lei M., Ouyang J. Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. *Genetics Selection Evolution*. 2005. Vol. 37 (3). P. 339–360.

242. Thakur M. S., Parmar S. N. S., Tolankhomba T. C., Srivastava P. N., Joshi C. G., Rank D. N., Solanki J. V., Pillai P. V. A. Growth hormone gene polymorphism in Kadaknath breed of poultry. *Indian journal of biotechnology*. 2006. Vol. 5. P. 189–194.

243. Zhang X. L., Jiang X., Liu Y. P., Du H. R., Zhu Q. Identification of AVal polymorphisms in the third intron of GH gene and their associations with abdominal fat in chickens. *Poultry Science*. 2007. Vol. 86. P. 1079–1083.

244. Lei M., Luo C., Peng X., Fanq M., Nie Q., Zhang D., Yang G., Zhang X. Polymorphism of growth-correlated genes associated with fatness and muscle fiber traits in chickens. *Poultry Science*. 2007. Vol. 86. P. 835–842.

245. Enayati B., Rahimi-Mianji G. Genomic growth hormone, growth hormone receptor and transforming growth factor b-3 gene polymorphism in breeder hens of Mazandaran native fowls. *African Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 8 (14). P. 3154–3159.

246. Alireza D., Jamal F., Hedayatolla R., Taghi N. M. Investigation of growth hormone gene polymorphism using PCR-RFLP technique in native poultry in Khuzestan province. *Journal of animal and veterinary advances*. 2010. Vol. 9 (2). P. 255–257.

247. Jafari A., Pakdel A., Esmailkhanian S. Growth hormone gene polymorphism in two Iranian native fowls (short communication). *Poultry Science Journal*. 2015. Vol. 3 (1). P. 99–104.

248. Ghormade V., Parmar S. N. S., Shrivastava K. Association of growth and egg production traits with genetic marker in Kadaknath and Kadaknath cross birds. *Life Science Bulletin*. 2012. Vol. 9 (1). P. 76–78.

249. Makhsous S. G., Mirhoseini S. Z., Zamiri M. J., Niazi A. Polymorphisms of growth hormone gene in a native chicken population: association with egg production. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2013. Vol. 57. P. 73–77.

250. Su Y. J., Shu J. T., Zhang M., Shan Y. J., Li G. H., Yin J. M., Song W. T., Li H. F., Zhao G. P. Association of chicken growth hormone polymorphisms with egg production. *Genetics and Molecular Research*. 2014. Vol. 13 (3). P 4893–4903.

251. Anh N. T. L., Kunhareang S., Duangjinda M. Association of chicken growth hormones and insulin-like growth factor gene polymorphisms with growth performance and carcass traits in Thai broilers. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2015. Vol. 28. No. 12. P. 1686–1695.

252. Vu C. T., Ngu N. T. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with egg production traits in native noi chicken of Vietnam. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 2016. Vol. 6 (1). P. 162–169.

253. Ghelghachi A. A., Seyedabadi H., Lak A. Association of growth hormone gene polymorphism with growth and fatness traits in Arian broilers. *International Journal of Biosciences*. 2013. Vol. 3, No. 12. P. 216–220.

254. Shafey H. I., Aboelhassan M. D., El-Komy E. M., Abd El-Karim R. E., Mahrous K. F. SNP of cGH gene in Egyptian chicken breeds at MspI site. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2017. Vol. 14 (1). P. 33–41.

255. Saikhom R., Sahoo A. K., Taraphder S., Pan S., Sarkar U., Ghosh P. R., Bhattacharya D., Baidya S. Polymorphisms of growth hormone gene in Haringhata black chicken. *Explor. Anim. Med. Res.* 2017. Vol. 7 (1). P. 42–47.

256. Ouyang J. H., Xie L., Nie Q., Luo C., Liang Y., Zenq H., Zhang X. Single nucleotide polymorphism (SNP) at the GHR gene and its associations with chicken growth and fat deposition traits. *British Poultry Science*. 2008. Vol. 49 (2). P. 87–95.

257. Waters M. J. The growth hormone receptor. *Growth. Horm. IGF Res.* 2016. Vol. 28. P. 6–10.

258. Kuhn E. R., Vleurick L., Edery M., Decuypere E., Darras V. M. Internalization of the chicken growth hormone receptor complex and its effect on

biological functions. *Comparative biochemistry and physiology*. 2002. Part B 132. P. 299–308.

259. Tsukada A., Ohkubo T., Sakaguchi K., Tanaka M., Nakashima K., Hayashida Y., Wakita M., Hoshino S. Thyroid hormones are involved in insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by stimulating hepatic growth hormone receptor (GHR) gene expression in the chicken. *Growth hormone and IGF research*. 1998. Vol. 8. P. 235–242.

260. Rahimi G. Characterization of GH, GHR and IGF-I in broiler lines selected for rapid growth or improved feed efficiency. *International journal of poultry science*. 2005. Vol. 4 (7). P. 476–481.

261. Postel-Vinay M. C., Finidori J. Growth hormone receptor: structure and signal transduction. *European journal of endocrinology*. 1995. Vol. 133. P. 654–659.

262. Brooks A. J., Wooh J. W., Tunny K. A., Waters M. J. Growth hormone receptor; mechanism of action. *The International journal of biochemistry and cell biology*. 2008. Vol. 40. P. 1984–1989.

263. Li H., Zhu W., Chen K., Wu X., Tang Q., Gao Y. Associations between GHR and IGF-1 gene polymorphisms, and reproductive traits in Wenchang chickens. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*. 2008. Vol. 32 (4). P. 281–285.

264. Khoa D. V. A., Khang N. T. K., Ngu N. T., Matey J., Loan H. T. P., Thuy N. T. D. Single nucleotide polymorphisms in Gh, Ghr, Ghsr and insulin candidate genes in chicken breeds of Vietnam. *Greener Journal of Agricultural Science*. 2013. Vol. 3 (10). P. 716–724.

265. Dunn I. C., Miao Y. W., Morris A., Romanov M. V., Wilson P. W., Waddington D. A study of association between genetic markers in candidate genes and reproductive traits in one generation of a commercial broiler breeder hen population. *Heredity*. 2004. Vol. 92. P. 128–134.

266. Li H., Zhu W., Chen K., Song W., Shu J., Han W. Effects of the polymorphisms of GHR gene and IGF-1 gene on egg quality in Wenchang chicken. *Research Journal of Poultry Sciences*. 2010. Vol. 3 (2). P. 19–22.

267. Hull K. L., Marsh J. A., Harvey S. A missense mutation in the GHR gene of Cornell sex-linked dwarf chickens does not abolish serum GH binding. *Journal of Endocrinology*. 1999. Vol. 161. P. 495–501.

268. Chen C. F., Chen Y. H., Tixier-Boichard M., Cheng P. Y., Chang C. S., Tang P. C., Lee Y. P. Effects of the chicken sex-linked dwarf gene on growth and muscle development. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2009. Vol. 22, No. 7. P. 937–942.

269. Feng X. P., Kuhnlein U., Fairfull R. W., Aggrey S. E., Yao J., Zadworny D. A genetic marker in the growth hormone receptor gene associated with body weight in chickens. *J. Hered.* 1998. Vol. 89. P. 355–359.

270. Nandedkar P. V., Saxena V. K., Saxena M., Ahmed K. A., Kumar S., Singh R., Jain P., Jawale M. R., Nehete S. B. PCR-RFLP-Gene Study in Musculoskeletal Deformed Birds. *Indian Res. J. Ext. Edu.* (Special issue on Veterinary Research & Extension). 2014. Vol. 14 (4). P. 128–134.

271. Seyyedbabayi M., Seyedabadi H., Gorbani A., Zarghami N. Growth hormone receptor gene polymorphism and its associations with some growth traits in West-Azarbaijan native chicken. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* 2014. Vol 3 (6). P. 140–143.

272. Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol. Pathol.* 2001. Vol. 54 (5). P. 311–316.

273. Cohen P. Overview of the IGF-I system. *Horm. Res.* 2006. Vol. 65. P. 3–8.

274. McMurtry J. P., Francis G. L., Upton Z. Insulin-like growth factors in poultry. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1997. Vol. 14 (4). P. 199–229.

275. Hwa V. Oh Y., Rosenfeld R. G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Reviews*. 1999. Vol. 20 (6). P. 761–787.

276. Khadem A., Hafezian H., Rahimi-Mianji G. Association of single nucleotide polymorphisms in IGF-I, IGF-II and IGFBP-II with production traits in breeder hens of Mazandaran native fowls breeding station. *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 9 (6). P. 805–810.

277. Goudaa E. M., Essawy G. S. Polymorphism of insulin-like growth factor I gene among chicken breeds in Egypt. *Z. Naturforsch.* 2010. Vol. 65 c. P. 284–288.

278. Abbasi H. A., Kazemi M. Detection of polymorphism at the insulin like growth factor-i gene in Mazandaran native chicken using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism method. *American journal of animal and veterinary sciences*. 2011. Vol. 6 (2). P. 80–83.

279. Abbasi H. A., Kazemi M. Detection of polymorphism of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene in Mazandaran native chicken using PCR-RFLP method. *African journal of biotechnology*. 2011. Vol. 10 (61). P. 13351–13354.

280. Promwatee N., Laopaiboon B., Vongpralub T., Phasuk Y., Kunhareang S., Boonkum W., Duangjinda M. Insulin-like growth factor I gene polymorphism associated with growth and carcass traits in Thai synthetic chickens. *Genetics and molecular research*. 2013. Vol. 12 (4). P. 4332–4341.

281. Amills M., Jimenez N., Villalba D., Tor M., Molina E., Cubilo D., Marcos C., Francesch A., Sanchez A., Estany J. Identification of Three Single Nucleotide Polymorphisms in the Chicken Insulin-Like Growth Factor 1 and 2 Genes and Their Associations with Growth and Feeding Traits. *Poultry Science*. 2003. Vol. 82. P. 1485–1493.

282. Li H. F., Zhu W. Q., Chen K. W. Polymorphism in NPY and IGF-I genes associate with reproductive traits in Wenchang chicken. *African Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 8 (19). P. 4744–4748.

283. Li W. IGF-1 gene polymorphism and weight-related analysis. *International journal of biology*. 2009. Vol. 1, No. 2. P. 113–118.

284. Kim M. H., Seo D. S., Ko Y. Relationship between egg productivity and insulin-like growth factor-I genotypes in Korean native Ogol chickens. *Poultry Science*. 2004. Vol. 83. P. 1203–1208.

285. Moe H. H., Shimogiri T., Kawabe K., Nishibori M., Okamoto S., Hashiguchi T., Maeda Y. Genotypic frequency in Asian native chicken populations and gene expression using insulin-like growth factor I (IGFI) gene promoter polymorphism. *J. Poult. Sci.* 2009. Vol. 46. P. 1–5.

286. Nagaraja S. C., Aggrey S. E., Yao J., Zadworny D., Fairfull R. W., Kuhlein U. Trait association of a genetic marker near the IGF-I gene in egg-laying chickens. *J. Hered.* 2000. Vol. 91. P. 150–156.

287. Bhattacharya T. K., Chatterjee R. N., Dushyanth K., Paswan C., Shukla R., Shanmugam M. Polymorphism and expression of insulin-like growth factor 1 (IGF1) gene and its association with growth traits in chicken. *Br. Poult. Sci.* 2015. Vol. 56 (4). P. 398–407.

288. Zhou H., Mitchell A. D., McMurtry J. P., Ashwell C. M., Lamont S. J. Insulin-Like Growth Factor-I Gene Polymorphism Associations with Growth, Body Composition, Skeleton Integrity, and Metabolic Traits in Chickens. *Poultry Science.* 2005. Vol. 84. P. 212–219.

289. Bennett A. K., Hester P. Y., Spurlock D. E. M. Polymorphisms in vitamin D receptor, osteopontin, insulin-like growth factor 1 and insulin, and their associations with bone, egg and growth traits in a layer – broiler cross in chickens. *Animal Genetics.* 2006. Vol. 37. P. 283–286.

290. Bian L. H., Wang S. Z., Wang Q. G., Zhang S., Wang Y. X., Li H. Variation at the insulin-like growth factor 1 gene and its association with body weight traits in the chicken. *J. Anim. Breed. Genet.* 2008. Vol. 125. P. 265–270.

291. Kadlec J., Hosnedlova B., Rehout V., Citek J., Vecerek L., Hanusova L. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism and its association with growth and slaughter characteristics in broiler chickens. *J. Agrobiol.* 2011. Vol. 28 (2). P. 157–163.

292. Yang F., Jin C., Dai G., Xie K., Yu Y., Wang J. Polymorphism in exon 2 of *IGF-IR* gene and their association with production traits in Jinghai yellow chicken. *Journal of animal and veterinary advances.* 2012. Vol. 11 (19). P. 3499–3505.

293. Freeman M. E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological reviews.* 2000. Vol. 80, No. 4. P. 1523–1631.

294. Wilkanowska A., Mazurowski A., Mroczkowski S., Kokoszynski D. Prolactin (PRL) and prolactin receptor (PRLR) genes and their role in poultry production traits. *Folia Biologica*. 2014. Vol. 62, No. 1. P. 1–8.

295. Hrabia A., Paczoska-Eliasiewicz H., Rzasa J. Effect of prolactin on estradiol and progesterone secretion by isolated chicken ovarian follicles. *Folia Biol.* 2004. Vol. 52 (3–4). P. 197–203.

296. Hall T. R., Harvey S., Chadwick A. Control of prolactin secretion in birds: a review. *General and comparative endocrinology*. 1986. Vol. 62. P. 171–184.

297. Youngren O. M., El Halawani M., Silsby J., Phillips R. E. Intracranial prolactin perfusion induces incubation behavior in turkey hens. *Biology of reproduction*. 1991. Vol. 44. P. 425–431.

298. Crisostomo S., Guemene D., Garreau-Mills M., Morvan C., Zadworny D. Prevention of incubation behavior expression in turkey hens by active immunization against prolactin. *Theriogenology*. 1998. Vol. 50 (4). P. 675–690.

299. Romanov M.N. Genetics of broodiness in poultry – a review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2001. Vol. 14, No. 11. P. 1647–1654.

300. Станишевская О. И., Федорова Е. С., Плешанов Н. В. Инстинкт насиживания у сельскохозяйственной птицы: механизм реализации и методы подавления. *Сельскохозяйственная биология*. 2017. Т. 52. № 4. С. 767–775.

301. Liang Y., Cui J., Yang G., Leung F. C., Zhang X. Polymorphisms of 5'flanking region of chicken prolactin gene. *Domestic Animal Endocrinology*. 2006. Vol. 30. P. 1–16.

302. Cui J. X., Du H. L., Liang Y., Deng X. M., Li N., Zhang X. Q. Association of polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production. *Poultry Science*. 2006. Vol. 85. P. 26–31.

303. Bhattacharya T. K., Chatterjee R. N., Sharma R. P., Rajkumar U., Niranjana M., Reddy B. L. Association of polymorphism in the prolactin promoter and egg quality traits in laying hens. *British Poultry Science*. 2011. Vol. 52, No. 5. P. 551–557.

304. Bhattacharya T. K., Chatterjee R. N., Sharma R. P., Rajkumar U., Niranjana M. Genetic polymorphism at 5' flanking region of the prolactin gene and its effect on egg quality traits in naked neck chickens. *Journal of Applied Animal Research*. 2011. Vol. 39 (1). P. 72–76.

305. Bhattacharya T. K., Chatterjee R. N., Sharma R. P., Niranjana M., Rajkumar U. Associations between novel polymorphisms at the 5'-UTR region of the prolactin gene and egg production and quality in chickens. *Theriogenology*. 2011. Vol. 75. P. 655–661.

306. Bhattacharya T. K., Chatterjee R. N., Sharma R. P., Niranjana M., Rajkumar U., Reddy B. L. Identification of haplotypes in promoter of prolactin gene and their effect on egg production and quality traits in layer chicken. *Animal Biotechnology*. 2011. Vol. 22. P. 71–86.

307. Bhattacharya T. K., Chatterjee R. N., Sharma R. P., Niranjana M., Rajkumar U., Reddy B. L. Polymorphism in the prolactin promoter and its association with growth traits in chickens. *Biochem Genet*. 2011. Vol. 49. P. 385–394.

308. Bhattacharya T. K., Chatterjee R. N., Kumar U., Rajaravinda K. S., Niranjana M. Genetic polymorphism in the promoter of prolactin gene in layer chicken. *Indian Journal of Animal Research*. 2015. Vol. 49 (6). P. 875–877.

309. Jiang R. S., Xu G. Y., Zhang X. Q., Yang N. Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens. *Poultry Science*. 2005. Vol. 84. P. 839–845.

310. Begli H. E., Zerehdaran S., Hassani S. Polymorphism in prolactin and PEPCK-C genes and its association with economic traits in native fowl of Yazd province. *Iranian journal of biotechnology*. 2010. Vol. 8, No. 3. P. 172–177.

311. Bagheri Sarvestani A. S., Niazi A., Zamiri M. J., Dadpasand Taromsari M. Polymorphisms of prolactin gene in a native chicken population and its association with egg production. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2013. Vol. 14, No. 2. P. 113–119.

312. Usman M., Basheer A., Babar M. E., Prolactin: candidate gene for egg production or broodiness traits in chicken. *Sci. Int.* 2014. Vol. 26 (3). P. 1191–1195.

313. Митрофанова О. В., Дементьева Н. В., Крутикова А. А. Полиморфизм в промоторе гена пролактина и его ассоциация с направлением продуктивности у кур. *Научный журнал КубГАУ.* 2015. № 111 (07). С. 1–10.

314. Rahman M., Matsuda R., Matsuda T., Nishiyama Y., Jozaki K., Anann K., Wada Y. Relationship between the production traits and three candidate genes in the prolactin's In/Del×In/Del population of Silkie fowl. *J. Poult. Sci.* 2014. Vol. 51. P. 138–143.

315. Mitrophanova O. V., Dementeva N. V., Krutikova A. A., Yurchenko O. P., Vakhrameev A. B., Terletskiy V. P. Association of polymorphic variants in MSTN, PRL, and DRD2 genes with intensity of young animal growth in Pushkin breed chickens. *Cytology and genetics.* 2017. Vol. 51 (3). P. 179–184.

316. Alipanah M., Shojaian K., Bandani H. K. The polymorphism of prolactin gene in native chicken Zabol region. *Journal of animal and veterinary advances.* 2010. Vol. 9 (24). P. 3005–3007.

317. Abdi M., Seyedabadi H., Gorbani A. Prolactin and NPY gene polymorphism and its associations with production and reproductive traits in West-Azerbaijan native chicken. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* 2014. Vol. 3 (6). P. 39–45.

318. Al-Sheikh A. A., Ismail I. H. Effect of prolactin gene polymorphisms on egg weight of white leghorn and hy-line brown laying hen strains. *Iraq journal of biotechnology.* 2017. Vol. 16, No. 2. P. 1–9.

319. Fathi M., Elyasi Zarringobaie G. Association of polymorphism in the promoter region of turkey prolactin with egg performance. *Genetika.* 2014. Vol. 46, No. 2. P. 591–599.

320. Irma, Sumantri C., Susanti T. Single nucleotide polymorphism of prolactin gene exon in ducks of Pekin, Mojosari and Pekin Mojosari crossbred. *JITV.* 2014. Vol. 19, No. 2. P. 104–111.

321. Jiang R. S., Zhang L. L., Geng Z. Y., Yang T., Zhang S. S. Single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of the prolactin gene and the

association with reproduction traits in geese. *South African Journal of Animal Science*. 2009. Vol. 39 (1). P. 83–87.

322. Lotfi E., Zerehdaran S., Azari M. A., Dehnavi E. Genetic polymorphism in prolactin gene and its association with reproductive traits in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Poultry Science Journal*. 2013. Vol. 1 (2). P. 79–85.

323. Brooks C. L. Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocrine reviews*. 2012. Vol. 33 (4). P. 504–525.

324. Clevenger C. V., Freier D. O., Kline J. B. Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. *Journal of endocrinology*. 1998. Vol. 157. P. 187–197.

325. Dunn I. C. Genetic mapping of the chicken prolactin receptor gene: a candidate gene for the control of broodiness. *British poultry science*. 1998. Vol. 39 (S1). P. 23–24.

326. Rashidi H., Rahimi-Mianji G., Farhadi A., Gholizadeh M. Association of prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms with economic traits in breeder hens of indigenous chickens of Mazandaran province. *Iranian journal of biotechnology*. 2012. Vol. 10, No. 2. P. 129–135.

327. Liu L. B., Li D. Y., Zhao X. L., Liu Y. P., Wang Y., Zhu Q. Polymorphism of prolactin receptor gene and its association with egg production traits in Erlang Mountainous chicken. *Asian journal of animal and veterinary advances*. 2012. Vol. 7 (11). P. 1183–1190.

328. Li D. Y., Zhang L., Trask J. S., Xu H. L. Genetic effects of polymorphisms in the prolactin receptor gene on chicken reproductive traits. *Animal Production Science*. 2013. Vol. 53. P. 1088–1092.

329. Zhang L., Li D. Y., Liu Y. P., Wang Y., Zhao X. L., Zhu Q. Genetic effect of the prolactin receptor gene on egg production traits in chickens. *Genetics and Molecular Research*. 2012. Vol. 11 (4). P. 4307–4315.

330. Wang Y., Brahmakshatriya V., Lupiani B., Reddy S., Okimoto R., Li X., Chiang H., Zhou H. Associations of chicken Mx1 polymorphism with antiviral

responses in avian influenza virus infected embryos and broilers. *Poultry science*. 2012. Vol. 91. P. 3019–3024.

331. Ewald S. J., Kapczynski D. R., Livant E. J., Suarez D. L., Ralph J., McLeod S., Miller C. Association of Mx1 Asn631 variant alleles with reductions in morbidity, early mortality, viral shedding, and cytokine responses in chickens infected with a highly pathogenic avian influenza virus. *Immunogenetics*. 2011. Vol. 63. P. 363–375.

332. Haller O., Frese M., Kochs G. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech*. 1998. Vol. 17 (1). P. 220–230.

333. Pavlovic J., Staeheli P. The antiviral potentials of MX proteins. *Journal of interferon research*. 1991. Vol. 11. P. 215–219.

334. Pavlovic J., Schroder A., Blank A., Pitossi F., Staeheli P. Mx proteins: GTPases involved in the interferon-induced antiviral state. *Ciba found symp*. 1993. Vol. 176. P. 233–243.

335. Horisberger M. A. Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995. Vol. 152. P. S67–S71.

336. Lee S. H., Vidal S. M. Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. *Genome research*. 2002. Vol. 12. P. 527–530.

337. Sartika T., Sulandari S., Zein M. Selection of mx gene genotype as genetic marker for avian influenza resistance in Indonesian native chicken. *BMC Proceedings*. 2011. Vol. 5 (Suppl 4): S37.

338. Schusser B., Reuter A., Malsburg A., Penski N., Weigend S., Kaspers B., Staeheli P., Hartle S. Mx is dispensable for interferon-mediated resistance of chicken cells against influenza A virus. *Journal of virology*. 2011. Vol. 85, No. 16. P. 8307–8315.

339. Pagala M., Muladno, Sumantri C., Murtini S. Association of Mx gene genotype with antiviral and production traits in Tolaki chicken. *International journal of poultry science*. 2013. Vol. 12 (12). P. 735–739.

340. Sironi L., Ramelli P., Williams J. L., Mariani P. PCR-RFLP genotyping protocol for chicken Mx gene G/A polymorphism associated with the S631N mutation. *Genetics and molecular research*. 2010. Vol. 9 (2). P. 1104–1108.

341. Sasaki K., Yoneda A., Ninomiya A., Kawahara M., Watanabe T. Both antiviral activity and intracellular localization of chicken Mx protein depend on a polymorphism at amino acid position 631. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013. Vol. 430. P. 161–166.

342. Ko J., Jin H., Asano A., Takada A., Ninomiya A., Kida H., Hokiyaama H., Ohara M., Tsuzuki M., Nishibori M., Mizutani M., Watanabe T. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Genome research*. 2002. Vol. 12 (4). P. 595–601.

343. Watanabe T. Polymorphisms of the chicken antiviral MX gene. *Cytogenet genome res*. 2007. Vol. 117. P. 370–375.

344. Luan D. Q., Chang G. B., Sheng Z. W., Liu Y., Chen G. H. Analysis on the polymorphism and the genetic effects on some economic traits of mx gene S631N mutation site in chicken. *Thai J. Vet. Med*. 2010. Vol. 40 (3). P. 303–310.

345. Yin C., Cao D., Du L. Mx gene polymorphism in part region of eight local chicken breeds. *Applied mechanics and materials*. 2012. Vol. 108. P. 297–300.

346. Ko J., Jin H., Asano A., Takada A., Ninomiya A., Kida H., Hokiyaama H., Ohara M., Tsuzuki M., Nishibori M., Mizutani M., Watanabe T. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Genome research*. 2002. Vol. 12 (4). P. 595–601.

347. Fulton J. E., Arango J., Ali R. A., Bohorquez E. B., Lund A. R., Ashwell C. M., Settar P., O'Sullivan N. P., Koci M. D. Genetic Variation within the Mx Gene of Commercially Selected Chicken Lines Reveals Multiple Haplotypes, Recombination and a Protein under Selection Pressure. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9 (9). P. 1–9.

348. Fadhil M., Mercan L. Molecular characterization of Mx gene polymorphism in Gerze chicken breed and pure line chicken breed. *Animal research international*. 2016. Vol. 13 (3). P. 2540–2543.

349. Elfidasari D., Solihin D. D., Soejoedono R. D., Murtini S. Identification of gene resistance to avian influenza virus (Mx Gene) among wild waterbirds. *Makara journal of science*. 2013. Vol. 17/1. P. 6–10.

350. Bodner M., Castrillo J. L., Theill L. E., Deerinck T., Ellisman M., Karin M. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell*. 1988. Vol. 55. P. 505–518.

351. Lefevre C., Imagawa M., Dana S., Grindlay J., Bodner M., Karin M. Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is covered in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J*. 1987. Vol. 6. P. 971–981.

352. Cohen L. E., Wondisford F. E., Radovick S. Role of pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 1996. Vol. 25 (3). P. 523–540.

353. Mukherjee M., Porter T. E. Differential abilities of chicken Pit1 isoforms to regulate the GH promoter: evidence for synergistic activation. *Endocrinology*. 2012. Vol. 153 (7). P. 3320–3330.

354. Li S., Bryan Crenshaw III E., Rawson E. J., Simmons D. M., Swanson L. W., Rosenfeld M. G. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature*. 1990. Vol. 347. P. 528–533.

355. Jacobson E. M., Li P., Leon-del-Rio A., Rosenfeld M. G., Aggarwal A. K. Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: unexpected arrangement and flexibility. *Genes. Dev.* 1997. Vol. 11. P. 198–212.

356. Weatherly K. L., Ramesh R., Strange H., Waite K. L., Storrie B., Proudman J. A., Wong E. A. The turkey transcription factor Pit-1/GHF-1 can activate the turkey prolactin and growth hormone gene promoters in vitro but is not detectable in lactotrophs in vivo. *General and comparative endocrinology*. 2001. Vol. 123. P. 244–253.

357. Van As P., Janssens K., Pals K., De Groef B., Onagbesan O. M., Bruggeman V., Darras V. M., Deneff C., Decuypere E. The chicken pituitary-specific transcription factor Pit-1 involved in the hypothalamic regulation of pituitary hormones. *Acta veterinaria Hungarica*. 2006. Vol. 54 (4). P. 455–471.

358. Jiang R., Li J., Qu L., Li H., Yang N. A new single nucleotide polymorphism in the chicken pituitary-specific transcription factor (POU1F1) gene associated with growth rate. *Animal genetic*. 2004. Vol. 35. P. 344–346.

359. Nie Q., Fang M., Xie L., Zhou M., Liang Z., Luo Z., Wang G., Bi W., Liang C., Zhang W., Zhang X. The PIT1 gene polymorphisms were associated with chicken growth traits. *BMC Genet*. 2008. Vol. 9. P. 20–24.

360. Bhattacharya T. K., Priyanka M., Chatterjee R. N., Sharma R. P., Bhanja S. K., Kumar U., Niranjana M. Polymorphism at exon 1 of pit-1 gene and its association with immunocompetence traits in layer chicken. *Journal of applied animal research*. 2011. Vol. 39 (4). P. 298–302.

361. Bhattacharya T. K., Chatterjee R. N., Priyanka M., Genetic polymorphism at exon 1 of Pit-1 gene in indigenous chicken. *Indian Vet. J.* 2012. Vol. 89 (11). P. 34–35.

362. Bhattacharya T. K., Chatterjee R. N., Priyanka M. Polymorphisms of Pit-1 gene and its association with growth traits in chicken. *Poultry Science*. 2012. Vol. 91. P. 1057–1064.

363. Rodbari Z., Alipanach M., Seyedabadi H. R., Amirinia C. Identification of a single nucleotide polymorphism of the pituitary-specific transcriptional factor 1 (Pit 1) gene and its association with body composition trait in Iranian commercial broiler line. *African journal of biotechnology*. 2011. Vol. 10 (60). P. 12979–12983.

364. Cheng J., Qiao N., Zhao W., Xu Q., Zhang H., Duan X., Ji W., Chen G. Genetic variation of Pit-1 gene in Chinese indigenous and Western goose populations. *African journal of biotechnology*. 2009. Vol. 8 (14). P. 3147–3153.

365. Xu Z. Q., He J., Ji C. L., Zhang Y., Nie Q. H., Zhang D. X., Zhang X. Q. Polymorphisms in the 5'-flanking regions of the GH, PRL, and Pit-1 genes with Muscovy duck egg production. *J. Anim. Sci.* 2015. Vol. 93 (1). P. 28–34.

366. Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1990. Vol. 6. P. 597–641.

367. Kim I., Kim M., Kim S. Transforming growth factor- β : biology and clinical relevance. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2005. Vol. 38 (1). P. 1–8.

368. Lawrence D. A. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur. Cytokine Netw*. 1996. Vol. 7 (3). P. 363–374.

369. Rosairo D., Kuyznierewicz I., Findlay J., Drummond A. Transforming growth factor- β : its role in ovarian follicle development. *Reproduction*. 2008. Vol. 136. P. 799–809.

370. Poniatowski L. A., Wojdasiewicz P., Gasik R., Szukiewicz D. Transforming growth factor beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators of inflammation*. 2015. Vol. 2015. 17 p.

371. Knight P. G., Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006. Vol. 132. P. 191–206.

372. Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem*. 1998. Vol. 67. P. 753–791.

373. Weiss A., Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *WIREs Dev. Biol*. 2013. Vol. 2. P. 47–63.

374. Kingsley D. M. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes and development*. 1994. Vol. 8. P. 133–146.

375. Jakowlew S., Mathias A., Lillehoj H. S. Transforming growth factor- β isoforms in the developing chicken intestine and spleen: increase in transforming growth factor- β 4 with coccidian infection. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 1997. Vol. 55 (4). P. 321–339.

376. Li H., Deeb N., Zhou H., Mitchell A. D., Ashwell C. M., Lamont S. J. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with transforming growth factor- β genes. *Poultry science*. 2003. Vol. 82. P. 347–356.

377. Ghosh A., Savaliya F. P., Rank D. N., Joshi C. G., Khanna K., Taraphder S. Genetics of TGF- β 3 gene polymorphism in inbred synthetic white leghorn breed of poultry. *Journal of evolutionary biology research*. 2011. Vol. 3 (2). P. 19–21.

378. Halper J., Burt D., Romanov M. On reassessment of the chicken TGF β 4 gene as TGF β 1. *Growth factors*. 2004. Vol. 22. P. 121–122.

379. Mohammad C., Mostafa F. Novel single nucleotide polymorphism in intron 4 of TGF- β 3 gene and its association with production trait in Isfahan native fowl. *Annals of biological research*. 2013. Vol. 4 (2). P. 64–68.

380. Malek M., Lamont S. J. Association of INOS, TRAIL, TGF- β 2, TGF- β 3, and IgL genes with response to *Salmonella enteritidis* in poultry. *Genet. Sel. Evol.* 2003. Vol. 35. P. 99–111.

381. Zhou H., Lamont S. J. Association of transforming growth factor b genes with quantitative trait loci for antibody response kinetics in hens. *Animal Genetics*. 2003. Vol. 34. P. 275–282.

382. Ye X., Avendano S., Dekkers J. C. M., Lamont S. J. Association of twelve immune-related genes with performance of three broiler lines in two different hygiene environments. *Poultry Science*. 2006. Vol. 85. P. 1555–1569.

383. Jin S., Chen S., Li H., Lu Y., Zhang D., Ji C., Xu G., Yang N. Polymorphisms in the transforming growth factor β 3 gene and their associations with feed efficiency in chickens. *Poultry science*. 2013. Vol. 92. P. 1745–1749.

384. Chen S., An J., Lian L., Qu L., Zheng J., Xu G., Yang N. Polymorphisms in AKT3, FIGF, PRKAG3, and TGF- β genes are associated with myofiber characteristics in chickens. *Poultry science*. 2013. Vol. 92. P. 325–330.

385. Tang S., Ou J., Sun D., Zhang Y., Xu G. A novel 62-bp indel mutation in the promoter region of transforming growth factor-beta 2 (TGFB2) gene is associated with body weight in chickens. *Animal genetics*. 2010. Vol. 42. P. 108–112.

386. Tohidi R., Idris I. B., Panandam J. M., Bejo M. H. The effects of polymorphisms in IL-2, IFN- γ , TGF- β 2, IgL, TLR-4, MD-2, and iNOS genes on resistance to *Salmonella Enteritidis* in indigenous chickens. *Avian pathology*. 2012. Vol. 41 (6). P. 605–612.

387. Tohidi R., Idris I. B., Malar Panandam J., Hair Bejo M. The effects of polymorphisms in 7 candidate genes on resistance to *Salmonella* Enteritidis in native chickens. *Poultry science*. 2013. Vol. 92. P. 900–909.

388. Buasook T., Duangjinda M., Laopaiboon B., Kunhareang S. Genetic pattern of *MSTN* and *TGF- β 3* in Thai native chicken crossbred. *Khon. Kaen. Agr. J.* 2015. Vol. 43 (2). P. 200–202.

389. Pandey N. K., Singh R. P., Saxena V. K., Shit N., Singh R., Sharma R. K., Sastry K. V. N. Effect of IGF1 gene polymorphism and expression levels on growth factors in Indian colored broilers. *Livestock science*. 2013. Vol. 155. P. 157–164.

390. Каталог племінних ресурсів сільськогосподарської птиці України / за ред. Ю.О. Рябокonia. Київ: Атмосфера, 2006. 80 с.

391. Гальперн И. Л., Сегал Е. Л., Федоров И. В. *Проблема сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственной птицы и возможные пути ее решения*. Мат. XVIII межд. конф. ВНАП «Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России». Сергиев Посад. 2015. С. 45–48.

392. Подстрешний О. П., Хвостик В. П., Подстрешна І. О., Катеринич О. О. Моніторинг імуногенетичної структури курей різних порід. *Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб.* 2011. Вип. 67. С. 65–73.

393. Подстрешний О. П., Руда С. В., Богатир В. В., Булах Н. В. Генетична структура м'ясо-яєчних курей за поліморфними білковими локусами. *Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб.* 2004. Вип. 54. С. 73–79.

394. Катеринич О. А., Бондаренко Ю. В., Богатырь В. В. Борковские мясо-яичные куры – птица для фермерских и приусадебных хозяйств. *Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб.* 2003. Вип. 53. С. 70–75.

395. Популяція яєчних курей «Бірківська барвіста» (рекомендації по розведенню) / Т. В. Мосякіна та ін. Бірки, 2005. 36 с.

396. Терещенко О. В., Катеринич О. О., Хвостик В. П., Панькова С. М., Захарченко О. П., Лютий Ю. С., Печеніжська Т. Б., Фесенко Н. А., Тимошенко Н. П. *Селекційні досягнення вітчизняного птахівництва*. Матеріали ІХ міжнародної конференції «Птахівництво 2013». Судак. 2013. С. 110–114.

397. Moiseyeva I. G., Romanov M. N., Kovalenko A. T., Mosyakina T. V., Bondarenko Yu. V., Kutnyuk P. I., Podstreshny A. P., Nikiforov A. A. The Poltava chicken breed of Ukraine: its history, characterization and conservation. *AGRI*. 2007. Vol. 40. P. 71–78.

398. Мосякіна Т. В., Подстрешний О. П., Коваленко Г. Т., Печеніжська Т.Б. Генетична характеристика породи яєчно-м'ясних курей «Полтавська глиняста». *Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб.* 2006. Вип. 58. С. 146–151.

399. Мосякіна Т. В., Коваленко Г. Т., Степаненко І. А., Печеніжська Т. Б. Нова порода яєчно-м'ясних курей «полтавська глиняста». *Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб.* 2006. Вип. 58. С. 131–145.

400. Хвостик В. П., Бондаренко Ю. В. Спадковий тягар у популяціях курей вітчизняного генофонду. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2016. Вип. 7 (30). С. 112–114.

401. Хвостик В. П., Катеринич О. О., Захарченко О. П., Печеніжська Т. Б., Фесенко Н. А., Подстрешний О. П., Подстрешна І. О. Імуногенетична характеристика курей вітчизняного генофонду. *Птахівництво: Міжвід. темат. наук. зб.* 2013. Вип. 69. С. 358–363.

402. Heifetz E. M., Fulton J. E., O'Sullivan N. P., Arthur J. A., Cheng H., Wang J., Soller M., Dekkers J. C. M. Mapping QTL affecting resistance to Marek's disease in an F6 advanced intercross population of commercial layer chickens. *BMC Genomics*. 2009. 10:20. URL: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-20> (Last accessed: 12.03.2016).

403. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual, 3th edition. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001. 764 p.

404. Hamilton M. B. Population genetics. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. 424 p.

405. Wright S. Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 590 p.

406. Nei M., Chesser R. K., Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genet.* 1983. Vol. 47. P. 253–259.

407. Zhao J. H., Curtis D., Sham P.C. Model-free analysis and permutation tests for allelic associations. *Hum Hered.* 2000. Vol. 50. P. 133–139.

408. Lewontin R. C. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics.* 1964. Vol. 49. P. 49–67.

409. Lewontin R. C. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics.* 1988. Vol. 120. P. 849–852.

410. Zapata C., Carollo C., Rodriguez S. Sampling variance and distribution of the D measure of overall gametic disequilibrium between multiallelic loci. *Ann Hum Genet.* 2001. Vol. 65. P. 395–406.

411. Царенко П. П. Повышение качества продукции птицеводства: пищевые и инкубационные яйца. Л.: Агропромиздат, 1988. 240 с.

412. Методические рекомендации по проведению исследований технологии производства мяса птицы / Л. Н. Агеева и др. Москва: ВНИТИП, 1981. 50 с.

413. Методологія та організація наукових досліджень у тваринництві: посібник / за ред.: І. І. Ібатулін, О. М. Жукорський. Київ: Аграрна наука, 2017. 328 с.

414. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: «МедиаСфера», 2002. 312 с.

415. Pearson C. E., Sinden R. R. Trinucleotide repeat DNA structures: dynamic mutations from dynamic DNA. *Current Opinion in Structural Biology.* 1998. Vol. 8 P. 321–330.

416. Pearson C. E., Sinden R. R. Alternative structures in duplex DNA formed within the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy and fragile X loci. *Biochemistry.* 1996. Vol. 35. P. 5041–5053.

417. Sinden R. R., Potaman V. N., Oussatcheva E. A., Pearson C. E., Lyubchenko Y. L., Shlyakhtenko L. S. Triplet repeat DNA structures and human

genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA. *J. Biosci.* 2002. Vol. 27, No. 1. Suppl. 1. P. 53–65.

418. Hosseinzadeh-Colagar A., Haghghatnia M. J., Amiri Z., Mohadjerani M., Tafrihi M. Microsatellite (SSR) amplification by PCR usually led to polymorphic bands: evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands. *Molecular biology research communications.* 2016. Vol. 5 (3). P. 167–174.

419. Долматова И. Ю. Молекулярно-генетические маркеры в селекции уток: автореф. дисс. ... д-ра. биол. наук: 06.02.01 / Башкирский гос. ун-т. Санкт-Петербург, 2007. 37 с.

420. Ayliffe M. A., Lawrence G. J., Ellis J. G., Pryor A. J. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucleic acids research.* 1994. Vol. 22, No. 9. P. 1632–1636.

421. Кулибаба Р. А., Кривохижая М. В. Определение пола птиц методом полимеразной цепной реакции. *Голубівництво та декоративне птахівництво: історія, проблеми, перспективи:* матеріали міжнарод. науково-практ. конф., 11-12 червня 2011 р. Миколаїв, 2011. С. 129–134.

422. Кулибаба Р. А., Терещенко А. В. Определение пола птиц с невыраженным половым диморфизмом методом полимеразной цепной реакции. *Инновационные разработки и их освоение в промышленном птицеводстве:* материалы XVII международной конференции. Сергиев Посад, 2012. С. 79–80.

423. Кулибаба Р. А., Ляшенко Ю. В. Определение пола птиц отряда *Psittaciformes* с использованием полимеразной цепной реакции. *Молекулярная диагностика 2014.* Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Москва, 2014. Т. 2. С. 517–518.

424. Кулібаба Р. О. Використання гетеродуплексного аналізу як альтернативи методу ПЛР-ПДРФ для генотипування особин птиці. *Актуальні дослідження з проблем розведення та генетики у тваринництві:* матеріали XIII всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та аспірантів, присвяченої

пам'яті академіка НААН Михайла Васильовича Зубця. Чубинське, 2015. С. 29–30.

425. Кулібаба Р. О. Аналіз причин типових помилок при інтерпретації даних електрофоретичного розподілу фрагментів ДНК. *Науковий прогрес в тваринництві і птахівництві*: Матеріали XI Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених (Харків, 25-26 вер. 2017 р.). Харків, 2017. С. 12–14.

426. Кулибаба Р. А., Ляшенко Ю. В. Влияние артефактов ПЦР на эффективность генотипирования по микросателлитным локусам при использовании электрофореза в нативных полиакриламидных гелях. *Цитология и генетика*. 2016. Т. 50. № 3. С. 16–23.

427. Кулибаба Р. А., Ляшенко Ю. В. К вопросу об образовании конформационных химерных молекул в процессе амплификации динуклеотидных tandemных повторов. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2017. Т. 22. С. 34–42.

428. Кулібаба Р. О., Подстрешний О. П. Визначення статі птиці з невираженим статевим диморфізмом з використанням полімеразної ланцюгової реакції. *Сучасне птахівництво*. 2012. № 5. С. 18–23.

429. Кулибаба Р. А., Ляшенко Ю. В. Сравнительный анализ эффективности использования агарозных и полиакриламидных гелей в молекулярно-генетических исследованиях. *Птахівництво. Міжвід. темат. наук. збірник*. 2014. Вип. 71. С. 88–99.

430. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Оптимізація різних етапів ПЛР при ампліфікації промоторної ділянки гену TGF- β 2. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2014. Вип. 72. С. 30–37.

431. Кулібаба Р. О. Утворення гетеродуплексної ДНК при ампліфікації фрагментів генів TGF- β 2 та CHD у птахів. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2015. № 114. С. 77–83.

432. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Спосіб контролю денатурації ДНК при використанні електрофорезу у поліакриламідному гелі:

патент на корисну модель № 123147, МПК: G01N 33/483. № u201709210; заявл. 18.09.2017; опубл. 12.02.2018. Бюл. № 3. 3 с.

433. Кулібаба Р. О. Генетична структура популяції курей лінії 02 породи род-айленд червоний за поліморфізмом мікросателітної ДНК. *Таврійський науковий вісник*. 2018. Вип. 100. Т. 1. С. 167–172.

434. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В. Аналіз генетичної диференціації субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей з використанням мікросателітних маркерів. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2018. Вип. 1. С. 164–175.

435. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В. Мікросателітна мінливість у популяціях курей українських локальних порід. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького*. 2018. Т. 20, № 84. С. 70–76.

436. Hassanane M. S., Alam S. S., Ajang O. A., Mohamed K. A. B., Sid-Ahmed S. E., Abdoon A. S. Genetic polymorphism of GH; PIT 1 and PRLR genes in six lines of Sudanese chickens. *International Journal of BioSciences and Technology*. 2017. Vol. 10 (6). P. 43–52.

437. Shahnaz S., Shadma F., Rank D. N., Khanna K., Joshi C. G. Growth hormone gene polymorphism and its correlation with different traits in Bantam and white leghorn chicken. *Indian journal of poultry science*. 2008. Vol. 43 (2). P. 123–127.

438. Ruano G., Kidd K. K. Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates. *Genome res*. 1992. Vol. 2. P. 112–116.

439. Кулібаба Р. О., Подстрешний О. П., Подстрешна І. О. Генетична ідентифікація і паспортизація ліній і порід птиці. *Аграрна наука – виробництво*. 2011. № 3. С. 23.

440. Кулибаба Р. А. Полиморфизм гена инсулиноподобного ростового фактора-I в популяции кур породы «Борковская барвистая». *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво»*. 2012. Вип. 12 (21). С. 90–93.

441. Кулибаба Р. А., Подстрешный А. П. Полиморфизм генов пролактина и гормона роста в линиях кур украинской селекции. *Цитология и генетика*. 2012. № 6. С. 75–83.

442. Kulibaba R. O., Podstreshnyi O. P., Tereshchenko O. V. Polymorphism of the prolactin gene promoter in two chicken lines of Ukrainian selection. *The 3rd Mediterranean Poultry Summit AND The 6th International Poultry Conference*. 2012. Режим доступу: <http://www.mpn-wpsa.org/3rdmps/search/abstract.php?ida=10134/> (last access: 22.05.17). Title from the screen.

443. Кулібаба Р. О. Поліморфізм генів PRL, GH, GHR, IGF-I та PIT1 у м'ясо-яєчних та яєчних курей вітчизняної селекції. *Здоров'я тварин – екологічне благополуччя України: матеріали науково-практичної інтернет-конференції*. Тернопіль, 2012. С. 24–27.

444. Кулибаба Р. А. Генетическая структура линий кур разного направления продуктивности по локусу рецептора гормона роста. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2012. Вип. 69. С. 26–32.

445. Кулибаба Р. А. Полиморфизм гена инсулиноподобного ростового фактора-I в линии мясо-яичных кур отечественной селекции. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2012. Вип. 68. С. 250–256.

446. Кулібаба Р. О. Алельний поліморфізм гену pit-1 у двох лініях курей різного напрямку продуктивності. *Сучасне птахівництво*. 2012. № 11. С. 9–12.

447. Кулибаба Р. А. Полиморфизм генов семейства TGF- β в популяциях кур украинской селекции. *Сучасні досягнення в тваринництві та птахівництві: матеріали VII всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених*. Мартова, 2013. С. 47–48.

448. Кулибаба Р. А. SacI-полиморфизм гена гормона роста в популяциях кур пород белый плимутрок, борковская барвистая и полтавская глинистая. *Сучасне птахівництво*. 2013. № 7. С. 21–24.

449. Кулібаба Р. О., Білецька Г. В., Ткачик Т. Е. Генетична структура курей з різною чутливістю до хвороби Марека за локусом Mx-гену. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2013. Вип. 69. С. 167–173.

450. Кулибаба Р. А. Полиморфизм генов семейства трансформирующих ростовых факторов-бета в линиях кур украинской селекции. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2014. Т. 17. С. 97–104.

451. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В. Динаміка генетичної структури популяції курей породи бірківська барвіста за локусами кількісних ознак. *Сучасне птахівництво*. 2015. № 11-12. С. 14–20.

452. Кулибаба Р. А., Юрко П. С., Ляшенко Ю. В. MspI-полиморфизм четвертого интрона гена гормона роста в популяциях кур различных пород. Анализ причин возникновения дополнительного паттерна рестрикции. *Цитология и генетика*. 2015. Т. 49, № 6. С. 30–37.

453. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В. Генетико-популяційний аналіз ліній курей української селекції за локусом IGF-I. *Тваринництво України*. 2015. № 11. С. 11–16.

454. Кулибаба Р. А. Полиморфизм генов PRL, PRLR, GH, GHR, PIT-1, IGFI, TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3 в линиях кур украинской селекции. *Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России: материалы XVIII международной конференции ВНАП*. Сергиев Посад, 2015. С. 72–74.

455. Кулібаба Р. О., Руда С. В. Генетична характеристика популяції курей лінії Г2 породи плімутрок білий за біохімічними та ДНК-маркерами. *Птахівництво 2015: Матеріали XI міжнародної конференції (Трускавець, 15 – 17 верес. 2015 р.)*. Трускавець, 2015. С. 54–59.

456. Кулібаба Р. О. Розподіл GHR-алелів у популяціях курей різних порід. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2016. № 116. С. 54–61.

457. Кулибаба Р. А. Анализ встречаемости мутации G2032A MX гена в популяциях кур различных пород украинской селекции. *Зоотехническая наука Белоруссии. Сборник научных трудов*. 2016. Т. 1 (ч. 1). С. 112–119.

458. Кулібаба Р. О. Особливості генотипування птиці за гемізиготними локусами з використанням молекулярно-генетичних маркерів. *Науковий*

прогрес у тваринництві та птахівництві: матеріали X Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених (Харків, 11-12 жовт. 2016 р.). Харків, 2016. С. 12–14.

459. Кулібаба Р. О. Моніторинг розповсюдження мутації G2032A Mx гена в популяціях курей української селекції. *Практичні результати та методичні аспекти досліджень з розведення, генетики та біотехнології у тваринництві: матеріали XIV Всеукраїнської наукової конференції молодих учених та аспірантів, присвяченої пам'яті академіка УААН Валерія Петровича Бурката.* Чубинське, 2016. С. 36–37.

460. Shulika L. V., Kulibaba R. O. Genetic structure of Rhode-Island Red chicken breed population on PRL and INS loci. Associations between genotype and chicken productivity. *14th International Symposium of Animal Biology and Nutrition.* Bucharest, 28-29 September 2017, Bucharest. Bucharest, 2017. P. 33.

461. Кулібаба Р. А., Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Новый AluI-полиморфизм в четвертом интроне гена гормона роста кур. *Цитология и генетика.* 2017. Т. 51, № 1. С. 69–75.

462. Кулібаба Р. А. Анализ связи аллелей гена Mx с хозяйственно-полезными признаками кур разных направлений продуктивности. *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: материалы XX Международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию образования кафедр крупного животноводства и переработки животноводческой продукции; свиноводства и мелкого животноводства УО БГСХА.* Горки, 2017. С. 77–81.

463. Кулібаба Р. О. Використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки селекційної роботи з популяціями курей українських локальних порід. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН.* 2017. № 118. С. 104–113.

464. Кулібаба Р. А., Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Генетическая дифференциация пород кур украинской селекции с использованием различных типов молекулярно-генетических маркеров. *Сельскохозяйственная биология.* 2018. Т. 53, № 2. С. 282–292.

465. Кулибаба Р. А. Особенности генетической структуры популяции кур породы род-айленд красный по локусам количественных признаков. *Цитология и генетика*. 2018. Т. 52, № 3. С. 25–32.

466. Кулібаба Р. О., Юрко П. С., Ляшенко Ю. В. Аналіз розподілу гаплотипів у локусах пролактину та інсуліноподібного ростового фактору-I у популяціях курей різних порід. *Вісник аграрної науки*. 2018. № 3 (780). С. 30–34.

467. Кулибаба Р. А. Маркер-ассоциированная селекция – ключ к решению проблемы насиживания. *Сучасні досягнення у тваринництві та птахівництві: матеріали VIII всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених*. Харків, 2014. С. 40–42.

468. Kulibaba R. A., Tereshchenko A. V. Transforming growth factor β 1, pituitary-specific transcriptional factor 1 and insulin-like growth factor I gene polymorphisms in the population of the Poltava clay chicken breed: association with productive traits. *Agricultural Science and Practice*. 2015. Vol. 2 (1). P. 67–72.

469. Кулибаба Р. А. Связь функционального полиморфизма целевых генов (PRL, GH, GHR) с продуктивными признаками яичных кур украинской селекции. *Генетика и разведение животных*. 2015. № 3. С. 75–80.

470. Кулибаба Р. А. Полиморфизм генов гормона роста, рецептора гормона роста, пролактина и рецептора пролактина в связи с яичной продуктивностью у кур породы полтавская глинистая. *Сельскохозяйственная биология*. 2015. Т. 50, № 2. С. 198–207.

471. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів (PCR-RFLP, Indel) у селекційній роботі з птицею порід Полтавська глиняста та Бірківська барвиста: методичні рекомендації. Бірки: Державна дослідна станція птахівництва НААН, 2015. 18 с.

472. Кулібаба Р. О. Порівняльний аналіз продуктивних якостей двох експериментальних мікроліній курей породи бірківська барвиста. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2016. № 115. С. 127–133.

473. Кулібаба Р. О. Аналіз зв'язку алельних варіантів генів IGF-I, GH та PIG-1 з продуктивними ознаками курей породи бірківська барвіста. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького*. 2017. Т. 19, № 79. С. 53–57.

474. Кулібаба Р. О. Продуктивні якості курей порід української селекції різних генотипів за локусами родини трансформуючих ростових факторів бета. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2017. № 117. С. 86–93.

475. Генетична ідентифікація і паспортизація порід та ліній птиці: методичні рекомендації / О. П. Подстрешний та ін. Бірки, 2009. 76 с.

476. Буркат В. П., Єфіменко М. Я., Подоба Б. Є., Дзіцюк В. В. Наукові і прикладні аспекти генетичного моніторингу у тваринництві. *Вісник аграрної науки*. 2003. № 5. С. 32–39.

477. Филенко А. Л., Васильев В. А., Миделашвили В. В., Моисеева И. Г., Севастьянова А. А., Семенова С. К. Генетическая дифференциация пород *Gallus Gallus* L. с помощью ДНК-фингерпринтинга. *Разведения и генетика животных*. 2013. № 47. С. 86–93.

478. Hillel J., Groenen M. A. M., Tixier-Boichard M., Korol V. A., David L., Kirzhner V. M., Burke T., Barre-Dirie A., Crooijmans R. P. M. A., Elo K., Feldman M. W., Freidlin P. J., Maki-Tanila A., Oortwijn M., Thomson P., Vignal A., Wimmers K., Weigend S. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genet. Sel. Evol.* 2003. Vol. 35. P. 533–557.

479. Butler J. M. *Forensic DNA Typing, Second Edition: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. Elsevier Academic Press, 2005. 688 p.

480. Olejniczak M., Krzyzosiak W. J. Genotyping of simple sequence repeats – factors implicated in shadow band generation revisited. *Electrophoresis*. 2006. Vol. 27. P. 3724–3734.

481. Хвостик В. П., Катеринич О. О., Руда С. В. Генетична структура популяцій курей вітчизняного генофонду за поліморфними локусами білків яєць. *Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб.* 2014. Вип. 72. С. 88–95.

482. Подстрешний О. П. Генетична паспортизація ліній та порід курей.
Птахівництво: Міжвід. темат. наук. зб. 2008. Вип. 61. С. 107–116.

ДОДАТКИ

Додаток 1



(11) 123147

(19) UA

(51) МПК
G01N 33/483 (2006.01)

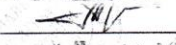
- | | | | |
|---|-------------------------|-------------------|---|
| (21) Номер заявки: | u 2017 09210 | (72) Винахідники: | Кулібаба Роман
Олександрович, UA,
Ляшенко Юрій
Володимирович, UA,
Юрко Поліна Сергіївна, UA |
| (22) Дата подання заявки: | 18.09.2017 | | |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: | 12.02.2018 | | |
| (46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: | 12.02.2018,
Бюл. № 3 | (73) Власник: | ІНСТИТУТ ТВАРИННИЦТВА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ,
вул. 7 Гвардійської Армії, 3,
смт Кулиничі, м. Харків,
Харківський р-н, Харківська
обл., 62404, UA |

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ КОНТРОЛЮ ДЕНАТУРАЦІЇ ДНК ПРИ ВИКОРИСТАННІ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ У ПОЛІАКРИЛАМІДНОМУ ГЕЛІ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб контролю денатурації ДНК при використанні електрофорезу у поліакриламідному гелі застосовується шляхом проведення електрофоретичного розподілу у денатуруючому поліакриламідному гелі ампліфікованих мікросателітних локусів, який відрізняється тим, що додатково до дослідних проб у кожному гелі використовують контрольний зразок, який містить ампліфікований цільовий фрагмент ядерної ДНК гомозиготної особини виду Gallus gallus, що містить у своєму складі динуклеотидний мотив (мікросателіт), після проведення електрофорезу у випадку досягнення повної (ефективної) денатурації дослідних проб у контрольному зразку в наявності лише один фрагмент ДНК, наявність більшої кількості фрагментів ДНК вказує на неповне досягнення умов денатурації та, відповідно, на необхідність повторення процедури електрофоретичного розподілу дослідних проб.

Затверджує:
 Директор ДДСП НААН
 О.В. Терещенко
 „ 7 ” грудня 2015р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Розробки лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики (генетичний паспорт)

Ми, що нижче підписалися, завідувач лабораторії Кулібаба Р.О., с.н.с. Ляшенко Ю.В., н.с. Юрко П.С., н.с. Лютий Ю.С. склали даний акт у тому, що при виконанні досліджень за етапом 26.01.01.01.Ф.05. “Провести виробничу перевірку асоціативних зв'язків комплексів виявлених маркерних ознак з господарчо-корисними показниками” впроваджено методики визначення ДНК-поліморфізму з використанням полімеразної ланцюгової реакції та рестрикційного аналізу. В ході досліджень розроблено генетичний паспорт популяції курей породи бірківська барвіста за локусом пролактину (24 Indel та C-2402T), сформовано мікролінію курей з гаплотипом IC, що характеризуються підвищеною на 10 – 15 яєць несучістю. Птиця посаджена в умовах експериментальної ферми «Збереження державного генофонду птиці» ДДСП НААН в окремих клітках з метою подальшого розмноження та створення нової високопродуктивної лінії з бажаними генотипами за різними локусами. Зразок генетичного паспорта додається.

Завідувач лабораторії

 Кулібаба Р.О.

Старший науковий співробітник

 Ляшенко Ю.В.

Науковий співробітник

 Юрко П.С.

Науковий співробітник

 Лютий Ю.С.

Згідно з оригіналом

Всесвітній секретар ДДСП НААН



С.М. Тарасюк



Затверджую:

Директор ДДСП НААН

О.В. Терещенко

2015р.

Акт

від 21 вересня 2015 року

виробничої перевірки асоціативних зв'язків комплексів виявлених маркерних ознак з господарчо-корисними показниками

Ми, що нижче підписалися, завідувач лабораторії Кулібаба Р.О., с.н.с. Ляшенко Ю.В., н.с. Юрко П.С., н.с. Лютий Ю.С., п.н.с. Руда С.В. склали даний акт у тому, що з 07.12.2014 по 30.06.2015 при виконанні досліджень за етапом 26.01.01.01.Ф.05. "Провести виробничу перевірку асоціативних зв'язків комплексів виявлених маркерних ознак з господарчо-корисними показниками" в умовах експериментальної ферми «Збереження державного генофонду птиці» ДДСП НААН було проведено виробничу перевірку зв'язку виявлених поліморфних маркерів з ячною продуктивністю курей породи бірківська барвіста. Порівнювали дві групи курей породи бірківська барвіста з різними гаплотипами за локусом пролактину (*IC* та *DT*) за показниками ячної продуктивності. Гаплотип *IC* відповідає наявності інсерції розміром 24 п.н. в промоторній ділянці та наявності залишку цитозину в положенні -2402 гену пролактину. В свою чергу гаплотип *DT* відповідає відсутності інсерції в промоторній ділянці та наявності тиміну в положенні -2402 гену пролактину. За результатами досліджень показано, що ячна продуктивність на початкову несучку у групі курей з гаплотипом *IC* (129,25 шт. яець) була на ~ 17 % вища ніж у групі курей з гаплотипом *DT* (109,59 шт. яець). Ячна продуктивність на середню несучку у групі курей з гаплотипом *IC* (132,63 шт. яець) була на ~ 16 % вища ніж у групі курей з гаплотипом *DT* (114,27 шт. яець). Середня інтенсивність несучості за продуктивний період для груп курей з гаплотипами *IC* та *DT* склала 62,56 та 53,9 %.

Завідувач лабораторії

Кулібаба Р.О.

Старший науковий співробітник

Ляшенко Ю.В.

Науковий співробітник

Юрко П.С.

Провідний науковий співробітник

Руда С.В.

Науковий співробітник

Лютий Ю.С.

Згідно з оригіналом

власний секретар ДДСП НААН



О.М. Галюкова

Додаток 1

Загальні показники дослідної птвиці (групи курей з різними генотипами)

№ клітки	Гапло тип	Місяць						За весь період	
		Грудень	Січень	Лютий	Березень	Квітень	Травень		Червень
Вал яйця, шт									
№№93,9 6,101	DT	82	433	382	425	384	377	328	2411
№№94,9 5,97- 100,102	IC	249	1267	1144	1197	1151	1132	969	7109
Σ		331	1700	1526	1622	1535	1509	1297	9520
Поголів'я на початок періоду									
№№93,9 6,101	DT	22	21	21	21	21	21	21	22
№№94,9 5,97- 100,102	IC	55	54	54	54	53	53	53	55
Σ		77	75	75	75	74	74	74	77
Середнє поголів'я за період									
№№93,9 6,101	DT	22	21	21	21	21	21	21	21,1
№№94,9 5,97- 100,102	IC	54,7	54	54	53,2	53	53	53	53,6
Σ		76,7	75	75	74,2	74	74	74	74,7
Збереженість, %									
№№93,9 6,101	DT								95,5
№№94,9 5,97- 100,102	IC								96,4
Σ									96,1
Яєць на початкову несучку, шт									
№№93,9 6,101	DT	3,73	20,62	18,19	20,24	18,29	17,95	15,62	109,59
№№94,9 5,97- 100,102	IC	4,53	23,46	21,19	22,17	21,72	21,36	18,28	129,25
Σ		4,30	22,67	20,35	21,63	20,74	20,39	17,53	123,64
Яєць на середню несучку, шт									
№№93,9 6,101	DT	3,73	20,62	18,19	20,24	18,29	17,95	15,62	114,27
№№94,9 5,97- 100,102	IC	4,55	23,46	21,19	22,50	21,72	21,36	18,28	132,63
Σ		4,32	22,67	20,35	21,86	20,74	20,39	17,53	127,44
Інтенсивність, %									
№№93,9 6,101	DT	12,02	66,51	64,97	65,28	60,95	57,91	52,06	53,90
№№94,9 5,97- 100,102	IC	14,68	75,69	75,66	72,58	72,39	68,90	60,94	62,56
Σ		13,92	73,12	72,67	70,52	69,14	65,78	58,42	60,11

Згідно з оригіналом
Вчений секретар ДДСТ НААН



С.М.Тарасюк

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної,
наукової роботи та міжнародних
зв'язків Полтавської державної
аграрної академії, професор

О.О.Горб


« 6 » лютого 2018 р.

КАРТКА ЗВОРОТНОГО ЗВ'ЯЗКУ

Викладені в інформаційному листі данні дисертаційної роботи на тему: «Теоретичне обґрунтування та практична реалізація маркер-асоційованої селекції українських локальних порід курей», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика, виконаної Кулібабою Романом Олександровичем використовуються у навчальному процесі при викладенні дисциплін: «Технологія виробництва продукції птахівництва»; «Інноваційні технології у тваринництві» у підготовці фахівців ОР «Бакалавр» та «Магістр» зі спеціальності «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва.

Матеріали наукової роботи Кулібаби Р.О. розглянуто на засіданні кафедри Технології виробництва продукції тваринництва і використовуються при викладанні матеріалу студентам з дисциплін: «Технологія виробництва продукції птахівництва»; «Інноваційні технології у тваринництві» та у науковій роботі кафедри (протокол №8 від 6 лютого 2018 року).

Декан факультету технології виробництва
і переробки продукції тваринництва
доктор сільськогосподарських наук,
професор



А.А.Поліщук

Затверджую:

Ректор Харківської державної
зооветеринарної академії



Д.І. Барановський
«9» лютого 2018 р.

АКТ

Про впровадження результатів
докторської дисертаційної роботи
у навчальний процес

Даним актом підтверджується, що результати наукових досліджень кандидата с.-г. наук, завідувача лабораторії молекулярно –генетичних і фізіолого – біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН України Кулібаби Романа Олександровича, що викладено у дисертаційній роботі на тему «Теоретичне обґрунтування та практична реалізація маркер- асоційованої селекції українських локальних порід курей», на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика (сільськогосподарські науки) впроваджено у навчальний процес Харківської державної зооветеринарної академії.

Викладені у роботі теоретичні і практичні положення використовуються при вивченні студентами факультету біотехнології та природокористування за першим та другим ступенем вищої освіти Харківської державної зооветеринарної академії таких дисциплін, як: «Основи молекулярної біотехнології та генної інженерії» та «Молекулярна біотехнологія».

Довідка видана для подання у спеціалізовану вчену раду за місцем захисту дисертації на здобуття вченого ступеня доктора сільськогосподарських наук.

Декан факультету
кандидат с.-г. наук, доцент

О.В.Щербак

Затверджую:

Ректор Харківської державної
зооветеринарної академії

Д.І.Барановський

«6» лютого 2018 р.

АКТ

про впровадження результатів
докторської дисертаційної роботи
у навчальний процес

Даним актом підтверджується, що результати наукових досліджень кандидата с.-г. наук, завідувача лабораторії молекулярно –генетичних і фізіолого – біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН України Кулібаби Романа Олександровича, що викладено у дисертаційній роботі на тему «Теоретичне обґрунтування та практична реалізація маркер- асоційованої селекції українських локальних порід курей», на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика (сільськогосподарські науки) впроваджено у навчальний процес Харківської державної зооветеринарної академії.

Викладені у роботі теоретичні і практичні положення використовуються при вивченні студентами факультету технологій продукції тваринництва та менеджменту за рівнем вищої освіти бакалавр і магістр таких дисциплін « Технологія виробництва продукції птахівництва», «Інноваційні технології виробництва продукції тваринництва», «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва» Харківської державної зооветеринарної академії.

Довідка видана для подання у спеціалізовану вчену раду за місцем захисту дисертації на здобуття вченого ступеня доктора сільськогосподарських наук.

Декан факультету


кандидат с.-г. наук, доцент

Завідувач кафедри технології тваринництва

та птахівництва

В.А.Федяев

Т.М.Данілова

Затверджую
Директор Липковатівського аграрного коледжу
 М. П. Таркан
02 травня 2018 р.



АКТ

про впровадження результатів докторської дисертаційної роботи
у навчальний процес

Даним актом підтверджується, що результати наукових досліджень кандидата сільськогосподарських наук, завідувача лабораторії молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН України Кулібаби Романа Олександровича, викладені у дисертаційній роботі на тему «Теоретичне обґрунтування та практична реалізація маркер-асоційованої селекції українських локальних порід курей», на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика, впроваджено у навчальний процес Липковатівського аграрного коледжу.

Викладені у роботі теоретичні і практичні положення використовуються при викладанні спецкурсу «Основи генетики та селекції сільськогосподарських тварин» студентам технологічного відділення Липковатівського аграрного коледжу за спеціальністю «Виробництво і переробка продукції тваринництва».

Заступник директора
з навчальної роботи


В. В. Голоवेशко

Завідувач
технологічного відділення


Т. М. Коломієць

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

1. **Кулибаба Р. А.**, Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Генетическая дифференциация пород кур украинской селекции с использованием различных типов молекулярно-генетических маркеров. *Сельскохозяйственная биология*. 2018. Т. 53, № 2. С. 282–292. (Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).

2. **Кулибаба Р. А.** Особенности генетической структуры популяции кур породы род-айленд красный по локусам количественных признаков. *Цитология и генетика*. 2018. Т. 52, № 3. С. 25–32.

3. **Кулибаба Р. А.**, Ляшенко Ю. В. К вопросу об образовании конформационных химерных молекул в процессе амплификации динуклеотидных tandemных повторов. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2017. Т. 22. С. 34–42. (Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).

4. **Кулибаба Р. А.**, Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Новый AluI-полиморфизм в четвертом интроне гена гормона роста кур. *Цитология и генетика*. 2017. Т. 51, № 1. С. 69–75. (Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).

5. **Кулибаба Р. А.**, Ляшенко Ю. В. Влияние артефактов ПЦР на эффективность генотипирования по микросателлитным локусам при использовании электрофореза в нативных полиакриламидных гелях. *Цитология и генетика*. 2016. Т. 50, № 3. С. 16–23. (Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).

6. **Кулибаба Р. А.** Анализ встречаемости мутации G2032A MX гена в популяциях кур различных пород украинской селекции. *Зоотехническая наука Белоруссии. Сборник научных трудов*. 2016. Т. 1 (ч. 1). С. 112–119.

7. **Кулибаба Р. А.,** Юрко П. С., Ляшенко Ю. В. MspI-полиморфизм четвертого интрона гена гормона роста в популяциях кур различных пород. Анализ причин возникновения дополнительного паттерна рестрикции. *Цитология и генетика*. 2015. Т. 49, № 6. С. 30–37. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).*

8. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм генов гормона роста, рецептора гормона роста, пролактина и рецептора пролактина в связи с яичной продуктивностью у кур породы полтавская глинистая. *Сельскохозяйственная биология*. 2015. Т. 50, № 2. С. 198–207.

9. **Кулибаба Р. А.** Связь функционального полиморфизма целевых генов (PRL, GH, GHR) с продуктивными признаками яичных кур украинской селекции. *Генетика и разведение животных*. 2015. № 3. С. 75–80.

10. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм генов семейства трансформирующих ростовых факторов-бета в линиях кур украинской селекции. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2014. Т. 17. С. 97–104.

11. **Кулибаба Р. А.,** Подстрешный А. П. Полиморфизм генов пролактина и гормона роста в линиях кур украинской селекции. *Цитология и генетика*. 2012. № 6. С. 75–83. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).*

Публікації у наукових фахових виданнях України

12. **Кулібаба Р. О.,** Юрко П. С., Ляшенко Ю. В. Аналіз розподілу гаплотипів у локусах пролактину та інсуліноподібного ростового фактору-I у популяціях курей різних порід. *Вісник аграрної науки*. 2018. № 3 (780). С. 30–34.

(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).

13. **Кулібаба Р. О.** Генетична структура популяції курей лінії 02 породи род-айленд червоний за поліморфізмом мікросателітної ДНК. *Таврійський науковий вісник*. 2018. Вип. 100. Т. 1, С. 167–172.

14. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В. Аналіз генетичної диференціації субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей з використанням мікросателітних маркерів. *Вісник аграрної науки причорномор'я*. 2018. Вип. 1. С. 164–175. (Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).

15. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В. Мікросателітна мінливість у популяціях курей українських локальних порід. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького*. 2018. Т. 20, № 84. С. 70–76. (Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).

16. **Кулібаба Р. О.** Використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки селекційної роботи з популяціями курей українських локальних порід. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2017. № 118. С. 104–113.

17. **Кулібаба Р. О.** Продуктивні якості курей порід української селекції різних генотипів за локусами родини трансформуючих ростових факторів бета. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2017. № 117. С. 86–93.

18. **Кулібаба Р. О.** Аналіз зв'язку алельних варіантів генів IGF-I, GH та PIG-1 з продуктивними ознаками курей породи бірківська барвіста. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького*. 2017. Т. 19, № 79. С. 53–57.

19. **Кулібаба Р. О.** Розподіл GHR-алелів у популяціях курей різних порід. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2016. № 116. С. 54–61.

20. **Кулібаба Р. О.** Порівняльний аналіз продуктивних якостей двох експериментальних мікроліній курей породи бірківська барвіста. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2016. № 115. С. 127–133.

21. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В. Генетико-популяційний аналіз ліній курей української селекції за локусом IGF-I. *Тваринництво України*. 2015. № 11. С. 11–16. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).*

22. **Кулібаба Р. О.** Утворення гетеродуплексної ДНК при ампліфікації фрагментів генів TGF- β 2 та CHD у птахів. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2015. № 114. С. 77–83.

23. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В. Динаміка генетичної структури популяції курей породи бірківська барвіста за локусами кількісних ознак. *Сучасне птахівництво*. 2015. № 11-12. С. 14–20. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

24. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Оптимізація різних етапів ПЛР при ампліфікації промоторної ділянки гену TGF- β 2. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2014. Вип. 72. С. 30–37. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

25. **Кулибаба Р. А.,** Ляшенко Ю. В. Сравнительный анализ эффективности использования агарозных и полиакриламидных гелей в молекулярно-генетических исследованиях. *Птахівництво. Міжвід. темат. наук. збірник*. 2014. Вип. 71. С. 88–99. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

26. **Кулибаба Р. А.** SacI-полиморфизм гена гормона роста в популяциях кур пород белый плимутрок, борковская барвистая и полтавская глинистая. *Сучасне птахівництво*. 2013. № 7. С. 21–24.

27. **Кулібаба Р. О.**, Білецька Г. В., Ткачик Т. Е. Генетична структура курей з різною чутливістю до хвороби Марека за локусом *Mx*-гену. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2013. Вип. 69. С. 167–173. (Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).

28. **Кулібаба Р. О.** Алельний поліморфізм гену *pit-1* у двох лініях курей різного напрямку продуктивності. *Сучасне птахівництво.* 2012. № 11. С. 9–12.

29. **Кулібаба Р. О.**, Подстрешний О.П. Визначення статі птиці з невираженим статевим диморфізмом з використанням полімеразної ланцюгової реакції. *Сучасне птахівництво.* 2012. № 5. С. 18–23. (Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).

30. **Кулибаба Р. А.** Генетическая структура линий кур разного направления продуктивности по локусу рецептора гормона роста. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2012. Вип. 69. С. 26–32.

31. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм гена инсулиноподобного ростового фактора-I в линии мясо-яичных кур отечественной селекции. *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб.* 2012. Вип. 68. С. 250–256.

32. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм гена инсулиноподобного ростового фактора-I в популяции кур породы «Борковская барвистая». *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво».* 2012. Вип. 12 (21). С. 90–93.

Наукові праці апробаційного характеру

33. **Кулибаба Р. А.** Анализ связи аллелей гена *Mx* с хозяйственно-полезными признаками кур разных направлений продуктивности. *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства:* материалы XX Международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию образования кафедр крупного животноводства и переработки

животноводческой продукции; свиноводства и мелкого животноводства УО БГСХА. Горки, 2017. С. 77–81.

34. Shulika L. V., **Kulibaba R. O.** Genetic structure of Rhode-Island Red chicken breed population on PRL and INS loci. Associations between genotype and chicken productivity. *14th International Symposium of Animal Biology and Nutrition*. Bucharest, 28-29 September 2017, Bucharest. Bucharest, 2017. P. 33. (Дисертант провів частину досліджень, аналіз отриманих даних, підготував статтю).

35. **Кулібаба Р. О.** Аналіз причин типових помилок при інтерпретації даних електрофоретичного розподілу фрагментів ДНК. *Науковий прогрес в тваринництві і птахівництві: Матеріали XI Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених* (Харків, 25-26 вер. 2017 р.). Харків, 2017. С. 12–14.

36. **Кулібаба Р. О.** Моніторинг розповсюдження мутації G2032A Мх гена в популяціях курей української селекції. *Практичні результати та методичні аспекти досліджень з розведення, генетики та біотехнології у тваринництві: матеріали XIV Всеукраїнської наукової конференції молодих учених та аспірантів, присвяченої пам'яті академіка УААН Валерія Петровича Бурката*. Чубинське, 2016. С. 36–37.

37. **Кулібаба Р. О.** Особливості генотипування птиці за гемізіготними локусами з використанням молекулярно-генетичних маркерів. *Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві: матеріали X Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених* (Харків, 11-12 жовт. 2016 р.). Харків, 2016. С. 12–14.

38. **Kulibaba R. A.**, Tereshchenko A. V. Transforming growth factor β 1, pituitary-specific transcriptional factor 1 and insulin-like growth factor I gene polymorphisms in the population of the Poltava clay chicken breed: association with productive traits. *Agricultural Science and Practice*. 2015. Vol. 2 (1). P. 67–72. (Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).

39. **Кулібаба Р. О.** Використання гетеродуплексного аналізу як альтернативи методу ПЛР-ПДРФ для генотипування особин птиці. *Актуальні дослідження з проблем розведення та генетики у тваринництві: матеріали XIII всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та аспірантів, присвяченої*

пам'яті академіка НААН Михайла Васильовича Зубця. Чубинське, 2015. С. 29–30.

40. **Кулібаба Р. О.**, Руда С. В. Генетична характеристика популяції курей лінії Г2 породи плімутрок білий за біохімічними та ДНК-маркерами. *Птахівництво 2015: Матеріали XI міжнародної конференції* (Трускавець, 15 – 17 верес. 2015 р.). Трускавець, 2015. С. 54–59. *(Дисертант провів частину досліджень, аналіз отриманих даних, підготував статтю).*

41. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм генов PRL, PRLR, GH, GHR, PIT-1, IGFI, TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3 в линиях кур украинской селекции. *Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России: материалы XVIII международной конференции ВНАП*. Сергиев Посад, 2015. С. 72–74.

42. **Кулибаба Р. А.**, Ляшенко Ю. В. Определение пола птиц отряда *Psittaciformes* с использованием полимеразной цепной реакции. *Молекулярная диагностика 2014*. Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Москва, 2014. Т. 2. С. 517–518. *(Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

43. **Кулибаба Р. А.** Маркер-ассоциированная селекция – ключ к решению проблемы насиживания. *Сучасні досягнення у тваринництві та птахівництві: матеріали VIII всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених*. Харків, 2014. С. 40–42.

44. **Кулибаба Р. А.** Полиморфизм генов семейства TGF- β в популяциях кур украинской селекции. *Сучасні досягнення в тваринництві та птахівництві: матеріали VII всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених*. Мартова. 2013. С. 47–48.

45. **Кулибаба Р. А.**, Терещенко А. В. Определение пола птиц с невыраженным половым диморфизмом методом полимеразной цепной реакции. *Инновационные разработки и их освоение в промышленном птицеводстве: материалы XVII международной конференции*. Сергиев Посад,

2012. С. 79–80. (*Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку*).

46. **Кулібаба Р. О.** Поліморфізм генів PRL, GH, GHR, IGF-I та PIT1 у м'ясо-яєчних та яєчних курей вітчизняної селекції. *Здоров'я тварин – екологічне благополуччя України: матеріали науково-практичної інтернет-конференції*. Тернопіль, 2012. С. 24–27.

47. **Kulibaba R. O.,** Podstreshnyi O. P., Tereshchenko O. V. Polymorphism of the prolactin gene promoter in two chicken lines of Ukrainian selection. *The 3rd Mediterranean Poultry Summit AND The 6th International Poultry Conference*. 2012. URL: <http://www.mpn-wpsa.org/3rdmps/search/abstract.php?ida=10134/> (last access: 22.05.17). Title from the screen. (*Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку*).

48. **Кулибаба Р. А.,** Кривохижая М. В. Определение пола птиц методом полимеразной цепной реакции. *Голубівництво та декоративне птахівництво: історія, проблеми, перспективи: матеріали міжнарод. науково-практ. конф., 11-12 червня 2011 р. Миколаїв, 2011. С. 129–134.* (*Дисертант провів дослідження і аналіз даних, підготував статтю до друку*).

49. **Кулібаба Р. О.,** Подстрешний О. П., Подстрешна І. О. Генетична ідентифікація і паспортизація ліній і порід птиці. *Аграрна наука – виробництву*. 2011. № 3. С. 23. (*Дисертант провів частину досліджень, аналіз отриманих даних, підготував статтю*).

Додатково відображають наукові результати дисертації

50. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів (PCR-RFLP, Indel) у селекційній роботі з птицею порід Полтавська глиняста та Бірківська барвіста: методичні рекомендації. Бірки: Державна дослідна станція птахівництва НААН, 2015. 18 с. (*Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків*).

51. **Кулібаба Р. О.,** Ляшенко Ю. В., Юрко П. С. Спосіб контролю денатурації ДНК при використанні електрофорезу у поліакриламідному гелі: патент на корисну модель № 123147, МПК: G01N 33/483. № u201709210; заявл. 18.09.2017; опубл. 12.02.2018. Бюл. № 3. 3 с. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, збирання інформації, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів, формування висновків).*

Відомості про апробацію результатів дисертації

Результати досліджень доповідались і одержали позитивну оцінку на міжнародних науково-практичних конференціях:

- IV Українська молодіжна конференція по птахівництву, Задонецьке, 7-9 вересня 2010 р. *(очна форма – доповідь на секційному засіданні);*
- Міжнародна науково-практична конференція «Голубівництво та декоративне птахівництво: історія, проблеми, перспективи», Миколаїв, 11-12 червня 2011 р. *(заочна форма – публікація тез);*
- VI Українська молодіжна конференція «Новітні досягнення в тваринництві та птахівництві», Задонецьке, 12-14 вересня 2012 р. *(очна форма – доповідь на секційному засіданні);*
- Науково-практична інтернет конференція «Здоров'я тварин – екологічне благополуччя України», Тернопіль, 10 жовтня 2012 р. *(заочна форма – публікація тез);*
- XIII Українська конференція з птахівництва «Актуальні проблеми сучасного птахівництва», Алушта, 17-20 вересня 2012 р. *(очна форма – доповідь на секційному засіданні);*
- «The 3rd Mediterranean Poultry Summit and The 6th International Poultry Conference», Alexandria, 26-29 березня 2012 р. *(заочна форма – публікація тез);*
- XVII Международная конференция «Инновационные разработки и их освоение в промышленном птицеводстве», Сергіїв Посад, 2012 *(заочна форма – публікація тез);*

- VII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Сучасні досягнення в тваринництві та птахівництві», Мартова, 11-13 вересня 2013 р. *(очна форма – доповідь на секційному засіданні, публікація тез)*;
- IX Міжнародна конференція «Птахівництво 2013», Судак, 22-26 вересня *(очна форма – доповідь на секційному засіданні)*;
- XIV Українська конференція з птахівництва з міжнародною участю «Актуальные проблемы современного птицеводства», Алушта, 16-19 вересня *(очна форма – доповідь на секційному засіданні)*;
- VIII Всеросійська науково-практична конференція з міжнародною участю «Молекулярная диагностика 2014», Москва, 2014 *(заочна форма – публікація тез)*;
- VIII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Сучасні досягнення у тваринництві та птахівництві», Харків, 16-17 жовтня 2014 р. *(очна форма – доповідь на секційному засіданні, публікація тез)*;
- XI Міжнародна конференція «Птахівництво 2015», Трускавець, 15-18 вересня 2015 р. *(заочна форма – публікація тез)*;
- IX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених «Сучасні досягнення і перспективи розвитку тваринництва та птахівництва. Погляд молодих учених», Харків, 10-11 вересня 2015 р. *(очна форма – доповідь на секційному засіданні)*;
- XIII Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених та аспірантів, присвячена пам'яті академіка НААН Михайла Васильовича Зубця «Актуальні дослідження з проблем розведення та генетики у тваринництві», Чубинське, 28 травня 2015 р. *(заочна форма – публікація тез)*;
- XVIII Міжнародна конференція «Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России», Сергіїв Посад, 2015 *(заочна форма – публікація тез)*;
- IX Украинская конференция по птицеводству и инкубации яиц сельскохозяйственной птицы, Харків, 29-30 листопада 2016 р. *(очна форма – доповідь на секційному засіданні)*;

– XIV Всеукраїнська наукова конференція молодих учених та аспірантів, присвячена пам'яті академіка УААН Валерія Петровича Бурката «Практичні результати та методичні аспекти досліджень з розведення, генетики та біотехнології у тваринництві», Чубинське, 20 травня 2016 р. *(заочна форма – публікація тез)*;

– X Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві», Харків, 11-12 жовтня 2016 р. *(очна форма – доповідь на секційному засіданні, публікація тез)*;

– XX Міжнародна науково-практична конференція «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства», Горки, 1-2 червня 2017 р. *(заочна форма – публікація тез)*;

– XI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Науковий прогрес в тваринництві і птахівництві», Харків, 25-26 вересня 2017р. *(очна форма – доповідь на секційному засіданні, публікація тез)*;

– 14th International Symposium of Animal Biology and Nutrition, Бухарест, 28-29 вересня 2017 р. *(заочна форма – публікація тез)*.