

УДК 575:636.2

Супрович Т. М.

доктор сільськогосподарських наук,
завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби
Національної поліції України,
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»
Кам'янець-Подільський, Україна
E-mail: suprovycht@gmail.com
ORCID: 0000-0003-4708-6692

Супрович М. П.

кандидат технічних наук,
доцент кафедри фізики, охорони праці та інженерії середовища,
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»
Кам'янець-Подільський, Україна
E-mail: kokas2008@ukr.net
ORCID: 0000-0001-6614-8823

Бандура В. В.

аспірант кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби
Національної поліції України,
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»
Кам'янець-Подільський, Україна
E-mail: vasil.bandura.95@gmail.com
ORCID: 0009-0007-1964-9028

Чорний І. О.

асистент кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби
Національної поліції України,
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»
Кам'янець-Подільський, Україна
E-mail: chorniyigor78@gmail.com
ORCID: 0000-0003-2161-4098

ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ НА ОСНОВІ ДНК-МАРКЕРІВ

Анотація

Здобутки молекулярної генетики розкривають перспективи формування теоретичного та практичного базису сучасної селекційно-плеємної діяльності у тваринництві. Генетичні дослідження сільськогосподарських тварин направлені на вичерпну оцінку їхніх плеємних якостей на основі генетичної інформації, яка пов'язана з окремими генами або генними комплексами. Практична робота з генетичним матеріалом і можливість прискорення селекційної роботи, завдяки отриманню нових знань у галузі генетики, нині прямо асоціюються з використанням генетичних маркерів.

Метод генетичних маркерів полягає в ідентифікації окремих генів, ділянок ДНК, хромосом або окремих особин виду за допомогою притаманних лише їм сполучень нуклеотидів. Більшість сучасних маркерів пов'язані зі структурою ДНК, що дозволяє тестувати генетичну мінливість не на рівні продуктів експресії гена, а на рівні геному. Ця особливість зумовила повальне поширення ДНК-маркерів після винайдення ПЛР.

У статті розглянуто теоретичні аспекти генетичних маркерів, їхні переваги за властивостями, зручністю та кількісними можливостями в порівнянні із класичними та білковими маркерами. Наведено перелік найбільш поширених ДНК-маркерів, вимоги до них, показано переваги та недоліки застосування на практиці. Охарактеризовано основні маркери (ISSR, RFLP, SNP, SSR), які застосовуються в генетичних дослідженнях сільськогосподарських тварин. Детально розглянуто метод секвенування, якому на тепер належить основне місце в таких дослідженнях, а також сучасні методи виявлення SNP, що базуються на ньому.

Наведено огляд основних генетичних досліджень у галузі вітчизняного тваринництва, які базуються на маркерній селекції.

Ключові слова: молекулярні маркери, полімеразна ланцюгова реакція, типи ДНК-маркерів, секвенування, алелі.

Вступ. Поєднання концепцій визначення поняття біологічної еволюції з погляду популяційної та молекулярної генетики дає змогу трактувати її як зміну протягом поколінь частоти алелів у популяції, які формують її генофонд. Генетична структура популяції характеризується якісним складом генів (певними частотами алелів)

і генотипів. Виявлені особливості їх розподілу лежать в основі генетико-популяційного аналізу, у якому важливе місце належить розділу, присвяченому пошуку асоціацій у системі «ген – фенотипова ознака». Очевидно, що постає цілком зрозуміле питання про інструменти виявлення таких особливостей. Натепер основний інструмент дослідження генетичної структури полягає у використанні ДНК-маркерів.

Роль ДНК-маркерів у сучасній генетиці важко переоцінити. Успіхи в розвитку генетичних досліджень зумовлені наявністю інформативних генетичних маркерів. З їх допомогою складено докладні молекулярні карти геному людини, багатьох видів рослин і тварин, де визначено найважливіші гени, що визначають зростання та розвиток організмів, морфологічні ознаки, стійкість до захворювань та інші властивості. Наприклад, у найбільш вивченому геномі людини визначено 5 генів TP53, TNF, EGFR, VEGFA і APOE (щось на зразок «топ-хітів» геному людини), які формують уявлення про формування ракових захворювань, росту ендотелію судин, роль у метаболізмі холестерину та ліпопротеїнів тощо [5].

Молекулярні маркери широко використовуються в популяційній генетиці, порівняльній генетиці та геноміці, у філогенетичних дослідженнях. Так, селекція за допомогою ДНК-маркерів значно скоротила час для виведення на ринок нових сортів сільськогосподарських культур [7].

Геномна селекція та відбір за допомогою маркерів (*MAS – marker-assisted selection*) має велике значення у тваринництві, адже покращення виробництва шляхом використання молекулярно-генетичних маркерів сприяє розробці нових програм селекції, сучасних моделей для генетичної оцінки порід і видів тварин. Значно спрощується процедура відбору, особливо у видів із довгими циклами розмноження [11] або для тих ознак, які мають низьке успадкування, або для яких вимірювання фенотипу є складним, дорогим або можливим лише в пізньому віці [19]. Аналіз зчеплення, асоціації з корисною ознакою або захворюванням та функції гена можна використовувати для визначення поліморфізмів, які є корисними маркерами для бажаних ознак [2]. Завдяки використанню різних систем ДНК-маркерів є можливість проводити дослідження локусів кількісних ознак (*QTL – quantitative trait loci*), моніторинг генних аномалій, видового і породного генетичного різноманіття тощо [28]. Створена база даних локусів кількісних ознак тварин – важливий геномний ресурс, який містить загалом 190 838 QTL або асоціацій із 2 293 публікацій для більш ніж 690 різних ознак великої рогатої худоби, курей, коней, свиней і овець (www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index).

Використання в селекційній роботі методів ДНК-аналізу на рівні генів, що відповідають за прояв QTL або зчеплених із ними генів, має низку переваг перед традиційними методами селекції, оскільки базується безпосередньо на аналізі генотипу, не залежить від впливу навколишнього середовища, надає можливість проводити відбір генетично кращих тварин на ранніх етапах їх онтогенетичного розвитку. Простота, швидкість і висока достовірність отриманих результатів дають змогу збільшити ефективність тваринництва завдяки окупності витрат на генотипування поголів'я за найбільш важливими ознаками та легко інтегрувати MAS-селекцію у виробництво.

Мета роботи. Сучасні підходи до розведення тварин тісно пов'язані з розвитком складних методів молекулярної генетики. Поширення геномної селекції в усьому світі може бути досягнуто завдяки ідентифікації генетичних ДНК-маркерів. Тому дослідження сучасного стану й особливостей їх застосування для селекції великої рогатої худоби є досить актуальною проблемою. Особливого значення в сучасній маркер-асоційованій селекції набувають не тільки питання створення високопродуктивних стад із погляду виробництва молока та м'яса. Нагальними є завдання селекційного відбору резистентних до різних захворювань тварин для зменшення ризиків виробничих втрат із-за виробництва неякісної продукції або вибракування високопродуктивних корів на ранніх лактаціях. Розглянуто різні типи ДНК-маркерів, їхні переваги та недоліки, сфери застосування. Визначено основні напрями використання генетичних маркерів в Україні.

Виклад основного матеріалу дослідження. ДНК-маркери, або молекулярно-генетичні маркери, – поліморфна ознака, яка виявляється методами молекулярної біології на рівні нуклеотидної послідовності ДНК, для певного гена або для будь-якої іншої ділянки хромосоми під час зіставлення різних генотипів, осіб, порід, сортів, ліній. Вони належать до третього покоління генетичних маркерів. Їм передували класичні білкові та білкові маркери.

Класичний генетичний маркер відповідає гену, алелі якого мають чітко виражені відмінності лише на рівні фенотипу, а білковий – гену, алелі якого мають відмінності (різну молекулярну масу) лише на рівні білкового продукту.

Молекулярний маркер, на відміну від класичного та білкового, відповідає гену або ділянці геному, що не кодує, геному, різні варіанти (алелі) якого відрізняються на рівні ДНК. Найбільш вагомий молекулярний маркер – генетичний, який по суті являє собою сегменти ДНК, розташовані у відомому положенні (локусі) певної хромосоми, зазвичай пов'язані з певними фенотиповими ознаками (продуктивність, захворюваність, якісні особливості продукції тощо), дуже корисні для виявлення різних генетичних варіацій у конкретних особин і популяцій.

Для більшості природних популяцій характерний високий рівень генетичної мінливості. Якщо оцінити продукт окремого локусу на рівні білка, то виявляється, що в популяції досить часто він містить два або більше алельних варіанти, існування яких (з відносно істотною частотою в популяції більше 1 %) називається генетичним поліморфізмом. Причина поліморфізму в даному локусі – мутації (нуклеотидні заміни, інсерції/делеції, рекомбінації тощо) [34].



Рис. 1. Переваги ДНК-маркерів за властивостями, зручністю та кількісними можливостями

Використання як маркерних систем поліморфних нуклеотидних послідовностей ДНК дозволяє тестувати генетичний поліморфізм безпосередньо на рівні генів, а не на рівні їхніх продуктів. ДНК-маркери вирішують проблему насичення геному маркерами. За їх допомогою можна маркувати практично будь-які ділянки ДНК, некодуючі також. Окрім того, така маркерна система дає можливість використовувати для аналізу будь-які тканини й органи, незалежно від стадії розвитку організму. Переваги й особливості ДНК-маркерів показано на рис. 1.

Для ефективного використання в селекції ідеальний ДНК-маркер має відповідати таким критеріям:

- високий рівень поліморфізму;
- рівномірний розподіл по всьому геному (без кластеризації в окремих регіонах);
- кодомінування в експресії (різна форма маркера повинна бути ідентифікована в диплоїдному організмі, щоб можна було відрізнити гетерозиготи від гомозигот);
- чіткі окремі алельні ознаки (щоб можна було ідентифікувати різні алелі);
- єдина копія та відсутність плейотропного ефекту;
- низька вартість використання (або рентабельність розробки маркерів і генотипування);
- простота аналізу/виявлення та можливість автоматизації;
- доступність (необмежене використання) та можливість дублювання;
- відсутність згубного впливу на фенотип [10].

За останні роки накопичено велику кількість генетичних маркерів. Але пошук нових і використання відомих маркерів продовжуються. Особливо інтенсивно ведуться пошуки в напрямі виявлення ДНК-маркерів, пов'язаних із продуктивними ознаками та хворобами сільськогосподарських тварин.

Нині налічується кілька десятків типів молекулярних маркерів. Далі приведено перелік ДНК-маркерів, які набули найбільшого поширення:

- AFLP (amplified fragment length polymorphism) – поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів;
- CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – розщеплені ампліфіковані поліморфні послідовності;
- ISSR (intersimple sequence repeats) – міжмікросателітні послідовності;
- RAPD (random amplified polymorphic DNA) – випадково ампліфікована поліморфна ДНК;
- RFLP (restriction fragment length polymorphism) – поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів;
- SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидний поліморфізм;
- SSAP (sequence-specific amplification polymorphism) – поліморфізм сіквенс-специфічної ампліфікації;
- SSCP (single strand conformation polymorphism) – однитковий конформаційний поліморфізм ДНК;
- SSR (simple sequence repeats), STMS або STR – прості повторні (тандемні) послідовності (мікросателіти).

Розглянемо більш детально ДНК-маркери, основані на застосуванні полімеразної ланцюгової реакції, які використовуються в генетичних дослідженнях тваринництва в Україні.

Досить поширеними є дослідження з використанням ДНК-маркерів на основі ПЛР із праймерами, що мають множинну локалізацію в геномі із застосуванням спеціальних праймерів. Це може бути досягнуто використанням одного короткого праймера з довільною послідовністю (RAPD – Randomly amplified polymorphic DNA та її аналогів), використанням праймерів зі штучно доданими послідовностями (адаптерами) (AFLP – Amplified fragment length polymorphism) або праймерів, комплементарних до повтору, як-от мікросателіти (ISSR – Inter-simple-sequence-repeats) або транспозони (IRAP – Inter-retransposon amplified polymorphism).

ISSR-маркери. ISSR – це фрагменти ДНК приблизно 100–3 000 п. н., розташовані між сусідніми, протилежно орієнтованими мікросателітними ділянками. ISSR ампліфікують за допомогою ПЛР із використанням мікросателітних стрижневих послідовностей, як праймерів із кількома селективними нуклеотидами для прив'язки до неповторюваних суміжних ділянок (16–18 п. н.). Такі праймери дозволяють ампліфікувати фрагменти ДНК, які перебувають між двома досить близько розташованими мікросателітними послідовностями. У результаті ампліфікується велика кількість фрагментів, представлених на електрофореграмах дискретними смугами (ISSR-фінгерпринтинг). Отримані патерни ПЛР-продуктів видоспецифічні [17; 27]. ISSR-маркери також належать до маркерів доміантного типу спадкування. Основна перевага ISSR полягає в тому, що для побудови праймера не потрібні дані для послідовності. Необхідна лише невелика кількість матричної ДНК. Окрім того, ISSR випадково розподіляються за геномом. Метод має гарну відтворюваність і поряд з AFLP може бути з успіхом використаний для виявлення міжвидової та внутрішньовидової генетичної мінливості, ідентифікації видів, популяцій, ліній, а іноді і для індивідуального генотипування [16; 27]. ISSR-маркери можуть бути використані також для картування геномів і маркування господарсько-корисних ознак [8].

Наведемо приклади вітчизняних досліджень із використанням цих маркерів. З метою вивчення особливостей генетичної структури різних порід великої рогатої худоби проведений аналіз за ISSR-маркерами з використанням як праймерів фрагментів динуклеотидних і тринуклеотидних мікросателітних локусів (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (GA)₉C [31]. За результатами аналізу генетичної структури тварин української червоно-рябої молочної, монбельярдської порід та їх помісей за міжмікросателітними ДНК-локусами встановлено, що праймери ISSR-1 та ISSR-2 є найбільш інформативними для аналізу поліморфізму ДНК великої рогатої худоби [33]. На основі ISSR-маркерів отримано інформацію про генетичну мінливість, видову, породну й індивідуальну особливості трьох м'ясних порід: абердин-ангус, герефорд і південної м'ясної породи [28]. Також встановлено, що ISSR-праймери (ACC)₆G і (GAG)₆C є породоспецифічними та можуть використовуватись як для оцінки внутрішньопородних генетичних особливостей бугаїв української чорно-рябої молочної, української білоголової та червоної польської порід [35].

Мікросателіти. Відомі під кількома назвами: STR (short tandem repeat), STMS (sequence tagged microsatellite site), SSR (simple sequence repeat) – високополіморфні маркери для індивідуальних локусів. Мікросателіти (мікроспутники) належать до диспергованих послідовностей, що тандемно повторюються, але одиниці повторів (ди-, три- і тетрануклеотиди) і загальний розмір повторюваної області зазвичай не перевищують 100 п. н. [6]. STR-маркери широко трапляються у прокаріотів і еукаріотів, включаючи людей. Вони виглядають більш-менш рівномірно розкиданими по геному людини, становлячи приблизно 3 % від усього його розміру.

Для створення STR-маркера підбираються праймери з унікальних послідовностей ДНК, які фланкують мікросателітний повтор, а це потребує попереднього знання нуклеотидної послідовності. Поліморфізм STR визначається різною здатністю до копіювання одномірних одиниць у кластері, що призводить до існування багатьох алельних варіантів. Їх гетерозиготність досить часто становить понад 75 % [6; 18].

Високий рівень поліморфізму мікросателітів, відносно рівномірний розподіл у геномі та широка представленість зробили їх надзвичайно популярними. Застосування мікросателітів під час картування геному людини дозволило поєднати фізичні та генетичні карти хромосом. Гіперваріабельні мікросателіти є універсальною системою генетичних маркерів для аналізу спадкових змін на рівні ядерної ДНК і широко використовуються в дослідженнях генетичного поліморфізму популяцій людини, рослин і тварин. Криміналістичний аналіз ДНК використовує STR-маркери, щоб установити зниклу безвісти особу, підтвердити родинні зв'язки та зв'язати зацікавлених осіб із місцем злочину. Вони мають недолік, який полягає в тому, що нерівномірність швидкості мутацій різних мікроспутників створює деякі складнощі для популяційно-генетичного аналізу [9; 22].

У плані використання мікросателітів у дослідженнях ВРХ в Україні необхідно відзначити роботи Миколаївського НАУ. Зокрема, за допомогою 11 мікросателітних маркерів, рекомендованих ISAG (BM1818, BM1824, BM2113, ETH3, ETH10, INRA023, TGLA53, TGLA122, TGLA126, TGLA227 і SPS115), проведено генетичну оцінку різноманіття червоної степової породи [13]. Десять аутосомних поліморфних мікросателітних локусів великої рогатої худоби (BM1818, BM1824, BM2113, ETH3, ETH10, INRA023, TGLA53, TGLA122, TGLA227 і SPS115) були генотиповані для оцінки різних параметрів генетичного різноманіття структури ВРХ південної м'ясної породи та виявлення домішки таурину/зебуїну в цій популяції [12]. Ці ж мікросателітні локуси застосовано для аналізу 88 зразків ДНК двох найпоширеніших молочних порід великої рогатої худоби в Україні – української червоно-рябої та української чорно-рябої молочних порід [20].

У дослідженнях українських учених широко використовуються поліморфні маркери, що базуються на тестуванні однонуклеотидних замін. **SNPs** (від англ. Single Nucleotide Polymorphism) – це однонуклеотидні позиції в геномній ДНК, для яких у популяції є різні варіанти послідовностей (алелі) із частотою рідкісного алеля не менше 1% [3]. Поліморфізм одного нуклеотиду часто називають найпоширенішим типом генетичної варіації. Кожен SNP представляє різницю в окремій ділянці ДНК, яка називається нуклеотидом. Наприклад, два секвенованих фрагменти ДНК від різних осіб, *AAGCCTA* до *AAGCTTA*, містять різницю в одному нуклеотиді. У такому разі ми говоримо, що існує два алеля: С і Т (рис. 2).

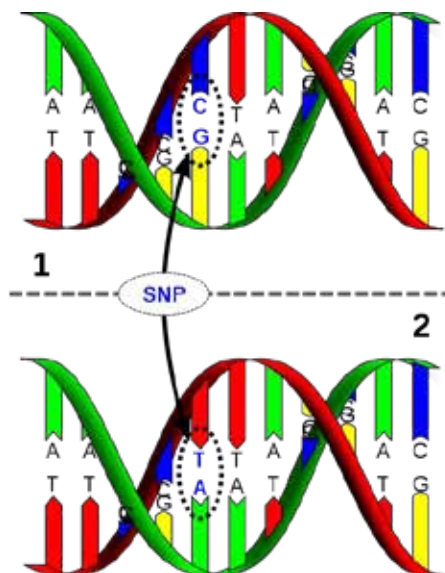


Рис. 2. Алельні варіанти за заміни одного нуклеотиду [21]

Найчастіше SNP розташовані в ДНК між генами. Вони можуть діяти як біологічні маркери, допомагати вченим знаходити гени, пов'язані із захворюваннями. Коли SNP виникають у гені або в регуляторній області поблизу гена, вони можуть відігравати більш безпосередню роль у захворюванні, впливати на його функцію.

До баз даних SNPs зазвичай включають усі невеликі зміни геномних послідовностей, невеликі інсерції/делеції (так звані "intels"), зміни кількох нуклеотидів, хоча вони і не входять до формального визначення SNPs. Зазвичай вони представлені двома алельними варіантами, хоча трапляються і триалельні SNP. Однонуклеотидні заміни надзвичайно широко розповсюджені в геномі. Наприклад, натеper у великої рогатої худоби знайдено понад 58 000 однонуклеотидних поліморфізмів [1]. Вони мають високу щільність у геномі та низький рівень мутацій у поколінні ($<10^{-8}$), що робить їх зручними маркерами молекулярної еволюції під час оцінювання великомасштабних еволюційних змін [14].

Методи тестування SNPs умовно поділяються на кілька груп (табл. 1).

Таблиця 1. Основні методи детекції алельних варіантів SNPs

<p>Ферментативні методи:</p> <ul style="list-style-type: none"> – використання ендонуклеаз рестрикції (PCR-RLFP, AFLP); – розщеплення гетеродуплексів ДНК структурно-специфічними ендонуклеазами (Cleavase I, резольвазою, нуклеазою S1 тощо); – алель-специфічна ПЛР; – ПЛР із термінацією синтезу.
<p>Методи, засновані на різній електрофоретичній рухливості поліморфних фрагментів ДНК:</p> <ul style="list-style-type: none"> – аналіз конфірмації одноланцюгових фрагментів (SSCP); – електрофорез у денатуруючому градієнтному гелі; – електрофорез у денатуруючому гелі із градієнтом температури; – гетеродуплексний аналіз.
<p>Хімічні методи аналізу гетеродуплексів:</p> <ul style="list-style-type: none"> – детекція на твердих підкладках (мікропанелях); – гібридизація на олігонуклеотидних матрицях; – ПЛР на іммобілізованих праймерах; – елонгація іммобілізованих праймерів (мінісеквенси).
<p>Фізичні методи:</p> <ul style="list-style-type: none"> – мас-спектрометрія; – резонансне гасіння флуоресценції (FRET); – люмінесценція залежна від локального оточення.
Секвенування ДНК

В Україні найбільший об'єм молекулярно-генетичних досліджень із використанням ДНК-маркерів проводиться в Інституті розведення і генетики тварин ім. Зубця (НААН України). Більшість із них пов'язано з використанням детекції алельних варіантів SNPs з використанням специфічних ендонуклеаз рестрикції на основі PCR-RLFP. У результаті проведених молекулярно-генетичних досліджень одержано результати щодо особливості генетичної структури молочних, комбінованих і м'ясних порід великої рогатої худоби. Отримані результати генотипування тварин за поліморфними локусами каппа-казеїну (κ -Cn), бета-лактоглобуліну (β LG), гормону росту (GH), лептину (LEP), гіпофізарного фактора транскрипції (PIT-1) та міостатину (MSTN) для основних українських порід ВРХ. Під час вивчення генетичної структури м'ясних порід із використанням ДНК-специфічних молекулярних маркерів проведено дослідження поліморфізму локусу TG5 гена тиреоглобуліну та локусу CAPN1 530 гена калпаїну [28]. Для виявлення молекулярно-генетичних маркерів тварин, асоційованих із гіпоалергенними властивостями молока, розроблено узагальнену методику генетичного тестування великої рогатої худоби та дрібної рогатої худоби молочного напрямку продуктивності за генами бета-казеїну (CSN2) ВРХ та капа-казеїну (CSN3), бета-лактоглобуліну (β LG) кіз [29]. Необхідно відмітити комплексні роботи, де використано декілька видів маркерів. Наприклад, проведено молекулярно-генетичну оцінку генотипів окремих бугаїв 25 порід великої рогатої худоби за локусами QTL (κ -Cn, β LG, GH, TG, CAPN1 530), ISSR-маркерами з використанням як праймерів фрагментів динуклеотидних і тринуклеотидних мікросателітних локусів (ACC)6G, (GAG)6C, (AG)9C, (GA)9C, та мікросателітними маркерами, які входять до переліку рекомендованих ISAG (BM1824, BM2113, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, ETH10, ETH225 та ETH3) [32].

Проведено аналіз продуктивних якостей корів чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід української селекції з різними генотипами за локусом IFNGR2 (мутація 1008A>G). Зокрема, визначено параметри продуктивності за кожним з наявних генотипів – AA, AG та GG [30].

Особливе місце подібним ДНК-маркерам належить у дослідженнях, пов'язаних із хворобами сільськогосподарських тварин. Так, зокрема, встановлено алелі гена BoLA-DRB3.2, тісно пов'язані з маститами [23; 25] і некробактеріозом [24]. Також проведено дослідження асоціативних зв'язків між алелями даного гена та кількістю соматичних клітин у молоці [26].

Секвенування. SBT-типсування (sequence based typing) – найточніший метод виявлення SNP, тому що проводиться пряме «читання» нуклеотидної послідовності окремої ділянки геному. Але цей метод дорогий і трудомісткий, особливо в разі масового аналізу зразків. За два останні десятиліття метод секвенування швидко розвивався, що дозволило суттєво зменшити витрати та зробити його використання рентабельним. Наведемо приклад розвитку даного методу для досліджень поліморфізму екзона 2 гена BoLA-DRB3, який відповідає за формування імунного статусу головного комплексу гістосумісності ВРХ.

SBT-типсування, як спосіб ідентифікації груп алелів BoLA-DRB3, спочатку був розроблений на основі PCR-SSP методу (sequence-specific primers – метод специфічних праймерів), раніше розроблений Takeshima et al. (2001 р.), реалізований у ПЛП з восьмима специфічними праймерами до першої гіперваріабельної області поліморфного екзона 2 гена BoLA-DRB3. Однак для цього способу PCR-SSP кожен зразок має пройти 8 раундів ПЛП і додаткові процедури секвенування, дані яких не включають перші 30 основ екзона 2 гіперваріабельної області. Цей істотний недолік, необхідність спеціального програмного забезпечення та висока вартість секвенування одного зразка сильно гальмували впровадження SBT технологій, особливо за необхідності виконання масових досліджень.

Для вирішення проблем Miltiadiou et al. (2003 р.) розробили спосіб BoLA типсування методом секвенування з декодуванням всього екзона 2 гена DRB3, попередньо ампліфікованого у двоетапній ПЛП (nested PCR) з використанням програмного пакету 400ATF.

Надалі Vaxter et al. (2008 р.) оптимізували протокол проведення PCR-SBT, що дозволило використовувати одноетапну ПЛП із застосуванням набору праймерів DRB3FRW і DRB3REV, які фланкують екзон 2 гена DRB3 повністю. На відміну від попереднього методу, який використовував вкладений праймер для ампліфікації екзона 2 з подальшим секвенуванням внутрішніми праймерами, новий метод використовує лише внутрішні праймери, як для ампліфікації, так і для секвенування, що приводить до отримання якісної послідовності для всього екзона.

Пізніше Takeshima et al. (2011 р.) скомбінували два попередні способи, запропонували вдосконалену техніку PCR-SBT для BoLA-типсування, де праймери DRB3FRW і DRB3REV, які ініціюють ампліфікацію локусу BoLA-DRB3-гена довжиною 319 п. н., також використовуються як сіквенси в дешифруванні аналізованої нуклеотидної послідовності капілярним секвенатором. Даний метод натепер є найбільш уживаний дослідниками, тому що дає можливість швидко та точно генотипувати велику кількість проб ДНК [36].

Технології виявлення SNP розвинулися з відкриттям нових методів репортерних систем, флуоресцентних зондів, розробкою ферментативних аналізів, використанням високочутливих інструментів і, головним чином, прискореної високопродуктивної технології секвенування та біоінформаційних інструментів. Натепер точність і чутливість методів виявлення підвищилися, в основному завдяки розвитку економічно ефективних способів детекції.

Основна ідея виявлення SNP полягає в тому, чи ідентифікують новий поліморфізм, який раніше не був визначений, чи шукають уже відомий поліморфізм. Методи виявлення можна розділити на дві основні групи: *in vitro* та *in silico* (рис. 3).

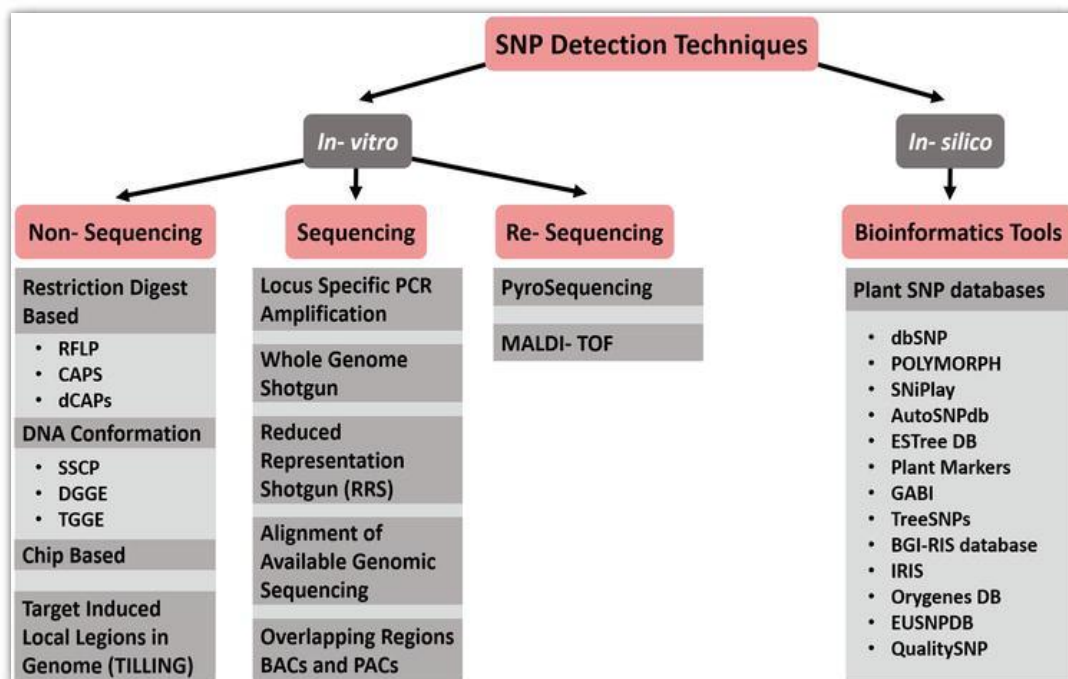


Рис. 3. Класифікація сучасних методів виявлення SNP [15]

Розвиток технологій секвенування привів до зниження вартості досліджень разом із швидким прогресом секвенування наступного покоління (NGS) і відповідних біоінформаційних обчислювальних ресурсів. Ці розробки прискорили повногеномі дослідження асоціацій (WGAS) та ідентифікацію багатьох нових SNP. У постгеномну еру SNPs стали широко використовуваними системами маркерів із кількома перевагами, як-от стабільність, простота використання, низькі показники мутацій і високопродуктивне генотипування.

Методи *in silico* легко застосувати до SNP, які трапляються у відомих геномах або послідовностях привабливого виду. Біоінформаційні дослідження дозволяють розробляти онлайн і автономні інструменти, нове програмне забезпечення й алгоритми для аналізу SNP. Нещодавно розроблене біоінформаційне програмне забезпечення з відкритим вихідним кодом, яке є у вільному доступі, прискорило виявлення SNP і знизило витрати. Важливим моментом є вибір програмного забезпечення, платформи послідовності, вимоги до файлів, алгоритмічна підготовка, операційні системи й об'єкт дослідження, що впливає на вибір біоінформаційної платформи чи використовуваного конвеєра [15].

Зниження витрат на секвенування та створення складних алгоритмів збирання всього геному збільшили кількість успішно секвенованих організмів. Еталонні геноми всіх видів сільськогосподарських тварин доступні в базі даних еталонних послідовностей NCBI (RefSeq). Останні випуски збірки ARS-UCD1.2 (велика рогата худоба), Oar_gambouillet_1.0 (вівці), ARS1 (кози) та Sscrofa 11.1 (свині) є результатом тісної співпраці академічних груп і міжнародних консорціумів. Успішний міжнародний проєкт 1000 Bull Genomes секвенував повні геноми 234 особин великої рогатої худоби та надав науковому співтовариству величезну кількість даних про варіанти однонуклеотидного поліморфізму. Проєкт дозволив створити базу даних варіантів послідовностей предків сучасних порід для великомасштабного повногеномного дослідження асоціацій на рівні послідовностей (GWAS) та використовувати ці дані для швидкого виявлення мутацій, важливих для здоров'я, доброго самопочуття та продуктивності [4].

Висновки. У роботі проведено узагальнення й аналіз відомостей про ДНК-маркери, які застосовуються для сучасних генетичних досліджень у галузі тваринництва. Аналіз вітчизняних робіт у даній галузі показує, що є досить багато досліджень, де застосовуються різнопланові генетичні маркери. Охоплено більшість порід ВРХ, поза увагою не залишилися кількісні та якісні ознаки, асоціації із хворобами. Однак в основному це роботи з маркерами геномної ери. На жаль, відсутні сучасні методи дослідження на основі секвенування визначених локусів ДНК.

Причина такої ситуації полягає у високій вартості одного зразка та необхідності використання складного програмного забезпечення. Тому для досліджень із використанням секвенування необхідно переходити на національні програми та гранти зацікавлених організацій із залученням до роботи кращих зарубіжних науковців.

Список використаних джерел

1. Alison V.E. Marker-assisted selection in beef cattle. UC Davis, 2007.
2. Molecular markers and their use in animal breeding / N.D. Beuzen et al. *Veterinary journal*. London, England. 1997. 2000. Vol. 160 (1), P. 42–52. DOI: 10.1053/tvj.2000.0468.
3. Brookes A.J. The essence of SNPs. *Gene*. 1999. Vol. 234 (2). P. 177–186. DOI: 10.1016/s0378-1119(99)00219-x.
4. Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle / H.D. Daetwyler et al. *Nature genetics*. 2014. Vol. 46 (8). P. 858–865. DOI: 10.1038/ng.3034.

5. Dolgin E. The most popular genes in the human genome. *Nature*. 2017. № 551. P. 427–431. DOI: 10.1038/d41586-017-07291-9.
6. Fan H., Chu J.Y. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2007. Vol. 5 (1). P. 7–14. DOI: 10.1016/S1672-0229(07)60009-6.
7. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes / N. Hasan et al. *Journal, genetic engineering & biotechnology*. 2021. Vol. 19 (1). P. 128. DOI: 10.1186/s43141-021-00231-1.
8. The genetic linkage map of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular, biochemical and morphological markers / L. Irzykowska et al. *Pisum Genetics*. 2001. Vol. 33 (1). P. 13–18.
9. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence / L. Jin et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996. Vol. 93 (26). P. 15285–15288. DOI: 10.1073/pnas.93.26.15285.
10. The importance of molecular markers in plant breeding programmes / P.M. Jonah et al. *Global Journal of Science Frontier Research*. 2011. Vol. 11 (5). P. 4–12.
11. Jonas E., de Koning D.J. Genomic selection needs to be carefully assessed to meet specific requirements in livestock breeding programs. *Frontiers in genetics*. 2015. № 6. P. 49. DOI: 10.3389/fgene.2015.00049.
12. Assessing genomic taurine/zebuine admixture in the southern meat cattle based on microsatellite markers / A.S. Kramarenko et al. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2019. № 9. P. 251–261.
13. Genetic diversity and bottleneck analysis of the Red Steppe cattle based on microsatellite markers / A.S. Kramarenko et al. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8 (2). P. 12–17. DOI: 10.15421/2018_303.
14. Rates of nucleotide substitution in primates and rodents and the generation-time effect hypothesis / W.H. Li et al. *Molecular phylogenetics and evolution*. 1996. Vol. 5 (1). P. 182–187. DOI: 10.1006/mpev.1996.0012.
15. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Plant Genetics and Breeding / H. Morgil et al. *The Recent Topics in Genetic Polymorphisms*. 2020. DOI: 10.5772/intechopen.91886.
16. Nève G., Meglécz E. Microsatellite frequencies in different taxa. *Trends in ecology & evolution*. 2000. Vol. 15 (9), P. 376–377. DOI: 10.1016/s0169-5347(00)01921-2.
17. Ng W.L., Tan S.G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers : Are We Doing It Right ? *ASM Science Journal*. 2015. № 9. P. 30–39.
18. Research Laboratory Applications of STR Technology. URL: [https:// worldwide.promega.com/resources/pubhub/research-laboratory-applications-of-str-technology/](https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/research-laboratory-applications-of-str-technology/).
19. Molecular markers and their potentials in animal breeding and genetics / I.B. Salisu et al. *Nigerian Journal of Animal Science*. 2018. Vol. 20 (3). P. 29–48.
20. Analysis of population-genetic processes in different cattle breeds by microsatellite loci of DNA / A. Shelyov et al. *Agricultural Science and Practice*. 2017. Vol. 4 (1). P. 74–78. DOI: 10.15407/agrisp4.01.074.
21. Single-nucleotide polymorphism. URL: https://isogg.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism.
22. NotI Sequence-Tagged Sites as Markers of Genes on Human Chromosome 3 / G.E. Sulimova et al. *Molekuliarnaia biologii*. 2005. № 39. P. 593–607. DOI: 10.1007/s11008-005-0075-z.
23. BoLA-DRB3 gene as a marker of sensitivity of the white-headed Ukrainian cattle to mastitis / T.M. Suprovych et al. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2022. Vol. 10 (1). P. 3–10. DOI: 10.32819/2022.10001.
24. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with fusobacteriosis in cows / T.M. Suprovych et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. Vol. 11 (2). P. 249–254. DOI: 10.15421/022037.
25. BoLA-DRB3 gene as a marker of susceptibility and resistance of the Ukrainian black-pied and red-pied dairy breeds to mastitis / T.M. Suprovych et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2018. Vol. 9 (3)/ P. 363–368. DOI: 10.15421/021853.
26. Relationship between alleles of gene BoLA-DRB3 and somatic cells amount in milk of Ukrainian black-and-white dairy breed / T.M. Suprovych et al. *The Animal Biology*. 2019. Vol. 21 (4). P. 75–83. DOI: 10.15407/animbiol21.04.075.
27. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz et al. *Genomics*. 1994. Vol. 20 (2). P. 176–183. DOI: 10.1006/geno.1994.1151.
28. Селекційні, генетичні та біотехнологічні методи удосконалення і збереження генофонду порід сільськогосподарських тварин / М.В. Гладій та ін. ; за ред. М.В. Гладія, Ю.П. Полупана ; Інститут розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН. Полтава : ТОВ «Фірма «Техсервіс»», 2017. 793 с.
29. Виявлення молекулярно-генетичних маркерів тварин, асоційованих з гіпоалергенними властивостями молока : методичні рекомендації / В.В. Дзідзюк та ін. Чубинське, 2022. 28 с.
30. Аналіз молочної продуктивності корів порід української селекції з різними генотипами за локусом IFNGR2 / О.Ю. Іващенко та ін. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво»*. 2022. Вип. 2 (49). С. 14–19. DOI: 10.32845/bsnau.lvst.2022.2.3.
31. Копилова К.В. Генетична структура бугаїв різних порід великої рогатої худоби за ISSR-маркерами. *Вісник аграрної науки*. 2012. № 1. С. 59–60.
32. Генетична структура різних порід великої рогатої худоби за молекулярно-генетичними маркерами / К.В. Копилова та ін. *Науково-технічний бюлетень*. 2013. № 110. С. 76–83.
33. Магеровська О.М. Підбір та оцінка ISSR-маркерів для аналізу окремих популяцій великої рогатої худоби. *Розведення і генетика тварин*. 2021. № 61. С. 137–145. DOI: 10.31073/abg.61.15.
34. Молекулярно-генетичні та біотехнологічні дослідження в галузі тваринництва / Б.Є. Подоба та ін. Київ : Аграрна наука, 2013. 246 с.
35. Стефаненко М.С. Аналіз тварин великої рогатої худоби за ISSR маркерами. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького*. 2009. Т. 11. № 2 (41). Ч. 3. С. 205–209.
36. Супрович Т.М., Супрович М.П. Поліморфізм гена BoLA-DRB3 як маркер чутливості до захворювань великої рогатої худоби : монографія. Кам'янець-Подільський : ПДАТУ, 2020. 185 с. URL: <http://188.190.33.55:7980/jspui/handle/123456789/7983>.

Suprovych T. M.

Doctor of Agricultural Sciences,
Head Department of Animal Hygiene and Veterinary Support of the Cynological Service
of the National Police of Ukraine,
Higher Educational Institution “Podillia State University”
Kamianets-Podilskyi, Ukraine
E-mail: suprovycht@gmail.com
ORCID: 0000-0003-4708-6692

Suprovych M. P.

Candidate of Technical Sciences,
Associate Professor at Department of Physics, Labor Safety and Environmental Engineering,
Higher Educational Institution “Podillia State University”
Kamianets-Podilskyi, Ukraine
E-mail: kokas2008@ukr.net
ORCID: 0000-0001-6614-8823

Bandura V. V.

Postgraduate student Department of Animal Hygiene and Veterinary Support of the Cynological Service
of the National Police of Ukraine,
Higher Educational Institution “Podillia State University”
Kamianets-Podilskyi, Ukraine
E-mail: vasil.bandura.95@gmail.com
ORCID: 0009-0007-1964-9028

Chorny I. O.

Assistant of the Department of Animal hygiene and Veterinary support of the Canine Service
of the National Police of Ukraine,
Higher Educational Institution “Podillia State University”
Kamianets-Podilskyi, Ukraine
E-mail: chorniyigor78@gmail.com
ORCID: 0000-0003-2161-4098

GENETIC STUDIES OF CATTLE BASED ON DNA MARKERS**Abstract**

The achievements of molecular genetics reveal real prospects for the formation of the theoretical and practical basis for modern breeding and breeding activities in animal husbandry. Genetic studies of farm animals are aimed at an exhaustive assessment of their breeding qualities based on genetic information associated with certain genes or gene complexes. Practical work with genetic material and the possibility of accelerating breeding work by gaining new knowledge in the field of genetics are now directly associated with the use of genetic markers.

The method of genetic markers is the identification of certain genes, DNA segments, chromosomes, or individuals of a species using unique nucleotide combinations. Most modern markers are associated with the structure of DNA, which allows testing genetic variability not at the level of gene expression products, but at the level of the genome. This feature led to the widespread use of DNA markers after the invention of PCR.

The article discusses the theoretical aspects of genetic markers, their advantages in terms of properties, convenience, and quantitative capabilities in comparison with classical and protein markers. The article provides a list of the most common DNA markers, their requirements, and shows the advantages and disadvantages of their use in practice. The basic markers (ISSR, RFLP, SNP, SSR) used in genetic studies of farm animals are characterized. The sequencing method, that is currently the mainstay of such research, as well as modern methods of SNP detection based on it, are discussed in detail.

An overview of the main genetic studies in the field of domestic livestock based on marker-assisted selection is given.

Key words: molecular markers, polymerase chain reaction, types of DNA markers, sequencing, alleles.

References

1. Alison, V.E. (2007). Marker-assisted selection in beef cattle. UC Davis.
2. Beuzen, N.D., Stear, M.J., & Chang, K.C. (2000). Molecular markers and their use in animal breeding. *Veterinary journal* (London, England, 1997), 160 (1), 42–52. DOI: 10.1053/tvj.2000.0468.
3. Brookes, A.J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234 (2), 177–186. DOI: 10.1016/s0378-1119(99)00219-x.
4. Daetwyler, H.D., Capitan, A., Pausch, H., Stothard, P., van Binsbergen, R., Brøndum, R.F., Liao, X., Djari, A., Rodriguez, S.C., Grohs, C., Esquerré, D., Bouchez, O., Rossignol, M.N., Klopp, C., Rocha, D., Fritz, S., Eggen, A., Bowman, P.J., Coote, D., Chamberlain, A.J., Hayes, B.J. (2014). Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nature genetics*, 46 (8), 858–865. DOI: 10.1038/ng.3034.
5. Dolgin, E. The most popular genes in the human genome (2017). *Nature*, 551, 427–431. DOI: 10.1038/d41586-017-07291-9.
6. Fan, H., & Chu, J.Y. (2007). A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 5 (1), 7–14. DOI: 10.1016/S1672-0229(07)60009-6.

7. Hasan, N., Choudhary, S., Naaz, N., Sharma, N., & Laskar, R.A. (2021). Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 19 (1), 128. DOI: 10.1186/s43141-021-00231-1.
8. Irzykowska, L., Wolko, B., & Swiecicki, W.K. (2001). The genetic linkage map of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular, biochemical and morphological markers. *Pisum Genetics*, 33 (1), 13–18.
9. Jin, L., Macaubas, C., Hallmayer, J., Kimura, A., & Mignot, E. (1996). Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (26), 15285–15288. DOI: 10.1073/pnas.93.26.15285.
10. Jonah, P.M., Bello, L.L., Lucky, O., Midau, A., & Moruppa, S.M. (2011). The importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global Journal of Science Frontier Research*, 11 (5), 4–12. ISSN: 0975-5896
11. Jonas, E., & de Koning, D.J. (2015). Genomic selection needs to be carefully assessed to meet specific requirements in livestock breeding programs. *Frontiers in genetics*, 6, 49. DOI: 10.3389/fgene.2015.00049.
12. Kramarenko, A.S., Karatieieva, O.I., Lykhach, A.V., Lugovoy, S.I., Lykhach, V.Ya., Pidpala, T.V., Patryeva, L.S., & Kramarenko, S.S. (2019). Assessing genomic taurine/zebuine admixture in the southern meat cattle based on microsatellite markers. *Ukrainian Journal of Ecology*, 9, 251–261.
13. Kramarenko A.S., Gladyr, E.A., Kramarenko, S.S., Pidpala, T.V., Strikha, L.A., & Zinovieva, N.A. (2018). Genetic diversity and bottleneck analysis of the Red Steppe cattle based on microsatellite markers. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8 (2), 12–17. DOI: 10.15421/2018_303.
14. Li, W.H., Ellsworth, D.L., Krushkal, J., Chang, B.H., & Hewett-Emmett, D. (1996). Rates of nucleotide substitution in primates and rodents and the generation-time effect hypothesis. *Molecular phylogenetics and evolution*, 5 (1), 182–187. DOI: 10.1006/mpev.1996.0012.
15. Morgil, H., Can Gercek, Y., & Tulum, I. (2020). Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Plant Genetics and Breeding. *The Recent Topics in Genetic Polymorphisms*. DOI: 10.5772/intechopen.91886.
16. Nève, G., & Meglécz, E. (2000). Microsatellite frequencies in different taxa. *Trends in ecology & evolution*, 15 (9), 376–377. DOI: 10.1016/s0169-5347(00)01921-2.
17. Ng, W.L., & Tan, S.G. (2015). Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? *ASM Science Journal*, 2015, 9, 30–39.
18. Research Laboratory Applications of STR Technology. Retrieved from <https://worldwide.promeqa.com/resources/pubhub/research-laboratory-applications-of-str-technology/>.
19. Salisu, I.B., Olawale, A.S., Jabbar, B., Koloko, B.L., Abdurrahman, S.L., Amin, A.B., & Ali, Q. (2018). Molecular markers and their potentials in animal breeding and genetics. *Nigerian Journal of Animal Science*, 20 (3), 29–48.
20. Shelyov, A., Kopylov, K., Kramarenko, S., & Kramarenko, O. (2017). Analysis of population-genetic processes in different cattle breeds by microsatellite loci of DNA. *Agricultural Science and Practice*, 4 (1), 74–78. DOI: 10.15407/agrisp4.01.074.
21. Single-nucleotide polymorphism. Retrieved from https://isogg.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism.
22. Sulimova, G.E., Rakhmanaliev, E.R., Klimov, E.A. et al. (2005). NotI Sequence-Tagged Sites as Markers of Genes on Human Chromosome 3. *Molekuliarnaia biologiya*, 39, 593–607. DOI: 10.1007/s11008-005-0075-z.
23. Suprovych, T.M., Suprovych, M.P., Biriukova, O.D., Trach, V.V., Danchuk, O.V., & Grafov, A.V. (2022). BoLA-DRB3 gene as a marker of sensitivity of the white-headed Ukrainian cattle to mastitis. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 10 (1), 3–10. DOI: 10.32819/2022.10001.
24. Suprovych, T.M., Suprovych, M.P., Kolinchuk, R.V., Karchevska, T.M., Chorny, I.O., & Kolodiy, V.A. (2020). Association of BoLA-DRB3.2 alleles with fusobacteriosis in cows. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11 (2), 249–254. DOI: 10.15421/022037.
25. Suprovych, T.M., Suprovych, M.P., Koval, T.V., Karchevska, T.M., Chepurna, V.A., Chorny, I.O., & Berezhanskyi, A. (2018). BoLA-DRB3 gene as a marker of susceptibility and resistance of the Ukrainian black-pied and red-pied dairy breeds to mastitis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9 (3), 363–368. DOI: 10.15421/021853.
26. Suprovych, T.M., Vishchur, O.I., & Chepurna, V.A. (2019). Relationship between alleles of gene BoLA-DRB3 and somatic cells amount in milk of Ukrainian black-and-white dairy breed. *The Animal Biology*, 21 (4), 75–83. DOI: 10.15407/animbio121.04.075.
27. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 (2), 176–183. DOI: 10.1006/geno.1994.1151.
28. Gladij, V.V., Bashenko, M.I., Polupan, Yu.P. [ta in.]. Selekcijni, genetični ta biotehnologični metodi udoskonalennya i zberzhennya genofondu porid silskogospodarskih tvarin [Breeding, genetic and biotechnological methods of improvement breeding and preservation of the gene pool of agricultural animal breeds] / za red.: M.V. Gladiya i Yu.P. Polupana ; Institut rozvedennya i genetiki tvarin im. M.V. Zubcya NAAN. Poltava : TOV “Firma “Tehservis””, 2017. 793 s. [in Ukrainian].
29. Dzitsiuk, V.V., Mokhnachova, N.B., & Dobrianska, M.L. (2022). Vyiavlennia molekuliarno-henetychnykh markeriv tvarin, asotsiovanykh z hipoalerhennymy vlastyvoistamy moloka: metodychni rekomendatsii [Identification of molecular genetic markers of animals associated with hypoallergenic properties of milk]. Chubynske, 28 s. [in Ukrainian].
30. Ivashenko, O.Yu., Lyashenko, Yu.V., & Kulibaba, R.O. (2022). Analiz molochnoyi produktivnosti koriv porid ukrayinskoyi selekciyi z riznymy genotypamy za lokusom IFNGR2 [Milk productivity analysis of Ukrainian selection cattle breeds with different genotypes by IFNGR2 locus]. *Visnik Sumського nacionalnogo agrarnogo universytetu*. Seriya “Tvarynyctvo”, 2 (49), 14–19. DOI: 10.32845/bsnau.lvst.2022.2.3 [in Ukrainian].
31. Kopylova, K.V. (2012). Genetična struktura bugayiv riznih porid velikoyi roगतoyi hudoby za ISSR-markeramy [Genetic structure of bulls of various breeds of cattle according to ISSR markers]. *Visnik agrarnoyi nauky*, 1, 59–60 [in Ukrainian].
32. Kopylova, K.V., Shelov, A.V., Berezovskyi, O.V., Kopylov, K.V., Rossokha, V.I. Henetychna struktura riznykh porid velikoyi roहतoyi khudoby za molekuliarno-henetychnymy markeramy [Genetic structure of different breeds of cattle according to molecular genetic markers]. *Naukovo-tekhnichnyi biuletен*. 2013. № 110. S. 76–83 [in Ukrainian].

-
33. Maherovska O.M. (2021). Pidbir ta otsinka ISSR-markeriv dlia analizu okremykh populiatsii velykoi rohatoi khudoby [Selection and assessment of ISSR-markers for analysis of separate cattle populations]. *Rozvedennia i henetyka tvaryn*, 61, 137–145. DOI: 10.31073/abg.61.15 [in Ukrainian].
34. Podoba, B.Ye., Kopilov, K.V., Kovtun, S.I., Kopilova, K.V., Podoba, Yu.V., Dobryanska, M.L. Molekulyarno-genetichni ta biotehnologichni doslidzhennya v galuzi tvarinnictva [Molecular genetics and biotechnological research in the field of animal husbandry]. Kiyiv : Agrarna nauka, 2013. 246 s. [in Ukrainian].
35. Stefanenko, M.S. (2009). Analiz tvaryn velykoi rohatoi khudoby za ISSR markeramy [Analysis of cattle by ISSR markers]. *Naukovyi visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Gzhytskoho*, 11, 2 (41), 3, 205–209 [in Ukrainian].
36. Suprovych, T.M., Suprovych, M.P. Polimorfizm gena BoLA-DRB3 yak marker chutlivosti do zahvoryuvan velikoyi rogotoyi hudobi: monografiya [Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene as a marker of susceptibility to cattle diseases]. Kam'yanec-Podilskij : PDATU. 2020. 185 s. Retrieved from <http://188.190.33.55:7980/jspui/handle/123456789/7983> [in Ukrainian].