

УДК 575:636.2.034

T. Suprovych, Doctor of Agricultural Sciences,*M. Suprovych*, candidate of Engineering Sciences, associates professor,*R. Kolinchuk*, applicant, State Agrarian and Engineering University in Podilya**GENE ALLELE POLYMORPHISM BOLA-DRB3.2****UKRAINIAN RED-PIED DAIRY CATTLE**

Annotation. Polymorphism of gene of BoLA-DRB3.2 Ukrainian red-pied milk breed was studied for by comparison to other world breeds of cattle. At red-pied cattle have 22 alleles. There are equable frequency spectrum of alleles in red-pied cattle. In breed with a frequency of more than 5% was identified alleles *01, *03, *07, *11, *16, *22 and *24. High levels of allelic polymorphism of the gene BoLA-DRB3.2 shows estimate of excess heterozygotes for coefficient Selender's and quantitative allelic diversity index Shannon-Wiener. Shannon index for red-pied cattle is demonstrated belong to species with complicated organization. The presence of high levels of polymorphism and genetic diversity of populations allows using allele BoLA-DRB3.2 locus as informative molecular-genetic markers.

Keywords: Ukrainian red-pied dairy breed, gene of BoLA-DRB3, polymorphism, alleles, polymerase chain reaction, molecular-genetic marker.

Т.М. Супрович, доктор с.-г. наук,*М.П. Супрович*, кандидат технічних наук,*Р.В. Колінчук*, аспірант ПДАТУ**ПОЛІМОРФІЗМ АЛЕЛІВ ГЕНА BOLA-DRB3.2****УКРАЇНСЬКОЇ ЧЕРВОНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ**

Вивчено поліморфізм гена BoLA-DRB3.2 української червоно-рябої молочної породи у порівнянні з іншими світовими породами ВРХ. У червоно-рябої худоби виявлено 22 алелі. Частотний спектр алелів в популяції рівномірний. З частотою більше 5% визначалися алелі *01, *03, *07, *11, *16, *22 і *24. Визначено надлишок гетерозигот за коефіцієнтом Селендера та кількісне алельне різноманіття за індексом Шенона-Вінера, які показують високий рівень поліморфізму алелів гена BoLA-DRB3.2. За індексом Шенона популяція української червоно-рябої молочної породи належить до порід з ускладненою організацією. Наявність високого рівня поліморфізму і генетичне різноманіття корів цієї породи дає можливість використовувати алелі BoLA-DRB3.2 локусу в якості інформативних молекулярно-генетичних маркерів.

Ключові слова: українська червоно-ряба молочна порода, ген BoLA-DRB3.2, поліморфізм, алелі, полімеразно-ланцюгова реакція, молекулярно-генетичний маркер.

Постановка проблеми в загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. За

останнє десятиліття значно зріс інтерес дослідників до вивчення у великої рогатої худоби поліморфізму алелів ексона 2 гена BoLA-DRB3. Численні дослідження дозволили накопичити значний об'єм даних про наявність і характер розподілу алелів і генотипів даного гена для різних порід молочної худоби. Масштабні дослідження генотипів BoLA-DRB3 проведені в США, Канаді, Австралії, більшості країн Європи, Пакистані, Індії і Росії [2, 4, 7]. Значний поліморфізм цих алелів дозволяє розглядати їх в ролі генетичних маркерів в маркер-асоційованій селекції (MAS) і при встановленні локусів кількісних ознак (QTL) [1], що в майбутньому дає можливість вести селекцію ВРХ по продуктивності та стійкості до захворювань на генетичному рівні. Створена міжнародна програма і база даних по картуванню генома *Bos taurus*, розробляються довгострокові проекти генетичного ДНК-моніторингу генофонду ВРХ тощо [8].

Вивчення генетичного різноманіття вітчизняних порід тільки розпочинається. Тому виявлення алельного різноманіття в однієї з провідних вітчизняних порід великої рогатої худоби має не тільки теоретичне, а й практичне значення.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми. Актуальною проблемою генетики сільськогосподарських тварин є дослідження біорізноманітності наявних порід ВРХ та їх генетична диференціація. У всьому світі відбувається збіднення генофонду молочних стад. Причиною цього стала інтенсивна селекція на створення високопродуктивних молочних популяцій на основі однієї породи – голштинської. «Жертвами» голштинізації стали Північна Америка і Європа [2]. Наразі дана проблема прийшла в Україну. При цьому українські породи ВРХ охарактеризовані по молекулярно-генетичних маркерах далеко не так широко і систематично, як американські і європейські. Більшість попередніх досліджень стосуються білкових, і особливо, імуногенетичних (групи крові) маркерів.

Мета статті – визначення та аналіз поліморфізму гена BoLA-DRB3.2 української червоно-рябої молочної породи великої рогатої худоби та порівняння його показників з іншими породами ВРХ.

Виклад основного матеріалу дослідження. Дослідження проведене на вибірці в 117 голів шляхом виявлення в генотипі тварин алелів ексона 2 гена BoLA-DRB3.

Для ампліфікації гена BoLA-DRB3.2 використовували полімерно-ланцюгову реакцію поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ) і алель-специфічну ПЛР (АС-ПЛР). Для досягнення максимальної точності типування алелів у дослідженні використані три незалежних підходи: стандартний рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації, АС-ПЛР з праймерами ER-17 і VD-19 і АС-ПЛР з праймерами HLO-07 і HLO-24d (рис. 1).

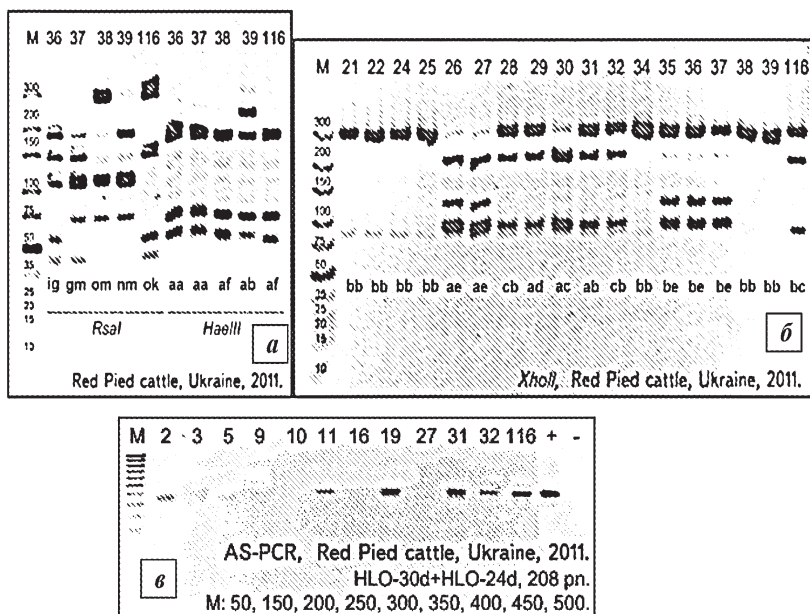


Рис. 1. Варіанти рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації гена BoLA-DRB3.2:

а і б – електрофореграми, отримані на ДНК корів української червоно-рябої молочної породи з використанням різних ендонуклеаз (для оцінки довжин фрагментів використано маркер молекулярних мас «GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder» фірми «Fermentas», Лутва. Знизу вказані варіанти ДНК-патернів.); **в** – варіант AS-PCR

За патернами рестрикції виявляли 54 можливих алельних варіанти гена BoLA-DRB3.2.

Підрахунок частот алелів проводився з врахуванням кількості гомозигот і гетерозигот, знайдених по відповідному алелю за формулою:

$$P(A) = \frac{2N_1 + N_2}{2n}, \quad (1)$$

де N_1 і N_2 – число гомозигот і гетерозигот для досліджуваного генотипу;

n – об'єм вибірки.

Спостережувану і очікувану гетерозиготність визначали за формулами:

$$H_0 = N_2 / n \quad (2)$$

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2, \quad (3)$$

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

Оцінка надлишку гетерозигот в дослідних вибірках проводилась за коефіцієнтом Селендера:

$$D = \frac{H_0 - H_e}{H_e}, \quad (4)$$

Кількісну оцінку алельного різноманіття проводили за індексом Шенона-Вінера:

$$H' = - \sum_{i=1}^n (p_i \times \ln p_i). \quad (5)$$

У результаті дослідження встановлено, що в української червоно-рябої молочної породи визначається 22 алеля (середня частота 4,55%) (табл. 1). З частотою знаходження більше 5% виявляються 7 алелів. Найбільш «інформативним» у представленій породи є алель BoLA-DRB3.2*07, який зустрічається 36 разів серед 234 ідентифікованих алелів (15,4%). Його виявлено у 30 корів, тобто у майже у кожної четвертої тварини дослідної вибірки. Ранжований ряд для інших 6 алелів має наступний вигляд: *22 – 31 випадок (13,1%), *11 – 22 випадки (9,4%), *24 – 20 випадків (8,7%), *01 – 18 випадків (7,7%), *03 та *16 – по 12 випадків (5,1%). Рідко по 3 рази (1,6%) ідентифікувались 7 алелів *04, *09, *12, *20, 32, *35 і *43. Загальна частота визначення «малоінформативних» алелів ($P(A) < 5\%$) склала 35,5%.

Таблиця 1

Розподіл частот алелів гена BoLA-DRB 3.2 у корів української червоно-рябої молочної породи (N = 117)

Алелі BoLA-DRB 3.2	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	Статистична похибка, S_p (%)	Алелі BoLA-DRB 3.2	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	Статистична похибка, S_p (%)
*01	18	0,077	1,74	*20	3	0,013	0,735
*03	12	0,051	1,44	*22	31	0,131	2,19
*04	3	0,013	0,735	*24	20	0,087	1,87
*07	36	0,154	2,36	*25	6	0,026	1,03
*08	11	0,047	1,38	*27	6	0,026	1,03
*09	3	0,013	0,735	*28	8	0,034	1,26
*10	11	0,047	1,38	*32	4	0,017	0,735
*11	22	0,094	1,91	*35	3	0,013	0,735
*12	3	0,013	0,735	*42	11	0,047	1,38
*15	4	0,017	0,847	*43	3	0,013	0,735
*16	12	0,051	1,44	*45	4	0,017	0,847

У породи виявлено 35 генотипів. Частота знаходження більше 5% виявлена для 4 генотипів: *01/*07 і *16/*24 – по 9 випадків (7,69%), *07/*07 і *22/*24 – по 6 випадків (5,13%).

Огляд світових досліджень показує [2, 3, 4, 7], що максимальна кількість – 40 алелів – виявлена для помісної породи Зебу (з голштинами). Високий рівень алельного різноманіття характерний для монгольської (35), іранської зебувидної Сістані (32), іранської голштинської породи (30), канадської голштинської і червоної норвезької порід (по 27 алелів). Найменший поліморфізм зафіксований для американської голштинської (11), айрширської (18) та шортгорнської порід BPX (21). При вивченні джерсейської худоби виявлено 24 алеля BoLA-DRB3.

Характерна закономірність зменшення кількості алелів для так званих комерційних порід, специфікою яких є довготривала селекція в обмеженому ареалі для отримання високих показників молочної продуктивності.

Для національних або регіональних порід, які не пройшли шлях тотального поліпшення шляхом схрещування з іншими породами, характерний середній за чисельністю набір алелів. До них відноситься українська червоно-ряба молочна порода, створена відтворним схрещуванням сименталів з червоно-рябими голштинами з незначною часткою монбельярдів і айрширів [5]. Незважаючи на відносно великий ареал поширення (14 областей України), в генетичний банк породи не привнесено значного спадкового матеріалу від інших порід, що зумовлює середній за розміром спектр алелів (22) гена BoLA-DRB3.2.

Популяція тварин – це складна генетична система. Для характеристики алельної різноманітності породи застосовують індекс Шенона-Вінера [6]. Чим вище значення індексу, тим більш складно організована порода.

За кількістю алелів та частотою їх прояву згідно формули 5 розраховано значення H' (табл. 2).

Таблиця 2

Генетичні особливості порід у зв'язку з виявленням спектром алелів BoLA-DRB3.2

Породи ВРХ	Алелі			Генотипи				
	всього ($p > 5\%$)	загальна частота ($p < 5\%$)	індекс Шенона-Вінера, H'	кількість гомозигот	кількість гетерозигот	гетерозиготність		коефіцієнт Селендера, D
						спостережувана H_o	очікувана H_e	
Українська червоно-ряба молочна	7	35,5	3,77	14	103	0,88	0,921	-0,044
Голштинська	5	28,4	3,4	70	464	0,869	0,975	-0,109
Зебувидна	6	25,3	2,53	10	85	0,895	0,895	-0,0005
Калмицька	4	65,9	3,27	12	54	0,818	0,949	-0,137
Костромська	6	26,3	2,49	32	86	0,729	0,889	-0,18
Якутська	5	11,4	1,74	63	42	0,4	0,744	-0,462
Ярославська	4	52,5	2,95	44	97	0,688	0,922	-0,253

Для порівняння в таблиці наведені дані досліджень для інших порід [4]. Найвищі значення індексу (3,77 і 3,4) характерні для української червоно-рябої молочної та голштинської порід ВРХ, найнижче – для якутської (1,74), в якій виявлено мінімум числа

алелів (14). Результати показують, що відмінності в спектрі та характері розподілу алелів гена BoLA-DRB3.2 мають більше значення для консолідації породи, ніж кількість алелів. Чим більш рівномірний розподіл частот, тим складніше організована порода. Але сподіватися на нерівномірний спектр при великій кількості алелів навряд чи варто.

Важливим показником для оцінки інформативності алелів локусу BoLA-DRB3 є рівень їх поліморфізму. Показником генетичної варіабельності всередині популяції є середня очікувана гетерозиготність (формула 3). Вона може бути визначена за генними частотами і менше залежить від факторів, пов'язаних з помилкою вибірки. Для будь-якого локусу очікувана гетерозиготність показує ймовірність того, що два алеля, випадковим чином вибраних у популяції, будуть відрізнятися один від одного. Розрахункові значення H_e представлені в табл. 2.

Найвищий рівень поліморфізму характерний для голштинської худоби ($H_e = 0,975$), найменший – для якутської ($H_e = 0,744$). Українська червоно-ряба молочна порода характеризується порівняно високим рівнем поліморфізму. Значення очікуваної гетерозиготності (H_e) для неї складає 0,921, що дозволяє використовувати локus в якості молекулярного-генетичного маркера.

Кількість алелів (54), яка діагностується зараз, теоретично може дати близько 3 тис. генотипів. Порівняльний аналіз світових порід показує, що у BPX для гена BoLA-DRB3.2 реально відслідковується сумарно лише 10% гетеро- і гомозигот від максимальної величини.

Порівняння алельних пар розглянутих порід BPX підтверджує висновок: алельна різноманітність гена BoLA-DRB3.2 зумовлює широкий діапазон можливих генотипів. Найбільша кількість генотипів виявлена в ярославської худоби (72), найменша – у якутської (18) [4].

У зв'язку з тим, що для більшості порід характерний рівномірний розподіл генотипів, досить важко віднайти алельні пари, які б могли слугувати маркерами, асоційованими із захворюваністю чи корисними ознаками. Невелика абсолютна кількість генотипів навіть у великих дослідних вибірках не дозволяє дати точні статистичні викладки, тим більше, що зв'язок «генотип-ознака» обмежує кількість об'єктів дослідження, тому що лише частина

тварин в стаді має відповідну ознаку. Ця обставина пояснює суттєве обмеження інформації щодо виявлення QTL-маркерів на основі вивчення генотипів різних локусів для використання їх у селекції.

Зроблений висновок підтверджується співвідношенням гетеро- і гомозигот у дослідних вибірках, яке характеризується величиною коефіцієнта Селендера.

Згідно із законом Харді-Вайнберга відмічається нерівноважне зчеплення по DRB3.2 локусу у всіх розглянутих порід ВРХ. У них спостерігається дефіцит гетерозигот, на що вказує негативне значення коефіцієнта Селендера (табл. 2). Для комерційних порід це може бути пов'язано з інтенсивними селекційними заходами, тоді як в диких популяціях відбір підтримує надлишок гетерозигот по цьому локусу, що сприяє зв'язуванню різноманітнішого набору сторонніх антигенів [2, 4].

Українська червоно-ряба молочна порода має середній алельний спектр (22 випадки) з рівномірним розподілом частот. Також 7 алелів проявляються з частотою більше 5% (*01, *03, *07, *11, *16, *22 і *24). Загальна частка «інформативних» алелів сягає 64,5%, що дещо менше ніж в середньому для більшості розглянутих порід. За величиною індексу Шенона дана популяція відноситься до порід зі складною організацією, так як характеризується максимальним значенням $H' = 3,77$. Рівень поліморфізму алелів гена BoLA-DRB3 у корів даної популяції достатньо високий ($H_e = 0,921$).

Представлена порода має невелике, близьке до нуля, значення коефіцієнта Селендера (-0,044). Рівень браку гетерозигот для цієї породи найменший серед усіх інших (окрім зебувидної). Статистично встановлене ймовірне порушення генетичної рівноваги, яке виявляють при надлишку гомозигот для червоно-рябої породи, а відповідно можливе його порушення із-за селекційного тиску має помірне значення і свідчить про генетичне різноманіття породи.

Висновки. Уперше досліджено алельний спектр вітчизняної породи великої рогатої худоби. Виявлено алельний поліморфізм екзона 2 гена BoLA-DRB3 для української червоно-рябої молочної породи. Наявність високого рівня поліморфізму і генетичного різноманіття породи за розподілом частот алелів та інших показників генетичної мінливості дає можливість вважати досліджений

DRB3.2 локус інформативним молекулярно-генетичним маркером. Отримані дані вказують на необхідність подальшого вивчення характеру розподілу поліморфних алелів і генотипів DRB3.2 локусу з метою їх використання для вирішення широкого спектра селекційних завдань, в тому числі для знаходження асоціативних зв'язків у парах «алель-корисна ознака» та «генотип-корисна ознака».

Список використаних джерел

1. Методы маркер-зависимой селекции [Текст] / Н.А. Зиновьева, Е.А. Гладырь, Г. Державина, Е. Кунаева // Животноводство России. – 2006. – № 3. – С. 29-31.
2. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в изучении генофонда пород крупного рогатого скота [Текст] / Галина Сулимова // Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства. – М.: Наука, 2006. – С. 138-166.
3. Генетические механизмы устойчивости и чувствительности к лейкозу айрширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота, установленные на основе распределения аллелей гена BoLA-DRB3 [Текст] / Удина И.Г., Карамышева Е.Е., Туркова С.О. [и др.] // Генетика. – 2003. – Т. 39. – № 3. – С. 383-396.
4. Полиморфизм гена BoLA-DRB3 у крупного рогатого скота монгольской, калмыцкой и якутской пород [Текст] / М.Н. Рузина, Т.А. Штыфурко, М.Р. Мохаммад Абади [и др.] // Генетика. – 2010. – Т. 46. – № 4. – С. 517-525.
5. Зубець М.В. Українська червоно-ряба молочна порода: методи виведення, стан, перспективи удосконалення / М.В. Зубець, А.П. Кругляк // Розведення і генетика тварин. – 2010. – № 44. – С. 14-17.
6. Алимов А.Ф. Элементы теории функционирования водных экосистем [Текст] / Александр Федорович Алимов. – СПб.: Наука, 2000. – 147 с.
7. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of a New Allele in the Iranian Cattle Breed Sistani (*Bos indicus*) / A. Mohammadi, M.R. Nassiry, J. Mosafer [et al.] // Genetika. – 2009. – Т. 44. – № 2. – С. 198-202.
8. Henderson D. Conference review: bovine genomics from academia to industry / D. Henderson¹, M. Thomas, Y. Da // Comparative and Functional Genomics: Cattle and Sheep Workshop, Plant & Animal Genomes (PAG) XIII Conference, San Diego, CA, USA. – 2005. – V. 6 (Issue 3). – P. 174-180.

Аннотация. Изучен полиморфизм гена BoLA-DRB3.2 украинской красно-пестрой молочной породы в сравнении с другими мировыми породами КРС. У красно-пестрого скота выявлены 22 аллели. Частотный спектр аллелей в популяции равномерный. С частотой более 5% определялись аллели *01, *03, *07, *11, *16, *22 и *24. Определен избыток гетерозигот по коэффициенту Селендера и количественное аллельное многообразие по индексу Шеннона-Винера, которые показывают высокий уровень полиморфизма аллелей гена BoLA-DRB3.2. По индексу Шеннона популяция украинской красно-пестрой молочной породы относится к породам с усложненной организацией. Наличие высокого уровня полиморфизма и генетическое разнообразие коров этой породы дает возможность использовать аллели BoLA-DRB3.2 локуса в качестве информативных молекулярно-генетических маркеров.

Ключевые слова: украинская красно-пестрая молочная порода, ген BoLA-DRB3, полиморфизм, аллели, полимеразно-цепная реакция, молекулярно-генетический маркер.

УДК 612.461.23:549.67:636.2

J. Rivis, doctor of Agricultural Sciences,

S. Kolyada, postgraduate student Institute of Animal Biology NAAS, Lviv

UNETHERIFIED FATTY ACIDS CONTENT IN THE RUMEN FLUID AND PRODUCTIVITY INDEX OF COWS AT THE PRESENCE METAL OXIDE AND ZEOLITE POWDER IN THE RATION OF PASTURE PERIOD

Summary. The effect of the metal oxide and zeolite in the ration of the cows, in summer period, into the unetherified fatty acid content in rumen fluid, milk productivity and milk composition have been studied in this work. This was formed three groups of Ukrainian black white breed cows in first half of the lactation. The cows of control, I and II experimental groups from May till July grazed on pasture with a young grass-legumes. In addition, the experimental cows got a feed (4,0 kg per head and 100 g per each kilogram milk). The structure of their feed included the following mineral elements: magnesium, cobalt, zinc and copper. The cows of I research group as part of feed were fed by characteristic mixture of zeolite minerals with the following chemical composition (the mass fraction): SiO_2 – 70,0; Al_2O_3 – 12,0; Fe_2O_3 – 1,0; FeO – 0,6; TiO_2 – 0,1; MnO – 0,1; P_2O_5 – 0,1; K_2O – 3,1; Na_2O – 1,8; SO_3 – 0,1; CaO – 7,1; MgO – 4,0. The cows of II experimental group as part of feed were fed by zeolite. Number of minerals and zeolite in the fodder for the cows of I and II experimental groups was 0,4 g/kg body weight of the animal. In the end of experimental period