

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БРЯНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА И.Г. ПЕТРОВСКОГО»**

На правах рукописи

Козлов Александр Леонидович

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА VOLA-DRV3
КАК МАРКЕР ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО
РАЗНООБРАЗИЯ И УСТОЙЧИВОСТИ
К ВИРУСУ ЛЕЙКОЗА МОЛОЧНОГО
СКОТА БРЯНСКОЙ ОБЛАСТИ**

Специальность

06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Нам Ирина Ян Гуковна

Брянск – 2016

	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
	ВВЕДЕНИЕ	5
	ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	11
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1	Общая характеристика вирусного гемобластоза крупного рогатого скота	11
1.2	Распространение и меры борьбы с гемобластозом крупного рогатого скота	13
1.3	Структура главного комплекса гистосовместимости крупного рогатого скота (Bovine Leukocyte Antigens)	22
1.4	Характеристика вируса лейкоза крупного рогатого скота	27
1.5	Связь структуры локуса BoLA-DRB3 с развитием лейкоза	28
1.6	Предполагаемые модели генетического контроля развития персистентного лимфоцитоза у особей крупного рогатого скота, инфицированных ВЛ КРС	36
1.7	Использование генетических маркеров для повышения эффективности молочного и мясного производства	39
1.8	Биоразнообразие и способы его оценки	43
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
2.1	Методика выделения ДНК из крови	50
2.2	Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)	51
2.3	Рестрикция продуктов амплификации	52
2.4	Анализ результатов электрофоретического разделения ДНК	53
2.5	Математическая обработка результатов	55
3	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	57
3.1	Характеристика полиморфизма гена BoLA-DRB3 молочного скота Брянской области	57
3.1.1	Генетический полиморфизм коров черно-пестрой породы по гену BoLA-DRB3	57
3.1.1.1	Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы СПК «Агрофирма «Культура»	57
3.1.1.2	Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы ОАО «Новый путь»	64
3.1.1.3	Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы ООО «Снежжа-Госома»	69

3.1.1.4	Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы г. Жирятино	73
3.1.1.5	Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы с признаками гемобластоза	77
3.1.2	Генетический полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров симментальской породы СХПК «Большевик»	81
3.1.3	Генетический полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров швицкой породы СПК «Красный рог»	85
3.1.4	Генетический полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров айрширской породы п. Сельцо	89
3.1.5	Генетический полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров красно-пестрой породы колхоза «Память Ленина»	92
3.2	Сравнительная характеристика генетической устойчивости молочного скота к вирусу лейкоза	95
3.3	Оценка биоразнообразия популяций крупного рогатого скота на основе аллельной структуры гена BoLA-DRB3	107
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
	Выводы	116
	Предложения производству	117
	Перспективы дальнейшей разработки темы	118
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВЛ КРС – вирус лейкоза крупного рогатого скота
- ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
- КРС – крупный рогатый скот
- ПЛ – персистентный лимфоцитоз
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЦР-ПДРФ – полимеразная цепная реакция с изучением полиморфизма
длин рестрикционных фрагментов
- BoLA – bovine leucocyte antigen
- МНС – major histocompatibility complex

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований. Одним из важнейших факторов ограничения продуктивности и ухудшения качества продукции животноводства являются различные заболевания, в частности, вирусный лейкоз крупного рогатого скота. Он наносит большой экономический ущерб из-за снижения продуктивности заболевших животных, уменьшения периода эксплуатации лактирующих больных коров на несколько лет, потерь от ограничений реализации племенного молодняка, утраты генофонда высокопродуктивных животных. Это заболевание по экономическому ущербу превосходит туберкулез и бруцеллез [11; 19; 43; 65].

Согласно докладу Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору удельный вес лейкоза составляет более 20% в инфекционной патологии КРС в России. Количество больных животных в хозяйствах РФ в период с 1992 года по 2011 год возросло почти в 3 раза. В 2011 г. на территории РФ зарегистрировано 117 новых неблагополучных по лейкозу пункта, в ряде товарных хозяйств заболевание лейкозом КРС составляет до 40%, вирусоносительство – до 70%.

В настоящее время остро стоит проблема генетической устойчивости разных пород КРС к болезням. В России активно исследуется аллельная структура гена *BoLA-DRB3*, ответственного за устойчивость к инфекционным заболеваниям, в том числе к вирусу лейкоза КРС [19; 48; 64]. В работах отмечается, что при отборе и разведении высокопродуктивного скота наблюдается обеднение стад КРС по ряду аллелей, связанных с устойчивостью к ВЛ КРС, вплоть до полного исчезновения отдельных аллелей в некоторых хозяйствах [7; 20; 22; 39]. Сохранение биоразнообразия и, в частности, разнообразия аллелей гена *BoLA-DRB3*, связано с устойчивостью популяции к меняющимся факторам окружающей среды. Удобный и эффективный метод оценки аллельного разнообразия гена *BoLA-DRB3* и генетической устойчивости к лейкозу может найти применение для мониторинга потенциала генетической устойчивости популяций к ВЛКРС,

долгосрочного планировании селекционной работы в целях борьбы с лейкозом, в разработке программ по разведению животных для отдельных хозяйств, неблагополучных по лейкозу.

Степень разработанности темы исследования. Результаты генетического анализа основных молочных пород крупного рогатого скота свидетельствуют о том, что устойчивость к лейкозу имеет значительную генетическую составляющую, хотя животные почти всех пород при определенных условиях могут быть заражены вирусом ВЛ КРС [6; 16; 21; 52]. При этом инфицированные животные необязательно заболевают лейкозом, наблюдается явление вирусоносительства, когда вирус встраивается в геном хозяйской клетки и присутствует в организме в латентной форме [117].

Определяющую роль в устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу играет главный комплекс гистосовместимости КРС BoLA. Ранее в работах ряда авторов (Сулимова Г.Е. [и др.], 1995; Эрнст Л.К. [и др.], 1997; Lewin H.A., 1994) было показано, что ГКГ коров содержит ген BoLA-DRB3, аллели которого отвечают за восприимчивость или устойчивость животного к вирусу лейкоза [48; 64; 108]. Всего данный ген представлен в популяции разных пород КРС России 54 аллелями, из которых 3 определяют устойчивость к вирусу, а 4 связаны с восприимчивостью, и их носители с высокой вероятностью могут заболеть лейкозом. Ранее было показано, что устойчивость – доминантный признак, и если конкретная особь несет хотя бы одну копию аллеля устойчивости к ВЛ КРС, то животное не восприимчиво к лейкозу [54].

Цели и задачи исследования. Цель данного исследования – оценить устойчивость к вирусу лейкоза и биоразнообразие молочного скота Брянской области на основе генотипирования по локусу BoLA-DRB3.

В связи с этим были поставлены и решены следующие задачи:

- изучить и выявить особенности полиморфизма гена BoLA-DRB3 в стадах молочного скота черно-пестрой, симментальской, швицкой, айрширской и красно-пестрой пород, разводимых в Брянской области;
- провести анализ и оценку генетической структуры молочного скота разных пород по локусу гена BoLA-DRB3;
- определить частоту встречаемости аллелей, ассоциированных с устойчивостью к развитию лейкоза у разных пород молочного скота;
- дать сравнительную оценку полиморфизма гена BoLA-DRB3 у коров с клиническим проявлением лейкоза;
- использованием математических индексов оценить биологическое разнообразие молочного скота на основе полиморфизма гена BoLA-DRB3.

Научная новизна работы. Впервые изучен аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 в стадах черно-пестрой, симментальской, айрширской, швицкой и красно-пестрой пород, разводимых в хозяйствах Брянской области. Установлены межпопуляционные различия спектра аллелей локуса BoLA-DRB3 и оценен потенциал молочного скота генетической устойчивости к вирусу лейкоза.

Доказана результативность и возможность использования математических индексов для оценки аллельного разнообразия гена BoLA-DRB3.

Теоретическая и практическая значимость работы. Установлены различия в аллельной структуре гена BoLA-DRB3 черно-пестрой, симментальской, швицкой, айрширской и красно-пестрой пород крупного рогатого скота, разводимого в ряде племенных и товарных хозяйств Брянской области. Результаты анализа полиморфизма гена BoLA-DRB3 являются основой для проведения мероприятий по повышению генетической устойчивости стад крупного рогатого скота к вирусу лейкоза, позволяют планировать племенную работу по насыщению поголовья животных Брянской области аллелями устойчивости к ВЛ КРС.

Показан высокий уровень аллельного разнообразия по гену BoLA-DRB3 между различными стадами черно-пестрой породы. С использованием математических индексов подсчитан уровень биоразнообразия в 8 изученных стадах крупного рогатого скота по гену BoLA-DRB3. На основании полученных данных проведено сравнение биоразнообразия между породами и стадами крупного рогатого скота в хозяйствах Брянской области, а также между стадами черно-пестрой породы.

Методология и методы исследования. Исследования крупного рогатого скота по выявлению маркеров устойчивости к вирусу лейкоза проводились в период с 2009 по 2013 гг. Генотипировано 626 голов крупного рогатого скота 5 пород: черно-пестрой, симментальской, швицкой, айрширской, красно-пестрой, разводимых в Брянской области. Анализ полиморфизма гена BoLA-DRB3 проводили методом ПЦР-ПДРФ. Достоверность положений и выводов подтверждена статистической обработкой.

Положения, выносимые на защиту.

1. Оценка генетического потенциала устойчивости к лейкозу 8 популяций крупного рогатого скота 5 пород, разводимых в Брянской области, по аллелям гена BOLA-DRB3.

2. Высокий полиморфизм гена BOLA-DRB3, как критерий оценки генетической структуры и разнообразия молочного скота, разводимого в Брянской области.

3. Насыщение популяций молочного скота аллелями устойчивости к вирусу лейкоза, способствует снижению количества животных с клиническими проявлениями лейкоза.

4. Использование индексов Бриллюэна (H_B), Тейла (R_T) и Топтикова (K_d) как наиболее информативных для количественной оценки аллельного разнообразия в популяциях КРС.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Обоснованность научных положений и выводов базируется на полученном

фактическом материале и его анализе с применением методов математической статистики. Результаты получены в трехкратной повторности. Полимеразная цепная реакция проводилась с постановкой положительного и отрицательного контролей. Для идентификации полос ДНК использовали системы маркеров молекулярных весов. Выводы соответствуют содержанию диссертации.

Материалы исследований доложены и обсуждены на следующих конференциях: Международная научно-практическая конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, 2010; Научно-практическая конференция «Интеллектуальный потенциал молодежи на службу России», Брянск, 2011; VII Международная научная конференция «Факторы экспериментальной эволюции организмов», Украина, Алушта, 2011; «Международная научно-практическая конференция «Трансфер инновационных биотехнологий в растениеводстве, животноводстве, медицине, экологии», Брянск, 2012; III и IV региональная научно-практическая конференция молодых исследователей и специалистов «Приоритетные направления современной науки: фундаментальные проблемы, инновационные проекты», Брянск, 2012, 2013; Международная научно-практическая конференция «Научное обеспечение инновационного развития животноводства», Жодино, Беларусь, 2013; – на конкурсе УМНИК Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере; - на Всероссийской выставке-форуме РосБиоТех-2012; I Евразийская научно-практическая конференция «Инновационные агробiotехнологии в животноводстве и ветеринарной медицине», С-Петербург, ноябрь 2015 г.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 136 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и заключения (выводы, предложения производству, перспективы дальнейшей разработки темы). Список

цитируемой литературы содержит 156 источников, из них 90 на иностранном языке. Работа содержит 37 таблиц и 40 рисунков.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 8 печатных работ, в том числе 2 в журналах, рекомендованных ВАК.

Работа поддержана грантами: 1. Минобрнауки АВЦП 2.1.1./224 (2009 – 2011) «Развитие фундаментальных исследований по биотехнологии растений, животных, нанобиотехнологии»;

2. ФЦП 1.1. № 02.740.11.0285 (2009 – 2011) «Проведение фундаментальных и прикладных исследований по биотехнологии растений и животных и нанобиотехнологии и развитие малого бизнеса на основе инновационных разработок»;

3. Администрация Брянской области. ХД № 125, (2008 – 2009) «Разработка биотехнологических подходов для повышения рентабельности животноводства в Брянской области (КРС) за счет формирования молочного стада с генетической устойчивостью к лейкозу, высоким потенциалом молочной продуктивности и высоким качеством молока»;

4. Госзадание МОН РФ №41 (2014 – 2016) «Разработка инновационных биотехнологий в генетике, селекции и сохранении биоразнообразия растений, генетике и разведении животных, в племенной работе и ветеринарной медицине на основе современных клеточных, молекулярно-генетических, биоинженерных подходов и методов».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика вирусного гемобластоза крупного рогатого скота

Лейкоз представляет собой заболевание кроветворной системы хронического характера, вызываемое вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС). Изучение лейкозов берет начало в работах Р. Вирхова, который в 1845 году выявил и описал селезеночную и лимфатическую лейкемию у человека. Позднее была описана лейкемия у лошадей. Лейкемией болеют свиньи, собаки, кошки, овцы, козы, куры, а также слоны, лоси, олени и обезьяны. Всего лейкемия диагностируется у 29 видов домашних и диких млекопитающих животных, а также у многих видов птиц [41].

Первый случай заболевания лейкозом крупного рогатого скота описан в 1876 году в Восточной Пруссии у коров черно-пестрой породы остфризского происхождения [42]. Лейкоз крупного рогатого скота (Enzootic bovine leukosis) стабильно входит в список В заболеваний крупного рогатого скота Всемирной организации здравоохранения животных (ОИЕ) и является болезнью обязательной декларации [4]. В настоящее время лейкоз крупного рогатого скота является широко распространенным заболеванием во многих частях света, включая Северную и Южную Америку, а также Восточную Европу. В странах Евросоюза ситуация с лейкозом более благополучная. С одной стороны, это можно объяснить большими объемами финансовых вложений в противолейкозные мероприятия, а с другой, применением более совершенных технологий животноводства. Но несмотря на то, что к настоящему времени ситуация с лейкозом в странах Западной Европы благополучная (последний случай в Великобритании, к примеру, был официально зарегистрирован в 1996 году), в популяции КРС этих стран до сих пор отмечаются случаи заболевания [36; 61]. Остается актуальной проблема лейкоза в Соединенных Штатах. В 1996 г. в результате мониторингового обследования 1006 молочных хозяйств был установлен

уровень неблагополучия, составивший 89%. При этом 75% из этих хозяйств имели уровень вирусоносителей более 25%. Следующее широкомасштабное обследование, проведенное в 2007 году, выявило уровень неблагополучия – 83,9% [118].

Несмотря на то, что в России раньше случаи лейкоза крупного рогатого скота встречались крайне редко, в настоящее время это заболевание имеет статус одного из самых распространенных [12; 47; 65]. В зависимости от особенностей развития опухолевых клеток, лейкозы разделяют на группы: собственно лейкозы и гематосаркомы. Лейкозы могут проявляться в виде лимфоидной, миелоидной, моноцитарной и недифференцированной форм [41]. Термин «лейкоз» является более старым устоявшимся термином. В настоящее время все большее распространение получает термин гемобластоз, который является синонимом термину «лейкоз».

Заражение вирусом ВЛ КРС происходит двумя путями: горизонтальным и вертикальным. Передача вируса от матери плоду имеет гораздо меньшее распространение, чем полагали ранее. Согласно одним исследованиям, лишь у 3-10% (обычно не более 6%) телят инфицированных коров выявляются антитела [34]; по другим данным – до 19% телят от коров с ПЛ заражаются пренатально [55]. Но вероятность внутриматочного заражения телят вирусом резко возрастает (до 20%) при наличии клинических проявлений у матерей в виде гематологических сдвигов и на более поздних стадиях – опухолевых образований [35]. Вероятность передачи вируса со спермой быка, зараженного ВЛ КРС, крайне низка.

подавляющее большинство случаев заражения вирусом лейкоза происходит горизонтально. Факторами, способствующими распространению вируса, в данном случае являются нарушение условий раздельного содержания вирусоносителей и свободных от вируса животных и несоблюдение правил проведения ветеринарных мероприятий. Вирус распространяется при совместном содержании здоровых и РИД-положительных животных, при проведении отелов здоровых и больных

коров в одном помещении, а также при проведении прививок, мечении животных, фиксации за носовую перегородку, взятии крови. Источниками вируса также могут быть молоко и молозиво. Обычно вирус попадает в организм теленка через молоко (не чаще чем в 7% случаев), заражение зависит от титра частиц вируса в молоке. Дальнейшее развитие гемобластоза будет определяться в большей степени иммунным статусом теленка. Молозиво несет зачастую специфические антитела к вирусу и способствует успешному подавлению развития вируса в организме. Заражение через молозиво возможно, если титр вируса в нем высок одновременно с низким титром специфических антител [31].

Однако попадание вируса в организм животного не обязательно приводит к развитию лейкоза. Для начала лейкозного процесса необходимо сочетание ряда факторов. Показано, что одним из важнейших факторов в развитие лейкоза крупного рогатого скота является генетическая предрасположенность животного к болезни. В зараженных популяциях коров некоторые животные способны проявлять устойчивость к вирусу, при этом у этих животных отсутствуют клинические признаки лейкоза, и одновременно наблюдается низкий титр вируса в крови в течение всего периода продуктивного использования.

1.2 Распространение и меры борьбы с гемобластозом крупного рогатого скота

В России с начала 90-х годов прошлого века, наблюдается стабильное ухудшение ситуации по лейкозу крупного рогатого скота. Как указывает Н.М. Шарифуллина (2005) количество пунктов, неблагоприятных в отношении лейкоза, постоянно увеличивается. Если к началу 1990 года количество хозяйств, где декларировался лейкоз крупного рогатого скота, составляло 1476, то в последующие годы эта цифра увеличивалась и составила: 1998 г. – 2623, 2001 г. – 2707, 2002 г. – 2989, т.е. произошло увеличение заболеваемости в два раза [56]. Согласно отчетам Федеральной

службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору [60; 62], ежегодно в течение десятка лет во многих областях Российской Федерации регистрируются случаи лейкоза, при этом положительная динамика в эпидемиологической ситуации отсутствует (рисунки 1-4).

В 2013 году выявлено 461 пункт неблагополучных по лейкозу. Ежегодно исследованиям РИД подвергается около 60% поголовья, из них до 10% оцениваются как гематологически положительные. В течение 2013 года на РИД было исследовано 3083 тыс. голов, из них 45,7 тыс. – «положительные», при этом выбраковано 37,7 тыс. голов. В 2010 году был превышен эпидемиологический порог по лейкозу крупного рогатого скота. Несмотря на забой больного РИД-положительного скота, в хозяйствах остаются как вирусоносители, так и животные с субклиническими и клиническими признаками заболевания. Следует сказать, что в среднем в хозяйствах выбраковывается только около 5% от числа РИД-положительных особей.

По данным за 2008-2013 годы лейкоз входит в десятку заболеваний, составляющих 80% неблагополучия в хозяйствах, где разводится крупный рогатый скот (рисунок 5 а, б). Причем, если в 2008 году лейкоз занимал 8-е место по неблагополучности, то в 2013 году он на 1-ом месте. А по заболеваемости лейкоз стабильно в течение последних лет занимает первое место среди болезней крупного рогатого скота в России (рисунок 6 а, б) [60; 62].

Неблагоприятная ситуация по распространенности лейкоза в хозяйствах отражается на качестве продукции. Так, за 2011 год были официально выявлено несколько случаев присутствия вируса лейкоза крупного рогатого скота в молочной продукции. Такая ситуация особенно опасна, так как отражается на качестве молочной продукции.

Молоко больных и здоровых лейкозом коров значительным образом отличается по целому ряду показателей. Так, в молоке лейкозных коров присутствуют вещества, являющиеся пищевыми токсикантами [9],

установлено снижение уровня белка и аминокислот в молоке больных коров [26]. Кроме того, вирус, присутствующий в молоке в больших количествах, является потенциально онкогенным для человека [3; 5].



Рисунок 1 – Динамика проведения диагностических исследований на лейкоз КРС и положительных результатов за 2004-2008 гг. (Россельхознадзор, 2008)

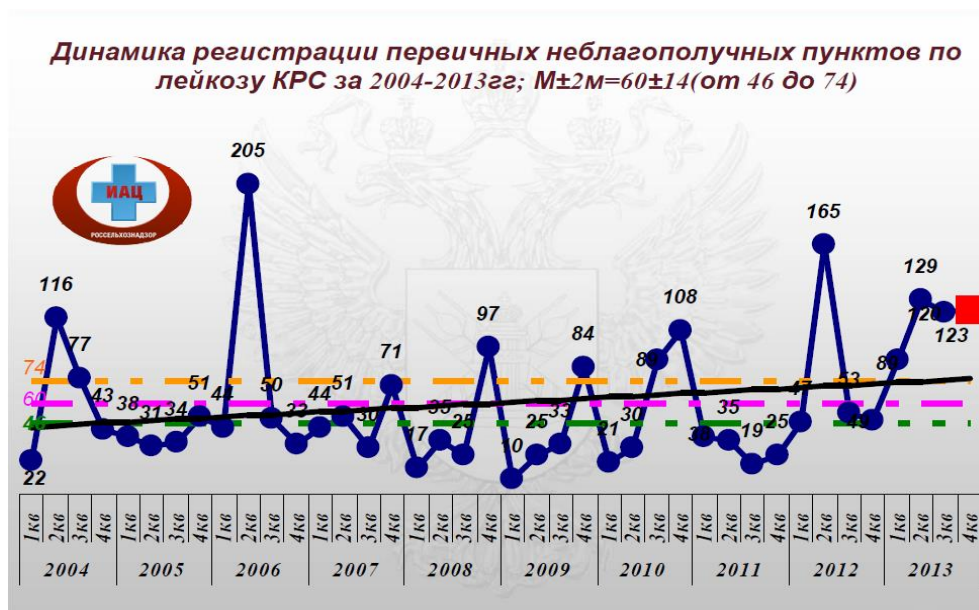


Рисунок 2 – Динамика регистрации первичных неблагополучных пунктов

по лейкозу КРС за 2004 - 2013 гг. (Россельхознадзор, 2013)

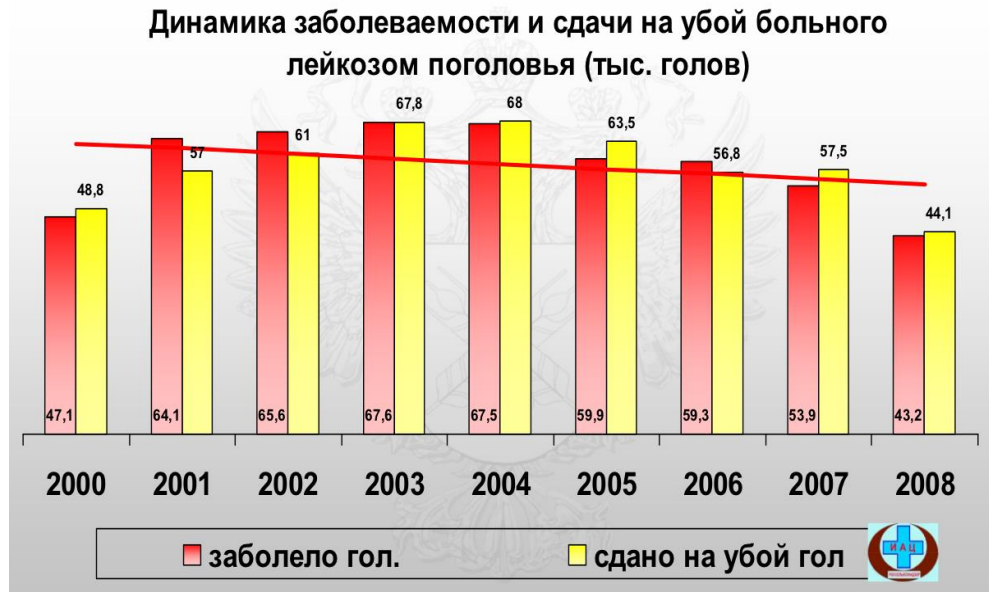


Рисунок 3 – Динамика заболеваемости и сдачи на убой больного лейкозом поголовья (тыс. голов) (Россельхознадзор, 2008)

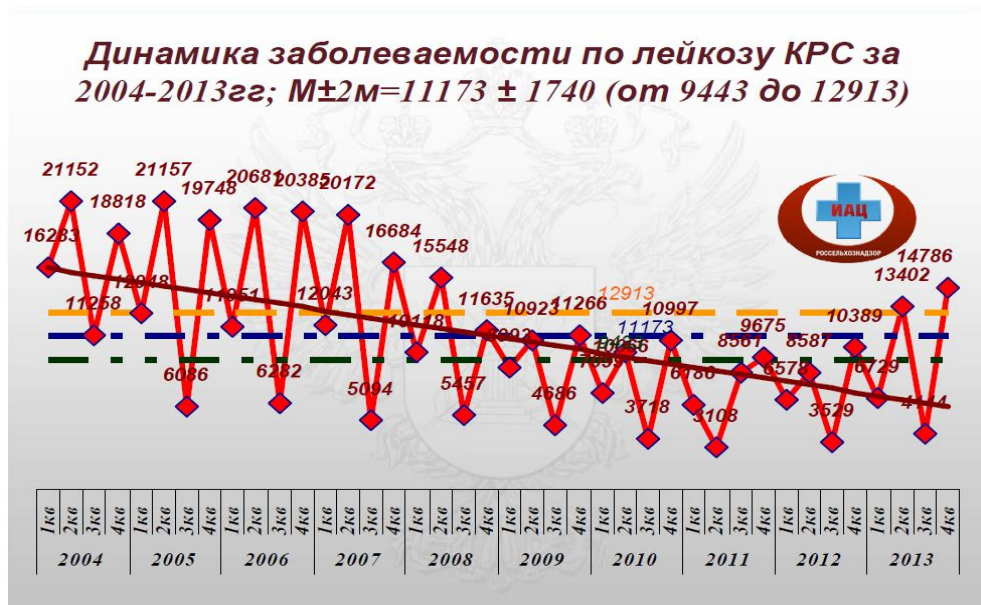


Рисунок 4 – Динамика заболеваемости по лейкозу крупного рогатого скота за 2004-2013 гг. (Россельхознадзор, 2013)

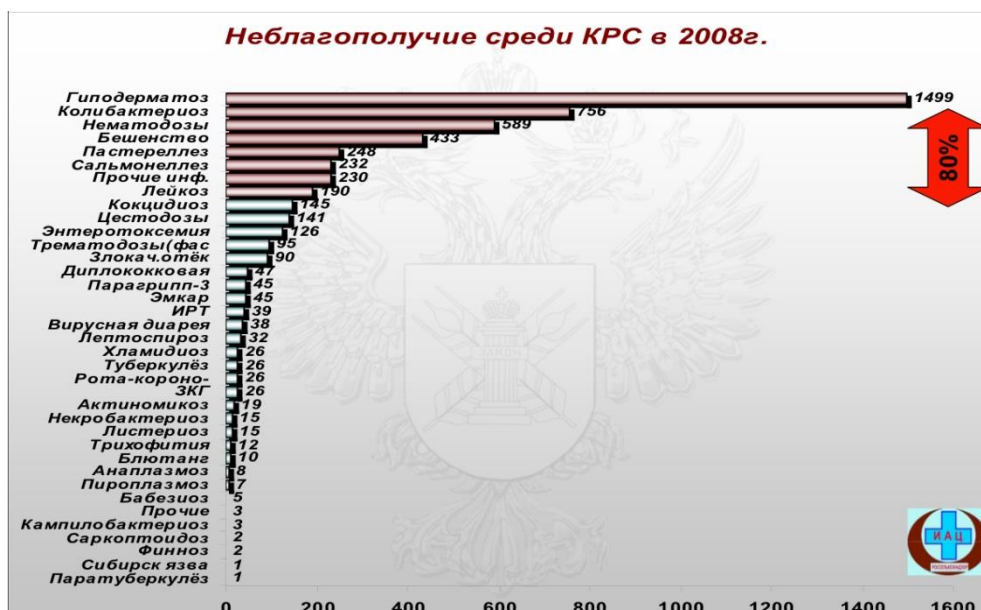


Рисунок 5а – Болезни, составляющие неблагополучие КРС в 2008 г.
Цифрами обозначено количество неблагоприятных пунктов
(Россельхознадзор, 2008)

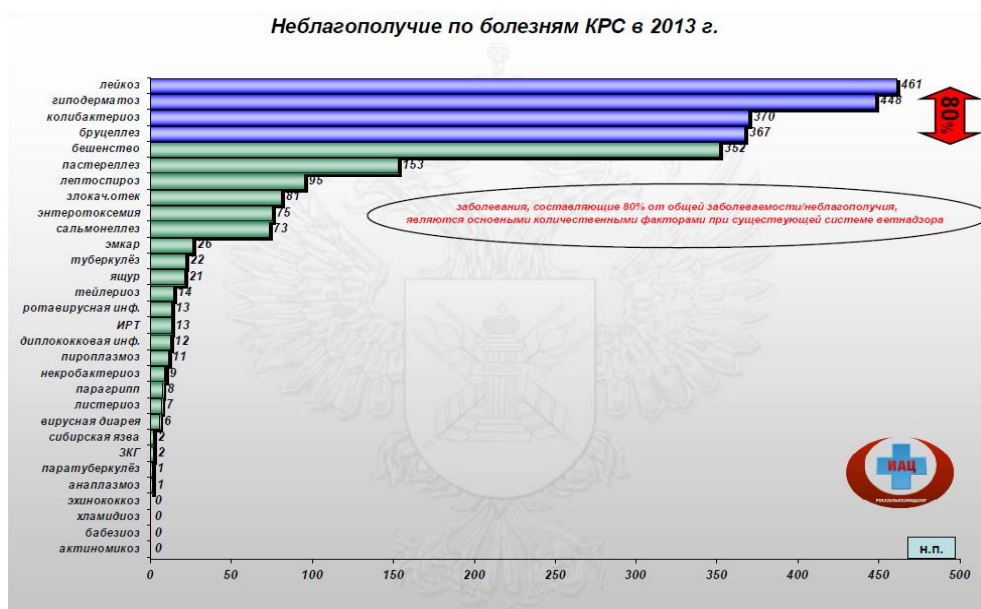


Рисунок 5б – Болезни, составляющие неблагополучие КРС в 2013 г.
Цифрами обозначено количество неблагоприятных пунктов
(Россельхознадзор, 2013)

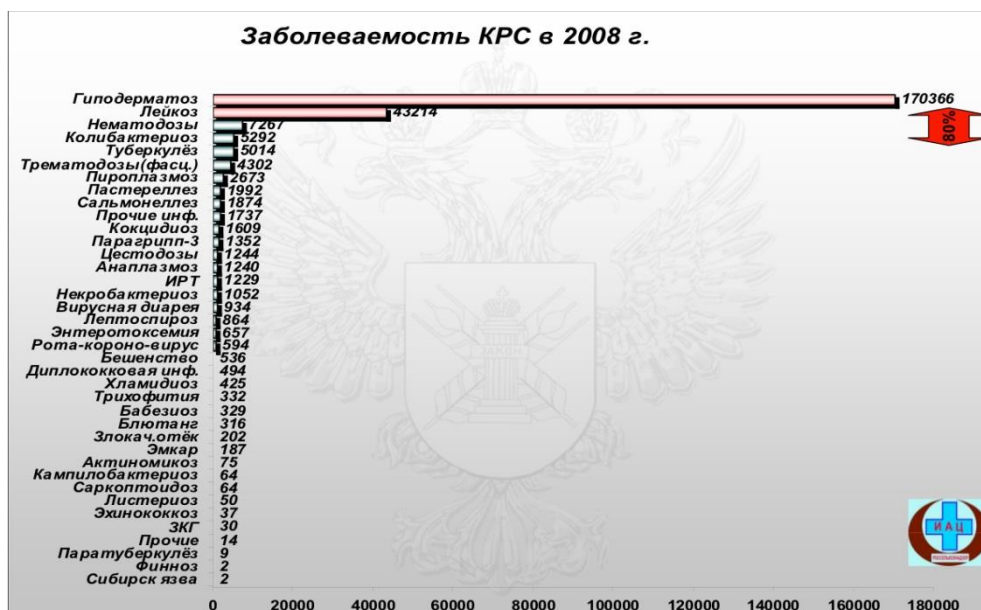


Рисунок 6а – Болезни КРС, наиболее часто встречающиеся в 2008 г. Цифрами обозначено количество официально декларированных пунктов (Россельхознадзор, 2008)

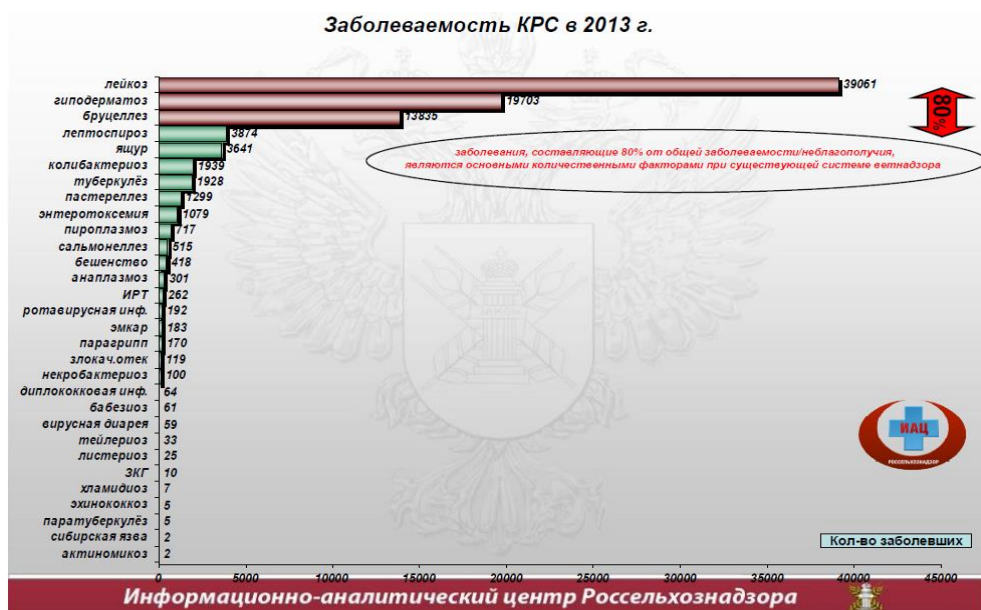


Рисунок 6б – Болезни КРС, наиболее часто встречающиеся в 2013 г. Цифрами обозначено количество официально декларированных пунктов (Россельхознадзор, 2013)

Очевидна необходимость применения мер борьбы с лейкозом не только на уровне каждого отдельного хозяйства, но и с помощью мер, принимаемых на уровне государства. В начале двухтысячных годов во всех областях Российской Федерации была принята программа по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота. В Брянской области в период с 2002 по 2006 годы осуществлялась «Целевая программа оздоровления крупного рогатого скота от заболевания лейкозом» [1]. Для достижения поставленной цели была запланирована реализация следующих задач: укрепление материально-технической базы ветеринарных лабораторий; оздоровление всех племенных и товарных хозяйств от вируса лейкоза крупного рогатого скота; снижение уровня инфицированности животных; создание гарантированных условий для оздоровления хозяйств. Следует сказать, что общие затраты, которые были необходимы для осуществления программы, составили 8601,39 тыс. руб. При этом более половины данной суммы – 4864, 73 тыс. руб. – пошло на организацию противолейкозных мероприятий, в том числе приобретение инструментария для взятия проб и проведения дезинфекции животноводческих помещений. Успешная реализация программы предполагала оздоровление всех неблагополучных хозяйств от вируса лейкоза крупного рогатого скота и недопущение распространения инфекции в благополучные хозяйства. Ежегодно предполагалось исследовать на наличие вируса 190,0 тысяч голов скота, при этом, положительно реагирующие животные исследуются дважды в год.

В 2012 году в Брянской области исследовано серологически 206467 голов крупного рогатого скота, выявлено серопозитивного скота 13083 голов, инфицированность составила 6,3%, что на 3,4% ниже к уровню 2011 года.

Гематологическим методом исследовано 34735 голов, выявлено гематологически больного скота 434 голов, или 1,2% к исследованным, что на 0,1% ниже уровня прошлого года. Сдано на убой 367 голов гембольного скота. В области зарегистрировано 130 хозяйств свободных от вируса лейкоза, а вирусоносительство – в 162 хозяйствах.

На 01.01.2012 года в области имелось 19 хозяйств неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота в 12 районах (таблица 1).

Таблица 1 – Сведения о хозяйствах Брянской области, неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота на 01.01.2013 г.

Наименование хозяйства	Дата наложения ограничения	Наличие поголовья		Заболело лейкозом	Сдано РИД+	Осталось РИД+ на 1.01.13 г.
		всего	в т. ч. коров			
СПК «Заря» Брасовский р-н	2001	789	330	-	-	429
ОАО «Бежицкое» Брянский р-н	2007	1022	670	21	31	437
ООО «Деснянские Зори» Выгоничский р-н	2001	381	205	6	12	244
СПК «Кожановский» ООО «Петровобудское» Гордеевский р-н	2000 2000	448 473	414 381	5 10	- -	- 18
ЭСХ «Дятьково» ООО «Березино» Дятьковский р-н	1989 1989	2471 338	814 200	- 6	- 12	534 120
СПК «Коммунар» Жуковский р-н	1994	326	204	-	12	163
ОАО «Железнодорожник» Карачевский р-н	2001	849	410	-	24	61
К-з «Симонтовский» КФХ «Дедопенько» Мглинский р-н	2000 2000	438 183	325 83	- 4	- 24	125 41
ГНУ НСОС ВНИИ люпина РАСХН ФГУП «Волна революции» Новозыбковский р-н	2001 2010	126 685	70 260	- 4	35 -	16 110
ООО «Городищенское» ООО «Красная Роща» ООО «Гетуновка» Погарский р-н	2000 1996 2000	375 645 467	180 400 225	- 2 1	- 4 10	132 29 71
ООО «Тюнинский» Рогнединский р-н	2012	335	200	-	138	-
СПК им. Куйбышева Севский р-н	2001	301	120	-	-	109
СПК «Родина» СПК «Серп и Молот» Суражский р-н	2000 2000	316 951	266 260	3 1	2 1	257 95
ИТОГО		11939	6017	63	305	2991

Постановлением управления ветеринарии Брянской области № 27 от 31.07.2012 г наложены ограничения по лейкозу крупного рогатого скота на территорию ООО «Тюнинский» Рогнединского района, где отмечалось высокое вирусносительство – 62% и перезаражение скота. В связи с ликвидацией данного хозяйства, распоряжением начальника управления ветеринарии Брянской области № 46 от 11.10.2012 г, сняты ограничения по лейкозу крупного рогатого скота.

В неблагополучных пунктах исследовано: по РИД всего крупного рогатого скота 7421 гол., выявлено реагирующих 1871 гол., или 25% от исследованных, что на 0,2% выше уровня 2011 года, из них коров исследовано 4040 гол., выявлено реагирующих 1335 гол., или 33%, что на 6,2 % выше уровня прошлого года.

Молодняка исследовано 3211 гол., выявлено РИД-положительных 502 гол., или 15,6%, что на 0,2 % выше уровня прошлого года, быков-производителей исследовано 113 гол., выявлено 32 гол., или 28,3 %, что на 8,6% выше уровня прошлого года.

По гематологии исследовано 6241 голов, выявлено больных 63 голов, или 1 % от исследованных, что на 1 % ниже уровня прошлого года.

В хозяйствах области на 01.01.2013 года осталось 192 головы гембольного скота, из них 57 голов в неблагополучных пунктах.

В частном секторе исследовано по РИД 42433 голов крупного рогатого скота, выявлено инфицированных 2137 голов, или 5% от исследованных, что на 1,4% ниже уровня 2011 года. По гематологии исследовано 2267 голов крупного рогатого скота, выявлено 22 головы больных животных, или 1 %, что на 0,2 % выше уровня прошлого года.

Таким образом, лейкоз крупного рогатого скота причиняет значительный экономический ущерб, который заключается в следующем:

- снижение количества (на 5-20%) и качества молочной продукции;

- преждевременный падеж или вынужденная выбраковка и убой больных животных;
- затраты на обеззараживание молока методом пастеризации, так как сырое молоко от заражённых животных запрещено использовать для питания людей;
- недополучение молодняка, потеря его племенной ценности и ограничение в реализации;
- затраты на проведение противолейкозных мероприятий. Кроме того, больные лейкозом коровы более восприимчивы к инфекционным и незаразным заболеваниям. При этом увеличивается яловость, снижается выход телят, наблюдаются аборт. Телята от таких коров чаще страдают расстройствами пищеварения и болезнями органов дыхания.

1.3 Структура главного комплекса гистосовместимости крупного рогатого скота (Bovine Leukocyte Antigens)

Открытие К. Landsteiner групп крови в 1900 году положило начало исследованиям по совместимости тканей животных. Однако открытие антигенов лейкоцитов произошло лишь в 50-е годы прошлого столетия. Это связано с тем, что до этого изучение явлений гистосовместимости проводилось в основном на мышах, которые, как оказалось, являются уникальными объектами: антигены гистосовместимости у них находятся на эритроцитах, а не на лейкоцитах. Впоследствии в ходе экспериментов по пересадке лоскутов ткани у абсолютно совместимых по антигенам эритроцитов особей одного вида были обнаружены антигены лейкоцитов, которые ответственны за отторжение тканей. Открытую систему лейкоцитарных антигенов стали называть главным комплексом гистосовместимости (ГКГ). Впоследствии было установлено, что ГКГ включает не только гены, ответственные за тканевую совместимость, но и гены, регулирующие иммунный ответ организма – Ir гены (Immune response genes). В настоящее время показано что, главный комплекс

гистосовместимости играет ключевую роль в иммунных реакциях всех высших позвоночных. Система ГКГ изучалась у млекопитающих, птиц, рептилий и рыб [89; 90; 102], а также у домашних видов: крупного рогатого скота [76], коз [77], кур [74; 156], свиней [98], кошек [148; 154], лошадей [67], овец [84; 131], собак [128].

Наличие главного комплекса гистосовместимости у крупного рогатого скота было доказано в 70-х годах XX века [68; 137]. В 1978 году исследователи из различных независимых лабораторий собрались на Международном совещании, где была принята первая номенклатура BoLA – Bovine Leukocyte Antigens [138].

Местом локализации генов BoLA является 23-я хромосома (рисунок 7) [71]. Некоторые исследователи отмечают сходство в расположении локусов 23-й хромосомы крупного рогатого скота, 6-й хромосомы человека и 17-й хромосомы мыши [69]. BoLA представляет собой регион, в котором сосредоточено большое количество генов, которые разделяются на три класса: I, II и III [109; 145].

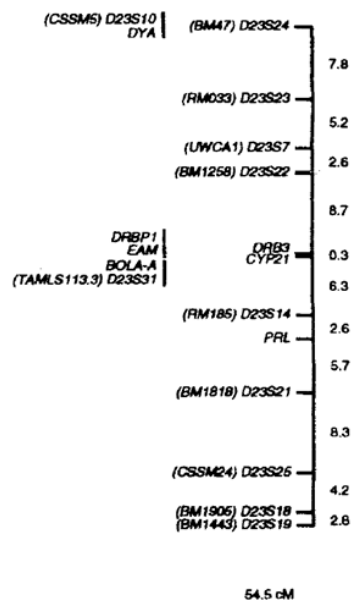


Рисунок 7 – Генетическая карта 23-й хромосомы крупного рогатого скота, усредненная по полу (по Beever [et al.], 1996 [71])

Класс I представлен трансплантационными антигенами. Антигены класса I находятся на поверхности практически всех клеток, имеющих ядра. Продуктами этих генов являются белки с небольшой молекулярной массой, α -цепь которых ассоциируется с β_2 -микроглобулином.

Регион класса I содержит множество дополнительных генов, часть из которых является псевдогенами. Кроме того, там имеются дополнительные гены, которые проявляют активность в специфических тканях или на определенных стадиях онтогенеза [70].

Функциональная роль антигенов класса I не вполне ясна. С определенной долей уверенности можно сказать, что роль классических антигенов заключается в представлении процессированных антигенов на поверхности клеток, зараженных вирусом или раковых клеток Т-лимфоцитам, обеспечивая цитотоксическую реакцию на инфицированные клетки.

К классу II относятся несколько локусов, каждый из которых обычно представлен двумя-тремя генами. Каждый из этих локусов кодирует свои тяжёлые α -цепи и лёгкие β -цепи, образующие гетеродимер. Гетеродимер функционально связан с цепью, кодируемой за пределами ГКГ на другой хромосоме.

Молекулы класса II представляют собой гликопротеиды на поверхности антиген-представляющих клеток иммунной системы (макрофаги, В-лимфоциты и субпопуляции Т-клеток), функция которых состоит в том, чтобы представить чужеродные белки Т-клеткам, которые затем стимулируют специфический иммунный ответ [93; 94]. Процессированные чужеродные антигены связываются с молекулами ГКГ класса II и представляются соответствующим популяциям Т-лимфоцитов, которые экспрессируют маркер дифференцировки – неполиморфный мембранный гликопротеид CD4, имеющий четыре внеклеточных домена.

Гены II класса КРС, в отличие от таковых человека и мышей, локализованы в двух находящихся на расстоянии друг от друга областях: Па и Пб. Между ними частота рекомбинации 17% [81; 82].

Область Па представлена генами DRA, DRB1, DRB2, DRB3, DQA, DQB, а область Пб включает гены DOB, DYA, DYB, DIB. Обнаружены один ген DOB, DRA, DIB, DYA, DZA и DYB, два гена DQA и DQB, а также три гена DRB [69; 96; 133; 137].

Ген BoLA-DRB3 общепринят как маркерный при определении устойчивости и чувствительности крупного рогатого скота к лейкозу. Существует еще два DRB гена, но ген DRB1 является псевдогеном, а ген DRB2 практически не экспрессируется в организме животного.

На настоящее время идентифицированы аллели генов DRB1, DRB2 и DRB3 и разработана номенклатура двух аллелей DRB1, одного аллеля DRB2 и более сотни аллелей DRB3.

Ген BoLA-DRB3, как типичный ген II класса, состоит из 6 экзонов (рисунок 8). Сигнальный пептид кодируется первым экзоном вместе с первыми четырьмя аминокислотными остатками первого домена, второй экзон кодирует приблизительно 90 кодонов первого домена, третий экзон - 94 кодонов второго домена, четвертый экзон несет информацию о трансмембранном гидрофобном пептиде (30 кодонов) и небольшой части цитоплазматического хвоста, большая часть которого закодирована в пятом и шестом экзонах (приблизительно 20 кодонов).

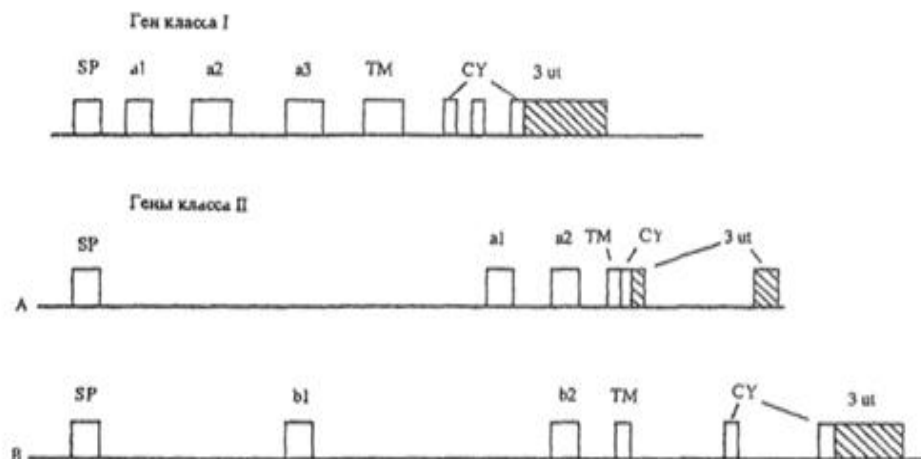


Рисунок 8 – Экзон-интронная структура А- и В-генов II класса и гена I класса (а цепь) ГКГ. SP-сигнальный пептид; a1, a2, b1, b2 - первый и второй домены в А- и В-генах, соответственно; ТМ – трансмембранный участок; СУ – область, кодирующая цитоплазматическую часть молекулы (по Auffray C., Strominger J. L., 1986 [70])

Последний экзон обычно несет информацию о 3'-нетранслируемой последовательности [51]. Структурные элементы белка кодируемого антигена четко соответствуют экзонам гена: получаемая β-цепь вместе с α-цепью, экспрессируемой геном BoLA-DRA, образуют белковый гетеродимер, каждая цепь которого представлена двумя внеклеточными доменами, гидрофобным трансмембранным участком и цитоплазматическим хвостом.

Следует отметить, что полученные в ходе секвенирования последовательности указанных выше генов имеют большую степень сходства с генами ГКГ человека.

Показано также наличие неравновесного сцепления между различными генами I и II класса. Отсюда возможно наличие протяженных гаплотипов, в которых комбинированы различные аллели. Такое сцепление, по-видимому, может являться причиной тесной функциональной взаимосвязи между продуктами генов, входящих в гаплотипы.

У других животных главный комплекс гистосовместимости имеет аналогичное строение. ГКГ мыши [95] (H-2) включает гены иммунного ответа I-A и I-E, сходные с DQ и DR, также, есть гомологи DOB, DRA, DPB, DRB, DQA, DQB и DYA генов [126; 132]. Лocusы ГКГ мыши менее удалены друг от друга, поэтому весь регион короче. Найдены гомологи генов DP, DQ и DR в геноме свиньи, крысы и собаки, гены гомологи DQ, DR, DOB и DZA – в геноме овцы. В геноме лошади имеются гены, гомологичные DR и DQ [126]. Вероятно, для всех высших позвоночных характерна консервативная первичная, вторичная и третичная структура продуктов генов класса I и II [104].

1.4 Характеристика вируса лейкоза крупного рогатого скота

Лейкоз крупного рогатого скота вызывается вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС). Этот вирус относится к роду *Deltaretrovirus*, семейству *Retroviridae*, подсемейству *Oncornaviridae*, которое представляет собой группу РНК-содержащих вирусов. С момента открытия вируса в 1969 году [116] были выявлены его онкогенные свойства [27; 59; 88] и доказана его инфекционность не только для крупного рогатого скота, но и для ряда других сельскохозяйственных животных [13; 99; 114].

ВЛ КРС имеет структурное сходство с Т-вирусом лейкоза человека и обезьян [111]. Существует гипотеза о наличии общего предка у этих двух вирусов в основе, которой лежат данные о гомологии их *pol*-генов, а также белков *p24* и *gp51* [129].

Геном ВЛ КРС представлен 8,7 тыс. нуклеотидами (рисунок 9). Как и все вирусы данной группы, ВЛ КРС имеет в своем составе центральный комплекс из белков и РНК, окруженных двуслойной мембраной с рецепторами на поверхности. Всего вирус состоит из 6 белков: 4 негликозилированных (*p10*, *p12*, *p15*, *p24*), представляющих центральный комплекс и 2 гликозилированных: трансмембранный белок *gp30* и поверхностный *gp51*.

Находясь в цитоплазматических вакуолях, вирус размножается отпочковыванием от цитоплазматических мембран. Воспроизведение вируса происходит только на основе ДНК провируса, встроенной в геном хозяина. Синтез структурных протеинов обеспечивает ген *gag*, полимеразы – *pol*, белков наружной оболочки, участвующих в проникновении в клетку – *env*, ген *pX* (ВЛ) кодирует трансактиватор транскрипции [103].

Узнав специфический рецептор на поверхности клеточной мембраны, вирус внедряется в клетку. Провирусная ДНК, синтезированная с помощью входящей в его состав обратной транскриптазы, внедряется в ДНК клетки.

Далее вирус экспрессируется в клетке, образуя вирусные РНК и белки. Сформированные вирионы выходят из клетки и цикл начинается снова.

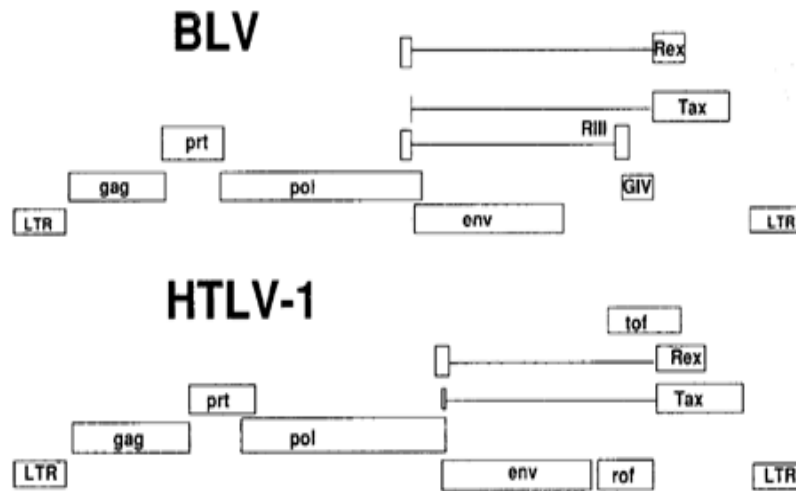


Рисунок 9 – Геном вируса лейкоза крупного рогатого скота и вируса Т-клеточной лейкемии 1 типа (по Schwartz I., Levy D., 1994 [130])

Вирус лейкоза крупного рогатого скота не убивает клетку и может находиться в пассивном (латентном) состоянии длительное время. В полной мере проявить себя как онкогенный вирус может при определенных условиях. Таковыми с одной стороны являются факторы внешней стороны (косвенно), а с другой – состояние иммунитета вирусоносителя.

1.5 Связь структуры локуса BoLA-DRB3 с развитием лейкоза

Размножение вируса и глубина протекания лейкозного процесса находятся под генетическим контролем. В.П. Шишковым и др. (1986) была выдвинута вирусо-иммуногенетическая концепция развития лейкозов, в соответствии с которой инфицированные животные не обязательно болеют – немалую роль в развитии болезни играет генотип [58].

Существует два пути передачи инфекции: вертикальный (пренатально) и горизонтальный (постнатально). Ранее преимущественным в инфицировании ВЛ КРС считался первый путь, но теперь установлена

небольшая вероятность заражения молодняка путем проникновения вируса через плацентарный барьер [8; 37; 55].

На сегодняшний день основным считается горизонтальный путь передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Развитие лейкоза в организме зараженного животного может протекать следующим образом: после инкубационной стадии, длящейся 2-4 месяца, наступает стадия бессимптомного вирусоносительства. Эта стадия по длительности может продолжаться всю жизнь животного без каких-либо клинических проявлений, при этом в его тканях будут обнаруживаться антитела. У некоторых животных развивается персистентный лимфоцитоз [101; 153], который в ряде случаев может прогрессировать с появлением новообразований. Иногда у вирусоносителей вместо персистентного лимфоцитоза может проявляться т.н. персистирующая лимфопения, характеризующаяся отсутствием сдвигов состояния крови, а также других показателей, характерных для лейкоза, и лишь на финальной стадии лейкозного процесса наступает резкое ухудшение состояния здоровья [10].

Заболевшие животные характеризуются усиленной пролиферацией В-лимфоцитов [87].

В организме животного вирус находится в основном в костном мозге, селезенке, лимфатических узлах, лимфоцитах крови, молоке [28; 59].

ВЛ КРС, в отличие от вируса лейкоза человека, в крови находится в В-лимфоцитах [46]. Это было подтверждено в исследованиях М. Mirsky и др. (1996), которые методами проточной цитометрии с последующим ПЦР на присутствие вирусного генома, протестировали CD5⁺ и CD5⁻ субпопуляции В-лимфоцитов, Т-лимфоциты и моноциты периферической крови зараженных ВЛ КРС животных для выявления распределения вируса среди данных клеток крови [117]. С этой целью изолировали В-лимфоциты, моноциты и Т-клетки, вели их подсчет и анализировали на присутствие провирусной ДНК. У коров без клинических проявлений ПЛ количество клеток уменьшалось с возрастом, тогда как у коров с клиническими

проявлениями ПЛ возраст не влиял на количество циркулирующих в крови клеток, но относительное число моноцитов увеличивалось с течением времени. Относительное количество В-лимфоцитов обеих субпопуляций было больше у коров с ПЛ. Коровы с ПЛ характеризовались увеличением абсолютного числа лимфоцитов. Абсолютное число В-лимфоцитов, содержащих геном вируса, было в 100 раз больше у коров с ПЛ, чем у коров без ПЛ, тогда как абсолютное количество В-лимфоцитов, свободных от вируса, у исследуемых групп не имело достоверной разницы. Вирус обнаруживался преимущественно в CD5+ популяции В-лимфоцитов. Уровень провирусной ДНК в Т-клетках и моноцитах не отличался значительно у двух групп животных. Исследователи не смогли полностью избавиться от контаминации В-лимфоцитами, что, по их мнению, явилось основной причиной обнаружения ДНК вируса в Т-клетках и моноцитах. Таким образом, основной мишенью ВЛ КРС в организме исследованных животных являются В-лимфоциты.

При дальнейшем прогрессировании заболевания нарушение дифференцировки В-клеток приводит к появлению новообразований в лимфоидной системе, характерных для острой фазы – лимфосаркомы. Механизмы, приводящие к разбалансировке пролиферации лимфоцитов, выяснены не до конца, однако установлена связь главного комплекса гистосовместимости с устойчивостью и восприимчивостью к персистентному лимфоцитозу. Кроме того, существует сильная взаимосвязь между заболеваемостью лимфосаркомой и принадлежностью животного к той или иной семье. Наблюдаемые случаи лимфосаркомы соответствовали предполагаемой модели наследования чувствительности к лейкозу [80].

В качестве маркеров генетической устойчивости ранее исследователями рассматривались как гены BoLA-A продуктами экспрессии, которых являются антигены класса I, так и BoLA-D.

Одной из пионерских была работа Lewin H.A. и Vernoso D. (1986), в которой у особей шортгорнского скота была найдена связь между наличием

определенных аллелей генов I класса и усиленной пролиферацией В-лимфоцитов [106]. Подобного рода корреляции показаны и на других породах крупного рогатого скота [107; 122; 139]. Но найденные корреляции оказались не вполне достоверными, и к тому же для разных пород КРС одни и те же аллели обнаруживали разный характер связи с заболеваемостью лейкозом. Было предположено, что продукты BoLA-D локуса является больше вовлеченными в процесс развития болезни, и этот регион оказался более подходящим для целей маркирования, а конкретно второй экзон гена BoLA-DRB3.

В работе Michiel J.T. van Eijk с соавторами (1992) установлена четкая корреляция между наличием аллеля *2A гена BoLA-DRB2 и устойчивостью к персистентному лимфоцитозу у особей [143]. В то же время аллель BoLA-DRB2*1C в большинстве случаев встречался у животных с признаками персистентного лимфоцитоза. При этом данные аллели входят в комплексные гаплотипы с аллелями других генов системы BoLA, такими как DQB аллели и аллели BoLA-A. В этой же работе установлен и доминантный тип наследования устойчивости к развитию персистентного лимфоцитоза, тогда как чувствительность к этому заболеванию наследуется как сложный рецессивный признак, на который влияют множество других генетических, физиологических и экологических факторов. Но, как было указано выше, ген BoLA-DRB2 представляет собой минорный ген, а ген BoLA-DRB1 представляет собой псевдоген, поэтому логичным было предположить, что ответственность за связь с лейкозом в DRB регионе несет ген BoLA-DRB3.

Работа Anlong Xu с соавторами (1993) была одной из первых, где исследователи обнаружили связь полиморфизма гена BoLA-DRB3 с развитием персистентного лимфоцитоза [152]. Следует отметить, что аллели DRB3 определялись ими в связи с другими аллелями BoLA в составе гаплотипов (таблица 2).

Исследователи проанализировали последовательности аминокислот, кодируемые различными аллелями гена BoLA-DRB3 в связи с наличием или

отсутствием у животных признаков ПЛ. Аллели, которые кодировали аминокислотный мотив Glu-Arg в положении 70-71, не были обнаружены у животных с ПЛ. Кроме того, эти аллели (*11, *23, *28) образовывали группу сцепления с аллелем VoLA-DRB3*2A, обнаруженный ранее как аллель, связанный с устойчивостью. Этим же аллелям соответствует уникальный мотив VDRV в положении 75-78.

Таблица 2 – Некоторые гаплотипы VoLA (по Xu A. [et al.], 1993 с изм. [152])

Гаплотип VoLA	DRB3.2 аллель
(A) A20/DQB12/DRB2*3A/DRB3.2*8 (B) A12/DQB11C/DRB2*1C/DRB3.2*16	8 16
(A) A20/DQB12/DRB2*3A/DRB3.2*8 (B) A11/DQB1/DRB2*1C/DRB3.2*24	8 24
(A) A12/DQB11C/DRB2*1C/DRB3.2*16 (B) A11/DQB1/DRB2*1C/DRB3.2*24	16 24
(A) A20/DQB12/DRB2*3A/DRB3.2*8 (B) A15/DQB9B/DRB2*1C/DRB3.2*22	8 22
(A) A14/DQB3A/DRB2*2A/DRB3.2*11 (B) A12/DQB11C/DRB2*1C/DRB3.2*16	11 16
(A) A15/DQB9B/DRB2*1C/DRB3.2*22 (B) A12/DQB7A/DRB2*2A/DRB3.2*28	22 28
(A) A13/DQB7D/DRB2*2A/DRB3.2*23 (B) A20/DQB12/DRB2*3A/DRB3.2*8	23 8

У особей с ПЛ напротив, не было обнаружено ни одного аллеля, кодирующего мотив ER. Среди животных с симптомами ПЛ наиболее частым оказался аллель *16. Больные особи имели также аллели *8 и *22. Для больных ПЛ животных характерно присутствие мотива VDTN в положении 75-78 (соответствует аллелям *16 и *8), а также мотива VDTV (*22 аллель). Эти аллели, кроме того, оказались сцеплены с аллелем VoLA-DRB3*1C, для которого ранее была показана корреляция с предрасположенностью к ПЛ.

Позднее эти данные были подтверждены на животных голштино-

фризской породы, для которых была найдена четкая корреляция между гаплотипом DQA3A/DQB3A/DRB2*2A/DRB3.2*11 и устойчивостью к развитию клинических проявлений персистентного лимфоцитоза, тогда как гаплотип DQA12/DQB12/DRB2*3A/DRB3.2*8 был свойственен больным лейкозом особям [155].

Ответ организма коровы на внедрение ВЛКРС происходит на клеточном уровне и регулируется генами иммунного ответа, т.к. в периферической крови животных, несущих аллели устойчивости, количество инфицированных В-лимфоцитов намного ниже, чем у их восприимчивых сверстниц [108]. Помимо этого, у устойчивых животных в целом количество лимфоцитов ниже [117].

Наличие ДНК-маркеров устойчивости к лейкозу подтверждено рядом работ на животных различных пород в разных странах, в том числе и в России [16; 19; 29; 56; 66]. Проводя сопоставление клинической картины развития заболевания у зараженных ВЛ КРС животных и результатов молекулярного анализа, выявлялись аллели гена BoLA-DRB3, которые с большой долей вероятности ответственны за устойчивость или восприимчивость к вирусу.

В работе М.А. Juliarena с соавторами (2008) на примере голштинской аргентинской породы крупного рогатого скота была установлена связь наличия аллеля *11 с устойчивостью к развитию ПЛ, причем его форма ISAG*0902, обнаруживающая более четкие ассоциации, предлагается на роль генетического маркера устойчивости к развитию ПЛ у крупного рогатого скота. В то же время исследователи выявили значительную подверженность заболеванию тех животных, что несли вариант гена *16. Авторы также указывают на возможную связь аллеля *12 (ISAG*1701) с устойчивостью к лейкозу [100].

Возможность использования 11-го аллеля как молекулярно-генетического маркера устойчивости к лейкозу подтверждается в исследовании И.Г. Удиной с соавторами [54].

Для аргентинского молочного скота С.Ж. Рани и соавторы (2009) также указывают на возможную связь аллелей *25 и *40 с устойчивостью к лейкозу. Подтверждая связь аллелей *11, *23 и *28 с устойчивостью к развитию ПЛ, а аллелей *22 и *24 с чувствительностью, они указывают на различие индекса Шеннона разнообразия аллелей гена BoLA-DRB3 у групп животных с различной степенью тяжести заболевания. Причем, чем глубже ПЛ, тем ниже разнообразие аллелей [123]. В то же время, результаты авторов требуют проверки ввиду небольшого объема выборки (81 особь).

При изучении распределения аллелей локуса BoLA-DRB3 по группам скота в зависимости от наличия ВЛ КРС и признаков лейкозного процесса было обнаружено отсутствие аллелей, обуславливающих устойчивость к ПЛ, в выборке животных с гематологическими сдвигами и, с другой стороны, в этой выборке существенно преобладали аллели восприимчивости [29].

В работе С.В. Измestьева (2006) также установлена корреляция в распределении определенных аллелей по группам животных. Показана роль аллеля *28 в устойчивости к ВЛ КРС: его доля в группе инфицированных животных достигала 20%, тогда как его встречаемость в группе больных была значительно ниже. Также получены свидетельства восприимчивости животных, несущих аллели *8 и *24 к развитию ПЛ [17].

Расчет показателя соотношения шансов (odds ratio, OR) в отношении риска развития ПЛ у животного с тем или иным аллелем, проведенный в работе Н.М. Шарифуллиной (2005) на примере КРС черно-пестрой и симментальской пород Башкирской республики, хорошо согласуется с данными других исследователей. Наибольший риск заболеть был найден у животных с аллелем *8. Достоверные различия также обнаружены для животных, несущих аллели *16, *22 и *24: их носители чаще других болеют лейкозом. Для животных-носителей аллеля *11 наоборот показана высокая устойчивость к ПЛ. Генотипы, включающие аллели устойчивости, преобладали в группе здоровых животных, а генотипы с аллелями восприимчивости имели низкую частоту в группе здоровых животных [56].

Роль аллеля *11 подтверждена в работе С.О. Турковой (2003) на примере красной горбатовской, черно-пестрой и айрширской пород, где этот аллель обнаруживался только в выборках здоровых животных [50].

В исследованиях на стадах черно-пестрой, айрширской и голштино-фризской пород выявлялись аллели устойчивости и восприимчивости к лейкозу [48; 52; 64]. При этом аллели, связанные с устойчивостью, были идентичными как для той, так и для другой породы. То же было установлено и для аллелей восприимчивости. На основе этих данных была доказана универсальность генетических маркеров по крайней мере для этих двух пород.

Был установлен доминантный характер наследования признака устойчивости к развитию лейкоза. Помимо этого, при анализе распределения индивидуальных аллелей среди групп больных и здоровых (в том числе вирусносителей) животных, была обнаружена связь с развитием лейкоза также для аллелей *2, *7, *3, *10 и *18. При этом, аллели *2 и *7 относятся к аллелям устойчивости, а аллели *3, *10, *18 – восприимчивости к лейкозу. Причем аллель *10 обнаружил свою связь с чувствительностью к лейкозу только для айрширской породы, тогда как аллель *18 – только для черно-пестрой. Аллель *22 считается не связанным с устойчивостью или восприимчивостью к лейкозу для черно-пестрой породы, т. е. нейтральным [52].

В исследованиях, проведенных Н.В. Ковалюк (2008) на животных черно-пестрой породы различных групп (РИД-, РИД+, РИД+ с ПЛ), распределение аллелей среди больных и здоровых животных оказалось в соответствии с предполагаемым. В группе особей, больных персистентным лимфоцитозом, наибольшей частотой отличались аллели, которые принято считать аллелями чувствительности, в то время как группа здоровых животных отличалась преобладанием аллелей устойчивости, несмотря на постоянный контакт с больными особями. При этом среди всей совокупности проанализированных больных животных не были найдены генотипы 11/23 и

12/12, а в группе здоровых животных не встречались генотипы 24/24, 15/16, 8/8, 22/22. Автор отмечает высокую частоту встречаемости аллеля *12 в группе здоровых животных, тем самым предполагая его связь с устойчивостью [19].

Таким образом, многочисленные работы различных исследовательских групп по всему миру на различных породах крупного рогатого скота дают основание считать достоверным использование в качестве маркеров устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу аллелей *11, *23 и *28. Аллели *8, *16, *22 и *24 принято считать аллелями чувствительности. Аллель *24 некоторые авторы относят к нейтральному, но только для чернопестрой породы. Однако существует ряд аллелей, статус которых остается неясным, так как в ряде различных работ даются указания на их возможную связь с устойчивостью или чувствительностью. К таким аллелям относятся: *2, *3, *7, *10, *12, *18, *24, *40.

1.6 Предполагаемые модели генетического контроля развития персистентного лимфоцитоза крупного рогатого скота, инфицированных ВЛ КРС

Проведенные исследования показывают независимость генетических особенностей животного с возможностью быть зараженным вирусом лейкоза крупного рогатого скота [63]. Таким образом, теоретически любое животное любой породы может быть инфицировано. Дальнейшее развитие вируса в организме проходит с участием генов иммунного ответа. В настоящее время механизм связи структуры генов главного комплекса гистосовместимости с развитием персистентного лимфоцитоза (ПЛ) остается не до конца ясным. Проведенные в этой области исследования дают возможность предположить, как осуществляется генетический контроль развития болезни.

Для установления связи отдельных аллелей с глубиной протекания лейкозного процесса были рассмотрены их нуклеотидные последовательности. Сопоставить последовательностей кодируемых

аллелями пептидов и характера влияния на развитие ПЛ, позволяет выявить некоторые закономерности (таблица 3).

Во-первых, все аллели устойчивости кодируют аминокислотный мотив ER (Glu-Arg) в позиции 70-71, который не присутствует в продуктах экспрессии аллелей чувствительности [54]. Кроме того, использование аллель-специфических праймеров на данный мотив не выявило его наличие у особей с ПЛ [152]. Аминокислотный мотив VDRV в положении 75-78 так же обнаруживал связь с устойчивостью к ПЛ, но следует заметить, что он сцеплен с ER мотивом. Анализ продуктов экспрессии аллелей чувствительности не позволяет найти какие-то общие для всей группы мотивы.

Таблица 3 – Последовательности аминокислот, кодируемые аллелями гена BoLA-DRB3, и статусы этих аллелей по отношению к ПЛ

Аллель BoLA-DRB3		Последовательность аминокислот		Связь с ПЛ
По van Eijk M. J. et al. (1992)	По Davies, C. J. et al. (1997)	70-71	75-78	
*8	DRB3*1201	RA	VDTY	Ч
*16	DRB3*1501 DRB3*1502	RE	VDTY	Ч
*22	DRB3*1101	RR	VDTV	Ч
*24	DRB3*0101 DRB3*0102	EK	VDRV	Ч
*11	DRB3*0902	ER	VDRV	У
*23	DRB3*2701- DRB3*2707	ER	VDRV	У
*28	DRB3*0701	ER	VDRV	У

Во-вторых, среди особей с ПЛ наиболее часто встречающимся оказывается мотив VDT в положении 75-77, что соответствует *8, *16 и *22 аллелям. В то же время предположение о связи мотива VDT с восприимчивостью к лейкозу требует дополнительных наблюдений, ввиду наличия отрицательного сцепления между этим мотивом и мотивом ER.

Таким образом, прослеживается наличие общих черт в белках, синтезируемых аллелями устойчивости: это наличие мотива ER в положении 70-71 и мотива VDRV – в 75-78, что позволяет использовать эти последовательности в качестве специфического молекулярного маркера на устойчивость к ПЛ; с другой стороны, не до конца понятна функциональная роль данных аминокислотных мотивов.

Все существующие на сегодняшний день гипотезы о функциональной связи структуры гена BoLA-DRB3 и устойчивостью к ПЛ основываются на обобщении результатов исследований, описанных выше.

Иммунный ответ организма обусловлен успешным распознаванием антигена В- и Т-лимфоцитами и макрофагами. Вначале происходит связывание фрагмента антигена, процессированного антигенпредставляющими клетками (макрофагами), с молекулами ГКГ I и II класса. Этот комплекс с антигеном представляется в виде внешнемембранных белков на поверхности макрофага. Т-клетки с помощью поверхностных рецепторов распознают комплекс «фрагмент антигена-пептид ГКГ» на поверхности макрофага. При этом комплекс с белками ГКГ I класса специфически узнается Т-киллерами, а II класса - Т-хелперами.

Предполагается, что присутствие у животного аллелей устойчивости гена BoLA-DRB3 обуславливает более эффективное образование антигенных комплексов, успешно распознаваемых Т-хелперами, которые через ряд цитокинов активируют быстрое уничтожение инфицированных В-лимфоцитов (клеточный иммунитет) [54]. Рентгеноструктурный анализ белковых комплексов антигенов HLA и пептида из геммаглютинина вируса гриппа выявил непосредственное участие аминокислотных остатков антигена в позиции 70, 71, 74 и 78 в связывании с пептидом. В то же время аминокислоты в позиции 70-71 расположены на самой вершине α -спирали β -цепи МНС-антигена и участвуют в связывании с эпитопом, а также рецепторами Т-лимфоцитов [140].

Наличие тех или иных аллелей гена BoLA-DRB3 влияет на

соотношение вырабатываемых в ходе иммунного ответа Т-хелперов 1 и 2 типа (возможно, что это происходит опосредованно через сцепление с определенными аллелями BoLA-A). При этом у устойчивых животных наблюдается преимущественная выработка Th1-лимфоцитов, которые уже на ранних этапах заражения активируют уничтожение образующихся в большом количестве инфицированных В-лимфоцитов Т-киллерами, тогда как восприимчивые животные отвечают на присутствие вируса выработкой Th2-лимфоцитов, стимулирующих пролиферацию Т-супрессоров, которые в свою очередь, наоборот, стимулируют дополнительную выработку В-лимфоцитов и подавляют иммунный ответ [19; 108; 109; 113].

Еще одной гипотезой является возможная молекулярная мимикрия вируса под белки ГКГ. При попарном анализе продуктов аллелей гена BoLA-DRB3 и пептидов gag, pol, env, tax, rex и rev вируса лейкоза крупного рогатого скота обнаруживается некоторая гомология. Было найден общий участок VDTY в белке pol вируса и продуктах экспрессии аллелей чувствительности *8 и *16, который может представлять собой эпитоп. Данная модель объясняет доминантный характер наследования признака устойчивости. В случае присутствия в гетерозиготе как аллеля устойчивости, так и аллеля чувствительности, в организме будут присутствовать субпопуляции Т-лимфоцитов – каждая с рецепторами к одному из экспрессируемых МНС-антигенам. Даже если одна из субпопуляций Т-лимфоцитов будет «распознавать» инфицированные клетки как свои собственные, то другая будет способствовать их уничтожению, т.е., Т-лимфоциты будут реагировать на каждый МНС-антиген отдельно.

1.7 Использование генетических маркеров для повышения эффективности молочного и мясного производства

Мощным толчком в развитии технологии молекулярных маркеров для разведения крупного рогатого скота послужила полная расшифровка генома коровы [142].

Молекулярно-генетические маркеры позволяют выявлять полиморфизм на уровне ДНК и на настоящий момент являются ключевым подходом в зарубежной генетике и селекции крупного рогатого скота. Они применяются для выявления отцовства, установления породной чистоты животного, для отбора особей с ценными генотипами, что позволяет значительно ускорить селекцию.

Генетический маркер представляет собой участок генома, который связан с хозяйственно-ценным признаком. ДНК-маркеры универсальны и более удобны, чем традиционно-используемые морфологические, кариологические или биохимические маркеры. Это связано с тем, что различия особей на генетическом уровне зачастую не проявляются в фенотипе ввиду эффекта доминирования или низкого уровня экспрессии.

Кроме того, для анализа генома разработано большое количество различных типов ДНК-маркеров на основе единичных нуклеотидных замен (SNP). Они наследуются в соответствии с Менделевскими законами, зачастую представлены значительным числом аллелей (несколько десятков), не подвержены влиянию факторов внешней среды и в отношении них не свойственна плеiotропия для хозяйственно-ценных признаков.

Применение молекулярных маркеров позволило идентифицировать несколько десятков полиморфных локусов в геноме крупного рогатого скота, благодаря чему возможна идентификация отдельной особи, кроме того были найдены гены, ответственные за развитие тех или иных хозяйственно-важных признаков, проведена паспортизация, а также заново исследована и уточнена история происхождения пород крупного рогатого скота.

Существует несколько типов ДНК-маркеров. О'Брайн разделяет их на две группы: маркеры I типа являются геном или частью гена с известной функцией, тогда как маркеры II типа представляют собой просто некий фрагмент того или иного неизвестного гена или просто участка генома [121]. Используемый в данной работе маркер устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу представляет собой в связи с этим маркер I типа, т.к. на

настоящий момент практически доказана функция локуса *BoLA-DRB3* достоверно установлены продукты его экспрессии и их роль в организме.

Можно выделить ряд свойств идеального метода выявления ДНК-маркеров: высокий уровень полиморфизма исследуемого объекта; кодоминантный характер наследования выявляемого ДНК-маркера; широкая представленность в геноме; независимость определения маркера от условий содержания животного и окружающей среды; доступность; легкость и быстрота выявления; высокая производительность; воспроизводимость; универсальность. На настоящий момент практически все применяемые генетические маркеры анализируются с помощью полимеразно-цепной реакции. Существует несколько вариаций этого метода, которые соответствуют определенному типу маркеров. Общие свойства молекулярно-генетических маркеров, основанных на ПЦР, сведены в таблице 4.

Таблица 4 – Свойства ДНК-маркеров (Krutovskii K.V., Neale D.B., 2001 с изменениями [105])

Признак сравнения	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	STS/EST
Источник	Анонимная последовательность / Ген	Анонимная последовательность	Анонимная последовательность	Анонимная последовательность	Ген
Максимальное теоретически возможное число локусов	Ограничено полиморфизмом сайтов рестрикции	Ограничено размером генома и полиморфизмом фрагментов	Ограничено полиморфизмом сайтов рестрикции	Ограничено размером генома и числом сателлитных фрагментов	Ограничено числом экспрессируемых генов
Характер доминирования	Кодоминантный	Доминантный	Доминантный	Кодоминантный	Кодоминантный
Возможность применения одних и тех же праймеров внутри рода / семейства	Среди различных родов	В пределах вида	В пределах вида	В пределах рода или вида	Среди близких видов
Воспроизводимость	Высокая или очень высокая	От низкой до средней	От средней до высокой	От средней до высокой	Высокая
Масса ДНК на пробу, необходимая для анализа	2-10 мкг	2-10 нг	0,2-1 мкг	10-20 нг	10-20 нг

Легкость и удобство разработки	Трудно	Легко	Достаточно легко	Трудно	Достаточно легко
Легкость и удобство применения	Сложный	Легкий	Достаточно легкий	Легкий	Легкий
Возможность применения для картирования геномов и локусов количественных признаков	Хорошая	Очень хорошая	Очень хорошая	Хорошая	Хорошая
Возможность применения для сравнительного картирования	Хорошая	Очень ограниченная	Очень ограниченная	Ограниченная	Очень хорошая
Возможность применения для картирования генов-кандидатов	Ограниченная	Неприменимый	Неприменимый	Неприменимый	Превосходная

Существует огромное количество различных маркеров у крупного рогатого скота. К примеру, исследователи отдела мясного скотоводства научного центра Клэя Соединенных Штатов выделяют более ста ДНК-маркеров, которые могут быть использованы для проведения селекции на улучшения товарных показателей и продуктивности животных мясного направления [97; 141].

На настоящий момент достоверно установлен целый ряд маркеров, связанных с устойчивостью крупного рогатого скота к паразитам (трипаносома, сальмонелла и др.), а также к таким заболеваниям как гемобластоз, мастит, анкилозирующий спондилит, туберкулез, бруцеллез и др. [51; 72; 78; 149].

Существование связи между ДНК-маркерами и важными хозяйственно-ценными признаками открывает возможность для проведения селекции на их основе, что получило название селекции на основе генетических маркеров (Marker Assisted Selection). В настоящее время большинство исследователей признает необходимость и перспективность внедрения маркеров в практику животноводства. Плюсом такого подхода является снижение затрат, связанных с выращиванием и испытанием потомства. Кроме того, возможен

учет признаков, которые невозможно количественно определить (например, молочная продуктивность у быков). Использование молекулярных маркеров позволяет также учитывать несколько признаков при организации племенной работы, сводя к минимуму возможность проявления нежелательных признаков в фенотипе. В настоящее время реализация семени быков-производителей требует обязательного предоставления документов, включающих сертификаты о проверке на маркеры BLAD, DUMPS и Citr. Показано, что отсутствие мутаций по данным маркерам у быков-производителей повышает плодовитость потомства: выход молодняка увеличивается, увеличивается репродуктивный период коровы, телята рождаются более здоровыми.

В работах зарубежных и отечественных авторов доказана связь маркера BoLA-DRB3 с развитием персистентного гемобластоза у крупного рогатого скота, имевшего контакт с вирусом лейкоза КРС. Разработан метод массового скрининга поголовья КРС на данный маркер, в основе которого лежит ПЦР-ПДРФ [73]. На настоящий момент методом ПЦР-ПДРФ найдено 54 полиморфных варианта данного гена, которые идентифицируются с помощью параллельного проведения трех различных рестрикций. Этот подход использован в данной работе для выявления генетической устойчивости крупного рогатого скота к вирусу лейкоза КРС.

1.8 Биоразнообразии и способы его оценки

В настоящее время нет общепринятой точки зрения в отношении универсальной меры оценки биоразнообразия, и не один из существующих методов не получил одобрения хотя бы большинства исследователей [32; 57].

В целом, разнообразие системы складывается из двух компонентов:

- богатства элементов системы, которое характеризуется общим числом имеющихся различных элементов;
- выровненности, заключающейся в «значимости» элемента для системы.

Оценка уровня биоразнообразия в различных методиках сводится к вычислению общего интегрального показателя для каждой выборки и сравнения их между собой. Используемые показатели широко применяются в экологии для расчета биоразнообразия сообществ. Однако сами эти критерии изначально разрабатывались математиками как показатели влияния элементов, составляющих некоторые гипотетические системы, и были заимствованы экологами, в связи с чем эти критерии были использованы применительно к предмету исследования (разнообразие аллелей полиморфного гена популяции).

Индекс Шеннона был разработан для измерения информации в сетях передачи данных [135; 136] и был впервые применен в биологии Р. Маргалефом и Р. Мак-Артуром [112] при исследовании трофической структуры биоценоза для оценки видовой устойчивости и разнообразия биоценоза с использованием энтропии. Р. Левонтин использовал формулу для расчета индекса Шеннона в своих исследованиях популяций человека на основе генетических маркеров [110].

Индекс Шеннона, основанный на формуле энтропии, отображает степень «хаотичности» распределения элементов системы. При этом максимальное значение данного индекса соответствует максимальной «хаотичности» распределения, т.е. такому, когда частоты всех компонентов одинаковы – разнообразие максимальное. Чем меньше данный индекс, тем меньше разнообразие, т.е. больше «упорядоченность» в распределении. Разнообразие в индексе Шеннона трактуется как приходящееся на один компонент количество информации. Индекс относительно «чувствителен» к изменениям частот мажорных компонентов системы.

Важным достоинством индекса Шеннона является нормальность распределения разных индексов Шеннона, рассчитанных для различных выборок. Это позволяет использовать методы параметрической статистики (в т.ч. дисперсионный анализ) для оценки достоверности различий между уровнем разнообразия выборок, выражаемом через индекс Шеннона. Обычно

значения индекса Шеннона лежат в пределах от 1,5 до 3,5, редко превышая 4,5. Чем больше индекс Шеннона, тем больше выровненность распределения, что соответствует максимальному разнообразию системы. Это следует из того, что возрастание индекса указывает на возрастание неопределенности и однородности структуры системы.

Индекс Шеннона рассчитывается как энтропия дискретного множества вероятностей, которая соответствует общей неопределенности всех S возможных исходов:

$$H = -\sum_{i=1}^S p_i \cdot \log_2 p_i, \quad (1)$$

где p_i – частота i -го компонента системы, S – количество компонентов.

Эта формула похожа на формулу, используемую для расчета энтропии в статистике Максвелла-Больцмана. Некоторые исследователи указывают на то, что при использовании индекса Шеннона для оценки некоторых выборок может быть получен результат, способный ввести в заблуждение – все-таки в большей степени этот индекс характеризует компонент выравненности разнообразия [146].

Для оценки только выравненности распределения элементов системы без учета их количества Э. Пиелу [124; 125] предложила индекс выравненности. Индекс зависит только от равномерности распределения частот по компонентам, поскольку представляет собой степень уклонения энтропии от её максимального значения. Эта величина изменяется от 0 до 1, причем равна 1 при равной частоте всех компонентов:

$$E = \frac{H}{\log_2(S)} \quad (2)$$

Не всегда исследователь способен гарантировать случайный отбор объектов в выборочную совокупность и учесть все компоненты системы. Это происходит обычно из-за несовершенных методов сбора материала. В таких случаях подходящей формой информационного индекса может быть индекс Бриллюэна [75], который впервые использован Рамоном Маргалефом для экологических исследований [115]. Недостатком этого критерия является

теоретическая база, которая вызывает критику у некоторых исследователей. Например, в определенных (очень искусственных) обстоятельствах индекс Бриллюэна может подразумевать, что выборка с большим числом компонентов (N) более разнообразна, чем выборка с большим количеством различных компонентов и выровненностью. Этот индекс дает сходную с индексом Шеннона величину разнообразия, редко превышая 4,5. Однако при оценке одного и того же массива данных его величина ниже индекса Шеннона. Это объясняется меньшей степенью неопределенности, свойственной этому индексу в отличие от индекса Шеннона, при расчете которого исследователь основывается на частотах, что автоматически подразумевает стремление охарактеризовать и ту часть системы, что не попала в выборку. Рассчитывая индекс Бриллюэна, мы оперируем численностями компонентов, характеризуя только данную конкретную выборку. Индекс Бриллюэна рассчитывается в соответствии с формулой:

$$HB = \frac{\log_2(N!) - \sum_{i=1}^S \log_2(n_i!)}{N}, \quad (3)$$

где n_i – это количество i -го компонента, N – общее число компонентов.

Индексы доминирования уделяют основное внимание обилию самых обычных компонентов, а не богатству набора. Компоненты, являющиеся единичным или представленными небольшими частотами, не влияют на значения этого критерия. Лучшим считается индекс Симпсона [134]. Этот индекс используется в экологии для оценки вероятности «межвидовых встреч», а также в экономике (индекс Хефиндаля-Хиршмана) и лексикологии для оценки лексического разнообразия. Он описывает вероятность того, что тот или иной аллель будет найден в форме гомозиготы.

Применительно к небольшим выборкам, этот индекс рассчитывается по формуле:

$$D = \sum_{i=1}^S \frac{n_i \cdot (n_i - 1)}{N \cdot (N - 1)}, \quad (4)$$

Индекс Бергера-Паркера – еще одна из часто используемых мер доминирования. Его достоинства – простота вычисления. Индекс выражает относительную значимость наиболее частого аллеля:

$$d = n_{max} / N \quad (5)$$

где n_{max} – количество аллеля с самой большой частотой.

Увеличение индекса Бергера-Паркера, как и индекса Симпсона, означает уменьшение разнообразия и увеличение степени доминирования одного аллеля. Этот индекс не зависит от числа аллелей, но на него влияет размер выборки. Индексы Симпсона и Бергера-Паркера практически дублируют друг друга.

Индекс Тейла:

$$R_T = \log_2 N + H, \quad (6)$$

где H – индекс Шеннона.

Индекс, предложенный В.А. Топтиковым с соавторами (2010) [49]:

$$K_D = \log_2 N / \sum p_i^2. \quad (7)$$

Индекс Макинтоша:

$$D_m = (\sum n_i - U) / (\sum n_i - \sqrt{\sum n_i}) \quad (8); \quad U = \sqrt{\sum p_i^2} * \sum n_i \quad (9); \quad E_m = (\sum n_i - U) / (\sum n_i - \sum n_i / \sqrt{N}) \quad (10).$$

Очевидно, что практически невозможно создать такой индекс, формула которого позволяла учесть все возможные варианты систем и оставалась бы одновременно простой для практического применения.

Наилучший способ представить оба компонента разнообразия (т.е. богатство и выравненность) – построить график, где по оси ординат в логарифмическом масштабе отложено число аллелей, а по оси x – ранжированная последовательность аллелей от наиболее до наименее частого. Полученная кривая названа Р. Уиттекером «кривой доминирования – разнообразия», а Э. Пианка [38] – «кривой значимости». Чем выше кривая и чем более она «уплощена», тем больше при данном числе аллелей их разнообразие. Исходя из характера этой кривой, становится возможным не

только оценить аллельную выравненность популяций, но и роль отдельных аллелей и потенциал. Однако применение такого подхода не всегда удобно, особенно, когда необходимо сравнить между собой большое количество систем.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные исследования выполнялись на базе Инновационного научно-образовательного центра биотехнологии и экологии ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского» в период с 2009-2013 годы. Объектом для исследования являлся молочный скот (коровы) разных пород, разводимый в хозяйствах Брянской области: черно-пестрой (СПК «Агрофирма «Культура», ОАО «Новый путь», ООО «Снежжа-Госома», частное стадо Жирятино), симментальской (СХПК «Большевик»), швицкой (СПК «Красный рог»), айрширской (с. Сельцо), красно-пестрой (колхоз «Память Ленина»). Всего проанализировано 626 голов. Выборка коров из стад каждой породы представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Выборка коров хозяйств Брянской области

Порода	Хозяйство	Кол-во	Условное обозначение выборки
Черно-пестрая, здоровые коровы	СПК «Агрофирма «Культура»	52	ЧП1
	ОАО «Новый путь»	185	ЧП2
	ООО «Снежжа-Госома»	63	ЧП3
	Частное стадо г. Жирятино	81	ЧП4
Симментальская	СХПК «Большевик»	100	СИМ
Швицкая	СПК «Красный рог»	40	ШВ
Айрширская	Частное стадо п. Сельцо	50	АЙР
Красно-пестрая	Колхоз «Память Ленина»	29	КП
Черно-пестрая, больные коровы	ООО «Снежжа-Новоселки»	8	-
	ОАО «Агрогородок Гетманобудский»	18	-

Исследования выполнялись в соответствии со схемой исследований (рисунок 10). Биоматериалом для исследования служила кровь. Отбор крови осуществлялся из яремной или хвостовой вены одноразовыми шприцами объемом 5 мл в стерильные пробирки Флоринского, содержащие 1 мл 0,5М раствора Трилона Б. Кровь хранили в этих же пробирках в холодильнике при температуре +4° Цельсия.

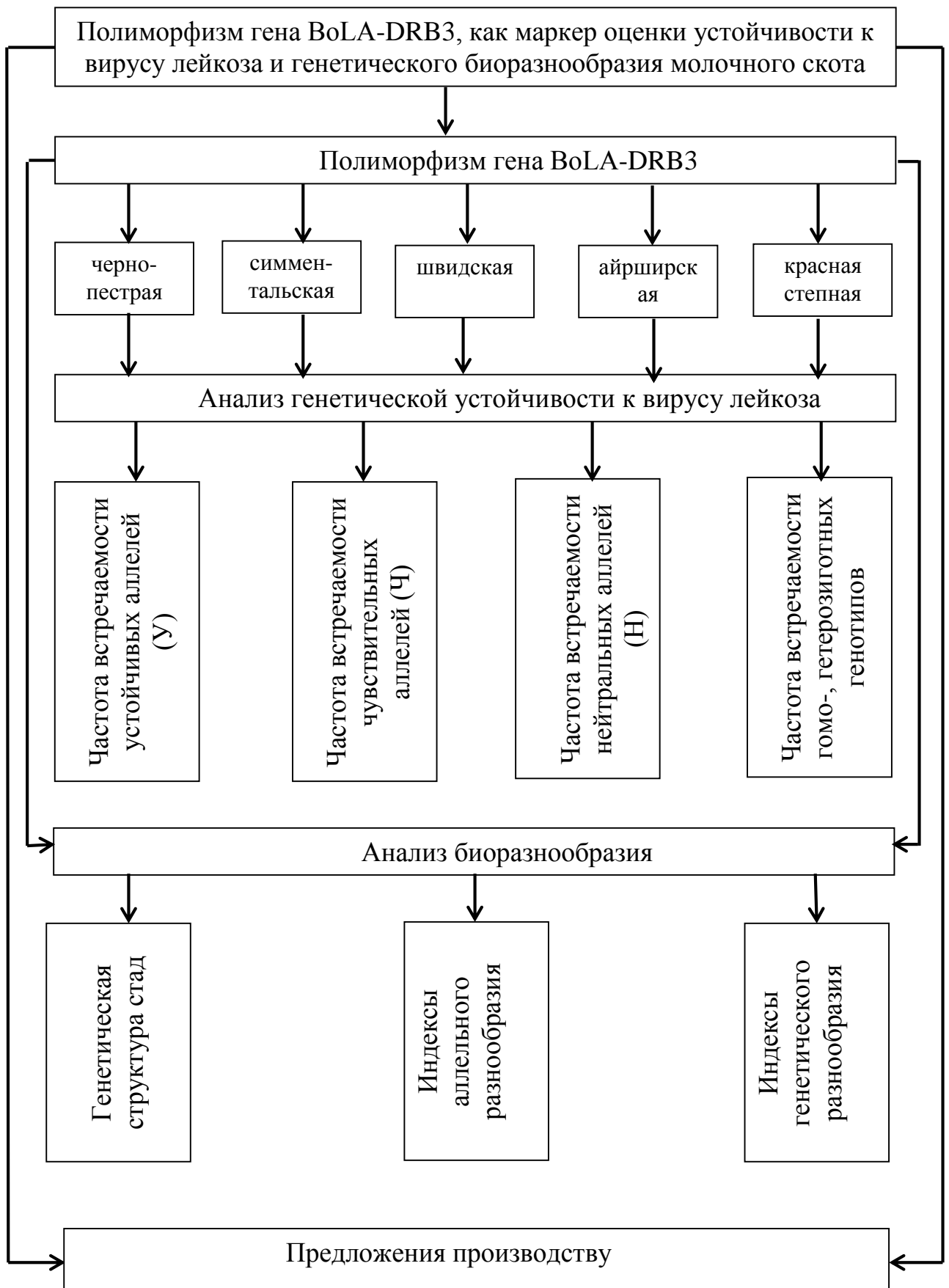


Рисунок 10 – Схема проведения исследований

2.1 Методика выделения ДНК из крови*Протокол выделения ДНК из крови крупного рогатого скота с помощью оксида кремния*

1. В пробирку типа Эппендорф на 1,5 мл внести 150 мкл крови.
2. Добавить 600 мкл лизирующего буфера.
3. Добавить 50 мкл взвеси силики.
4. Взболтать смесь на вортексе и выдержать в течение 5 минут при 65°C с периодическим встряхиванием на вортексе.
5. Центрифугировать смесь 30 секунд при 5000 об/мин.
6. Слить супернатант, а к осадку добавить 500 мкл лизирующего буфера. Взболтать смесь на вортексе.
7. Центрифугировать 30 секунд при 5000 об/мин.
8. Слить супернатант. К осадку добавить 700 мкл солевого буфера и взболтать на вортексе.
9. Центрифугировать 30 секунд при 5000 об/мин.
10. Повторить этапы 8 и 9.
11. Центрифугировать 30 секунд при 10 000 об/мин.
12. Слить супернатант и высушить осадок при 65°C.
13. Добавить 100 мкл бидистиллированной автоклавированной воды и инкубировать 5-7 минут при 65°C с периодическим перемешиванием на Vortex.
14. Центрифугировать 10 минут при 14 000 об/мин. Супернатант представляет собой раствор ДНК и может быть использован для проведения ПЦР.

Качество препарата ДНК проверяли с помощью горизонтального гель-электрофореза в 0,8% агарозе в TBE-буфере. Результаты визуализировали на приборе Gel-Doc фирмы BioRad в проходящем УФ-свете с помощью добавляемого в гель бромистого этидия. Получаемые результаты приведены на рисунке 11.

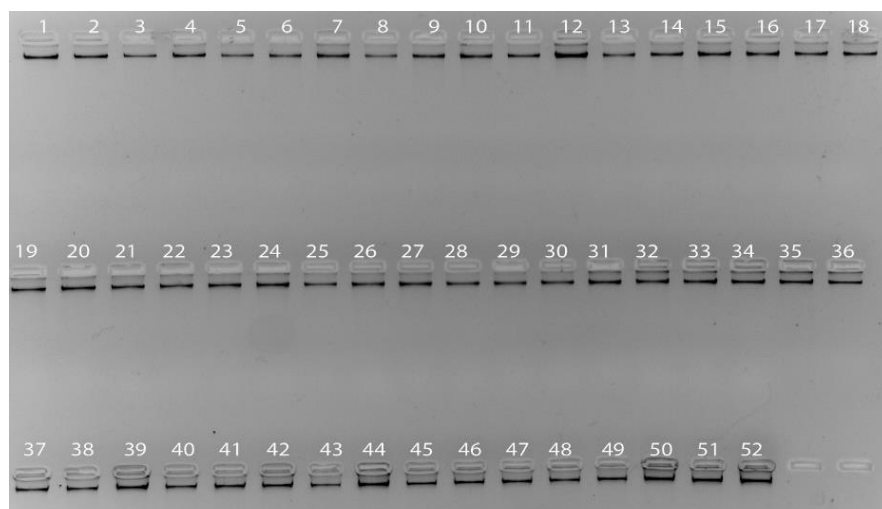


Рисунок 11 – Электрофореграмма препаратов ДНК из образцов крови

2.2 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР проводили в конечном объеме 20 мкл со 100 нг ДНК.

Состав реакционной смеси:

60 mM Трис-НСl pH 8,8

25 mM КСl

1,5 mM MgCl₂

10 mM 2-меркаптоэтанол

0,1% Тритон X-100

0,25 mM дезоксирибонуклеотидтрифосфатов

15 pM каждого праймера

1 ед. Taq-полимеразы

Реактивы, используемые для постановки ПЦР, произведены ООО «СибЭнзим».

ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» фирмы «ДНК-технология». Температурный режим амплификации следующий: денатурация, 4 минуты при 94°C; 25 циклов по 1 минута при 94°C, 1 минута при 65°C, 1 минута при 72°C каждый; финальная элонгация, 5 минут при 72°C.

Последовательности праймеров:

HLO-30 (Forward) 5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3';

HLO-32 (Reverse) 5'-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC-3'.

Продукты ПЦР визуализировали в агарозном 2% геле в проходящем УФ-свете с помощью предварительно внесенного в гель бромида этидия (рисунок 12).

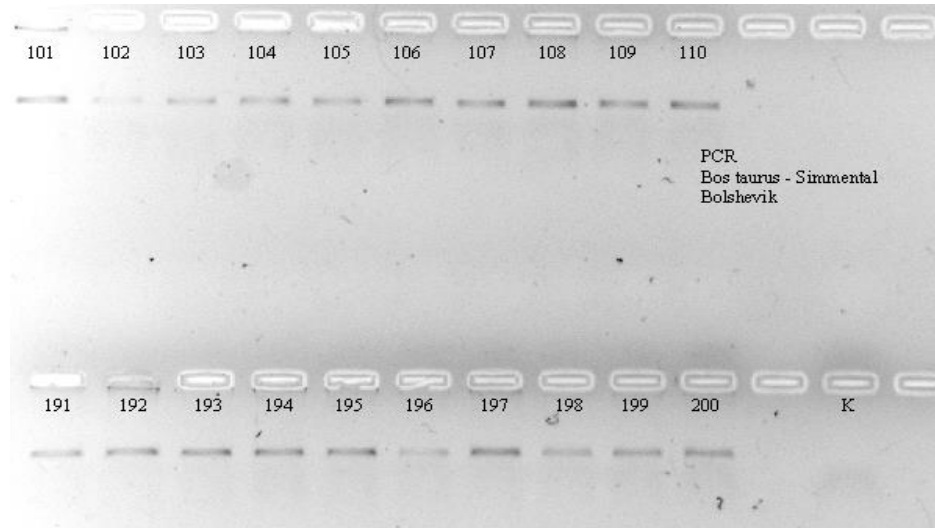


Рисунок 12 – Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента гена BoLA-DRB3 крупного рогатого скота

2.3 Рестрикция продуктов амплификации

Рестриксию проводили путем инкубирования 6 мкл ПЦР-продукта с 5 единицами рестриктазы. Всего для анализа необходимо провести серию рестрикций с тремя ферментами: RsaI (37°C), HaeIII (37°C) и BstYI (60°C).

Рестриктные фрагменты разделяли в вертикальном 9% полиакриламидном геле в TBE-буфере. Визуализировали на приборе GelDoc в проходящем УФ-свете с помощью бромистого этидия, в растворе которого выдерживали гель после проведения фореа.

2.4 Анализ результатов электрофоретического разделения ДНК

Получаемые спектры рестрикции анализировали с помощью программного обеспечения фирмы BioRad на основании таблиц рестрикции аллелей гена VoLA-DRB3 (таблица 6). Спектры рестрикции каждой из трёх эндонуклеаз приведены в таблице 7 [92; 113; 144].

Таблица 6 – Карта рестрикции второго экзона гена VoLA-DRB3

Тип спектра	Рестриктный фрагмент	Тип спектра	Рестриктный фрагмент	Тип спектра	Рестриктный фрагмент
RsaI					
a	78, 33, 30, 39, 54, 50	j	78, 63, 93, 50	s	141, 93, 50
b	111, 30, 39, 54, 50	k	78, 156, 50	t	141, 143
c	111, 30, 93, 50	l	234, 50	u	111, 123, 50
d	111, 30, 143	m	111, 69, 104	v	78, 102, 54, 50
e	141, 39, 51*, 50	n	180, 104	w	78, 33, 69, 54, 50
f	141, 39, 54, 50	o	284	x	78, 33, 69, 104
g	141, 39, 104	p	111, 30, 39, 51*, 50	y	78, 63, 39, 54, 50
h	111, 69, 54, 50	q	141, 90*, 50		
i	180, 54, 50	r	111, 30, 90*, 50		
HaeIII					
a	167, 52, 65	d	190, 29, 65	g	164, 55, 65
b	219, 65	e	167, 117	h	167, 46, 6, 56
c	167, 49*, 65	f	167, 4, 48, 65	i	167, 4, 113
BstYI					
a	199, 85	c	196*, 85	e	87, 112, 85
b	284	d	87, 197		

* присутствие делеции

Таблица 7 – Соответствие получаемых рестриктных спектров аллелям гена BoLA-DRB3

Спектр RsaI, HaeIII, BstYI	Номер аллеля по ПЦР-ПДРФ	Аллель гена BoLA-DRB3	Спектр RsaI, HaeIII, BstYI	Номер аллеля по ПЦР-ПДРФ	Аллель гена BoLA-DRB3.2	Спектр RsaI, HaeIII, BstYI	Номер аллеля по ПЦР-ПДРФ	Аллель гена BoLA-DRB3
aaa	01	DRB3*0501	iab	15	DRB3*2003	ifb	31	DRB3*2801
aaa	01	DRB3*0503	jdb	16	DRB3*1501	maa	32	DRB3*2401
bab	02	DRB3*1301	jdb	16	DRB3*1502	nfb	33	DRB3*2704
bbb	03	DRB3*1001	kbb	17	No sequence	lba	34	DRB3*3001
bbb	03	DRB3*1002	lfb	18	DRB3*1801	lba	34	DRB3*3002
caa	04	No sequence	lfb	18	DRB3*1802	cbb	35	DRB3*2101
ccc	05	DRB3*3301	sbb	19	DRB3*2601	lab	36	DRB05
daa	06	DRB3*2201	lbb	20	DRB3*2301	oab	37	DRB07
daa	06	DRB3*2202	lbb	20	DRB3*2901	bad	38	DRB18
ecc	07	DRB3*0201	lbb	20	DRB3*3601	tab	39	No sequence
faa	08	DRB3*1201	leb	21	DRB3*0801	uab	40	No sequence
fad	09	DRB3*0301	mab	22	DRB3*1101	aab	41	DRB3*0502
fad	09	DRB3*0302	nab	23	DRB3*2701	aab	41	DRB3*1901
fab	10	DRB3*1601	nab	23	DRB3*2702	aab	41	DRB3*3801
fab	10	DRB3*1602	nab	23	DRB3*2703	hfb	42	DRB3*2802
gae	11	DRB3*0901	nab	23	DRB3*2705	kfb	43	DRB3*2501 2
gae	11	DRB3*0902	nab	23	DRB3*2706	kib	44	DRB3*2501 1
gae	11	DRB3*1202	nab	23	DRB3*2707	sbd	45	DRB3*3401
haa	12	DRB3*1701	nbb	24	DRB3*0101	sbd	45	DRB3*3402
haa	12	DRB3*1702	nbb	24	DRB3*0102	vab	46	DRB3*3501
haa	12	DRB3*3201	oaa	25	No sequence	waa	47	DRB3*1703
haa	12	DRB3*3202	oda	26	DRB3*0601	wab	48	DRB3*3901
haa	12	DRB3*3203	ofb	27	DRB3*14011	web	49	DRB3*3701
hab	13	DRB3*0401	ofb	27	DRB3*14012	xab	50	DRB3*4001
hbb	14	No sequence	ofb	27	DRB3*3101	gaa	51	DRB3*4201
iab	15	DRB3*20011	obb	28	DRB3*0701	sad	52	DRB3*0303
iab	15	DRB3*20012	pcc	29	DRB3*4101	yab	53	DRB3*1902
iab	15	DRB3*2002	qcc	30	Genotyping error	jbd	54	DRB3*4301

2.5 Математическая обработка результатов

На основании полученных данных проводился аллельный анализ, при этом использовалось программное обеспечение Microsoft Office Excel 2010. Аллельный анализ включал также расчет критерия согласия Пирсона для каждого аллеля путем сравнения величины его частоты с той, которая получалась бы в случае абсолютно равномерного распределения аллелей для данной выборки. При уровне значимости 95% и степени свободы равной единице критическим считалось значение $\chi^2=3,84$.

Непараметрический критерий применялся при отличии характера распределения исследуемых величин от нормального. В пакете SPSS 15.0 проводилось сравнение выборки с нормальным распределением с помощью тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Получаемые значения уровня значимости α близкие к нулю означают значительное отличие исследуемой выборки от нормальной.

Для оценки генетической дифференциации исследуемых групп животных использовалась F-статистика Райта [150; 151]. Критерий F_{IS} количественно отражает отклонение от панмиксии и определяется соотношением гомозиготных и гетерозиготных генотипов. Он является своеобразной количественной мерой инбридинга особей относительно популяции, к которой они принадлежат. Расчет этого индекса осуществлялся в программе Генерор. В программе Генерор рассчитывались ожидаемые и наблюдаемые количества гомозигот и гетерозигот, а также вероятность ошибки при отклонении нулевой гипотезы (сходство исследуемой популяции с равновесной популяцией, подчиняющейся закону Харди-Вайнберга) – Def с оценкой погрешности (SE).

Дендрограмма, показывающая степень генетической дифференциации популяций, построена в соответствии со стандартными генетическими дистанциями [120].

Генетическая дистанция (расстояние) – условная единица – вычисляется по формуле:

$$D = -\ln I, \quad (11)$$

где D – генетическое расстояние (дистанция), I – генетическое сходство, то есть вероятность идентичности (совпадения) аллельных генов в двух популяциях для i -локуса.

$$I = \sum x_i y_i / \sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}, \quad (12)$$

где x_i и y_i – частоты i -го аллеля в сравниваемых популяциях X и Y .

Этот индекс был выбран, так как наиболее широко используется и позволяет производить сравнение с данными других исследователей.

Построение дендрограммы осуществлялось с помощью пакетов программ BioNJ и TreeDyn [79; 83; 85; 86; 91].

Для оценки генетического полиморфизма и биоразнообразия популяции, стад пород крупного рогатого скота были рассчитаны индексы: Шеннона (H), Бриллюэна (H'), Вильямса (λ), Бергера-Паркера ($1/d$), Тейла (R_T), индекс, предложенный В.А. Гоптиковым с соавторами (K_D), Макинтоша (U , D_M , E_M) и Пиелу (E).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Характеристика полиморфизма гена *BoLA-DRB3* молочного скота Брянской области

Полиморфность гена *BoLA-DRB3*, возникшая эволюционно из-за необходимости вариабельного строения клеточного рецептора по отношению к чужеродным белковым антигенам, имеет не только географическую, но и внутривидовую изменчивость. Это послужило основанием для рассмотрения особенностей его полиморфизма как внутри каждой породы, так и отдельных стад.

3.1.1 Генетический полиморфизм коров черно-пестрой породы по гену *BoLA-DRB3*

3.1.1.1 Аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* коров черно-пестрой породы СПК «Агрофирма «Культура»

В выборке коров черно-пестрой породы (n=52), разводимых в СПК «Агрофирма «Культура», на основе паттернов рестрикции, определенных с помощью *RsaI* и *HaeIII*, выявлены аллельные варианты гена *BoLA-DRB3* (рисунок 13а, 13б).

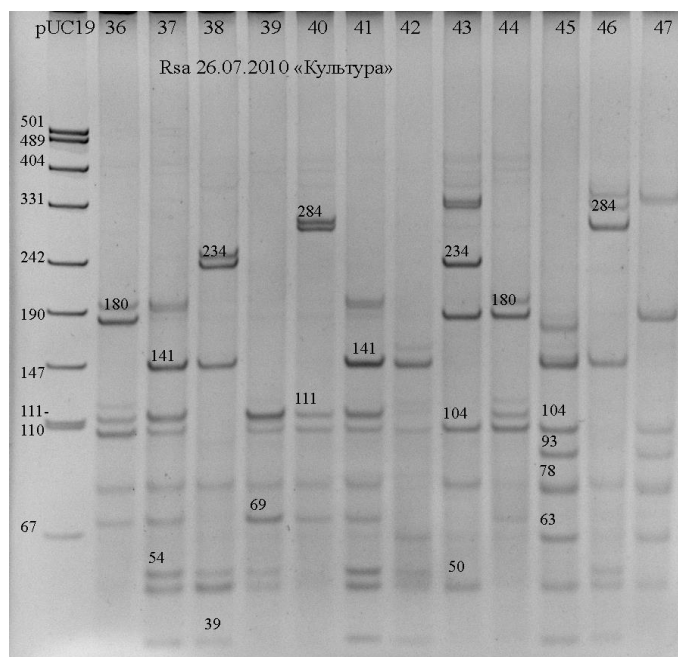


Рисунок 13а – Электрофореграмма продуктов рестрикции *RsaI* гена *BoLA-DRB3* черно-пестрой породы

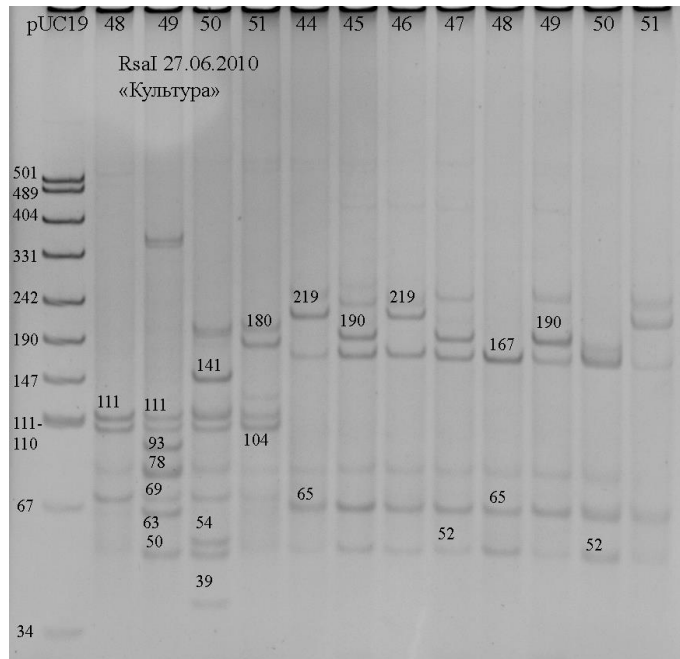


Рисунок 13б – Электрофореграмма продуктов рестрикции RsaI (48-51) и HaeIII (44-51) гена BoLA-DRB3 черно-пестрой породы

Продукты рестрикции хорошо разделялись в ПААГ, по положению полосы рестриктного фрагмента ДНК рассчитывался его размер и определялись аллели гена BoLA-DRB3.

Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 в исследуемой выборке коров представлен 16-ю аллелями с различной частотой встречаемости (таблица 8). Частота встречаемости шести аллелей (*12, *13, *14, *20, *27, *50) была наименьшей и варьировала от 1,1 до 2,1%, аллели *3, *7, *16, *23, *28 встречались с частотой, в основном, менее 5,5%, аллели *8, *11, *18, *22 обнаруживались с частотой от 8,5 до 16,0%. Самая высокая частота встречаемости была характерна для аллеля *24, составившая 23,4%.

Наблюдаемое неравномерное распределение аллелей является достоверным ($\chi^2=102,9$ при $\alpha>99,9999\%$). Представилось целесообразным совокупность выявленных аллелей, с учетом частоты встречаемости, разделять на три группы: мажорные, минорные и обычные.

К обычным аллелям отнесли те из них, величина частоты встречаемости которых была близка к значению равномерного

распределения (нулевая гипотеза). В качестве критерия принята величина Хи-квадрат.

Таблица 8 – Результаты анализа генетического профиля стада коров СПК «Агрофирма «Культура»,

Аллель BoLA-DRB3	Статус аллеля	Количество	Частота, %	χ^2
*3	Н	4	4,3	0,9
*7	Н	3	3,2	1,8
*8	Ч	9	9,6	1,3
*11	У	15	16,0	12,9
*12	Н	2	2,1	3,1
*13	Н	1	1,1	4,7
*14	Н	1	1,1	4,7
*16	Ч	5	5,3	0,3
*18	Н	8	8,5	0,5
*20	Н	1	1,1	4,7
*22	Ч	16	16,0	12,9
*23	У	3	3,2	1,8
*24	Ч	21	23,4	42,0
*27	Н	1	1,1	4,7
*28	У	3	3,2	1,8
*50	Н	1	1,1	4,7
Всего: 16		94		$\Sigma=102,9$

Те аллели, для которых значения критерия согласия Пирсона больше критического для степени свободы равной единице ($\chi^2=3,84$ при уровне значимости 95%), считались характеризующими выборку, и в зависимости от абсолютной величины, определялись как мажорные или минорные.

Выбор непараметрического критерия обусловлен отличием распределения получаемых величин от нормального. Такое отличие доказывается путем сравнения исследуемой выборки с нормальным распределением с помощью тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка.

Низкие значения уровня значимости свидетельствуют о статистически достоверном отклонении исследуемой выборки от нормального распределения и обуславливают применение непараметрических критериев.

Поскольку наиболее значимыми показателями, характеризующими генетическую структуру стада являются такие константы как гомо-и гетерозиготность, то при сравнительном анализе этих характеристик оказалось, что в данном стаде наблюдается незначительный избыток гомозигот. Значения индексов F_{IS} , показывающего степень отклонения от панмиксии, или инбридинг особи относительно стада, к которому она принадлежит, составляют 0,0819 и 0,0281. При этом вероятность ошибиться при отклонении нулевой гипотезы (которая заключается в соответствии данной популяции равновесной и подчиняющейся закону Харди-Вайнберга) составляет 0,1508. Уровень гетерозиготности равен 0,87 (таблица 9).

Таблица 9 – Показатели генетической структуры стада коров СПК «Агрофирма «Культура»,

Параметр		Значение
Количество животных выборки		47
Количество гомозигот	наблюдаемое	9
	ожидаемое	5,6
Количество гетерозигот	наблюдаемое	38
	ожидаемое	41,4
A*		15
h**		0,87
F_{IS}	W&C	0,0819
	R&H	0,0281
Def (SE)		0,1508 (0,0002)

*A - число аллелей на локус; **h - средняя гетерозиготность

Одной из задач, стоящих перед нами, являлось определение генетической устойчивости популяции черно-пестрого скота к лейкозу, то

есть выявить наличие аллелей гена BoLA-DRB3, ответственных за формирование иммунных реакций к вирусу лейкоза.

Распределение аллелей гена BoLA-DRB3 в выборке коров чернопестрой породы данного хозяйства представлено в таблице 10.

Таблица 10 – Генотипическая структура стада коров СПК «Агрофирма «Культура»

Инд. №	Спектр рестрикции RsaI, HaeIII, BstYI	Генотип	Устойчивость к ВЛКРС	Инд. №	Спектр рестрикции RsaI, HaeIII, BstYI	Генотип	Устойчивость к ВЛКРС
79	faa/faa	8/8	Ч/Ч	101	mab/lfb	22/18	Ч/Н
3598	mba/faa gaa/hab	22/8 51/13	Ч/Ч Н/Н	3604	jdb/nbb	16/24	Ч/Ч
3668	lfb/ecc	18/7	Н/Н	31	lfb/gae	18/11	Н/У
3557	gae/ecc	11/7	У/н	33	mab/nbb	22/24	Ч/Ч
14	obb/nbb	28/24	У/Ч	24	mab/nbb	22/24	Ч/Ч
44	haa/nbb	12/24	Н/Ч	3628	nbb/nbb	24/24	Ч/Ч
3605	bbb/mab	3/22	Н/Ч	16	gae/gae	11/11	У/У
47	gae/mab	11/22	У/Ч	37	obb/nbb	28/24	Ч/У
3590	obb/nbb	28/24	У/Ч	121	xba/hbb	50/14	Н/Н
46	lfb/gae	18/11	Н/У	3626	mab/nbb	22/24	Ч/Ч
18	gae/gae	11/11	У/У	3599	fab/haa faa/hab	10/12 8/13	Н/Н Ч/Н
3623	faa/faa	8/8	Ч/Ч	2	lfb/faa	18/8	Н/Ч
20	jdb/mab	16/22	Ч/Ч	57	mab/haa ? неопред	22/12 ?	Ч/Н ?
27	gae/nbb	11/24	У/Ч	38	mab/ofb	22/27	Ч/Н
100	ecc/mab	7/22	Н/Ч	26	mab/faa ?	22/8	Ч/Ч
3616	faa/lfb	8/18	Ч/Н	B176	faa/gae	8/11	Ч/У
3627	nbb/nbb	24/24	Ч/Ч	9	lbb/nba	20/23	Н/У
7	gae/bbb	11/3	У/Н	3609	nbb/nbb	24/24	Ч/Ч
3617	nbb/haa	24/12	Ч/Н	11	gae/jdb	11/16	У/Ч
3614	gae/hba	11/13	У/Н	6	faa/obb fab/oba	8/28 10/26	Ч/У Н/Н
30	faa/nbb	8/24	Ч/Ч	42	jdb/nab	16/23	Ч/У
3603	gae/gae	11/11	У/У	3612	mab/mab	22/22	Ч/Ч
3612	nbb/lfb	24/18	Ч/Н	4	mab/jdb	22/16	Ч/Ч
3610	nab/mab	23/22	У/Ч	1515	faa/mab	8/22	Ч/Ч
3625	mab/lfb	22/18	Ч/Н	248 бык	nbb/nbb	24/24	Ч/Ч
3621	nbb/bbb	24/3	Ч/Н	152 бык	nbb/bbb	24/3	Ч/Н

Сравнительный анализ генотипической структуры исследуемой выборки коров осуществлялся с учетом генотипов: гомозиготных чувствительных (Ч/Ч), устойчивых (У/У), нейтральных (Н/Н) и гетерозиготных (Ч/Н, У/Ч, У/Н) генотипов.

Сопоставление и анализ полученных результатов свидетельствует о преобладании в исследуемой популяции животных с гомозиготным (Ч/Ч) генотипом, составивших 32,7% (17 голов).

Несколько реже, с одинаковой частотой, встречались гетерозиготные генотипы Ч/Н и У/Ч – 21,2% (по 11 голов). Еще реже, с частотой 9,6% (по 10 голов), представлены гомозиготные (Н/Н) и гетерозиготные (У/Н) генотипы.

Анализ генотипического разнообразия изучаемой популяции чернопестрого скота свидетельствует о незначительной вариабельности распределения аллелей устойчивости (У) и высокой – аллелей чувствительности (Ч) к развитию гемобластоза.

Оказалось, что количество животных, несущих гомозиготные аллели устойчивости, в исследованной популяции составило лишь 6,4% (3 головы). Несколько больше животных, несущих аллели устойчивости в гетерозиготном состоянии – 19,1% для УЧ, 12,8% – для УН.

Доля животных с генотипами, несущими аллель чувствительности достаточно высока. Так, гомозиготных по чувствительности к вирусу животных – 31,9%, гетерозиготных с нейтральными (Н) аллелям – 25,5%. Количество животных, у которых оба аллеля являются нейтральными, низко – 4,3 % (2 головы).

При суммарном рассмотрении генотипов, несущих аллели устойчивости к вирусу лейкоза (У), оказалось в исследуемой популяции около 40% (рисунок 14, 15).

Полученные данные, их анализ свидетельствует о том, что достаточно высокая доля генотипов, несущих аллель чувствительности обуславливает подверженность стада к заболеванию лейкозом. Но в то же время, наличие

особей, несущих аллели устойчивости, особенно в гомозиготном состоянии, дает потенциал для создания генетически устойчивой популяции черно-пестрого скота в этом хозяйстве.

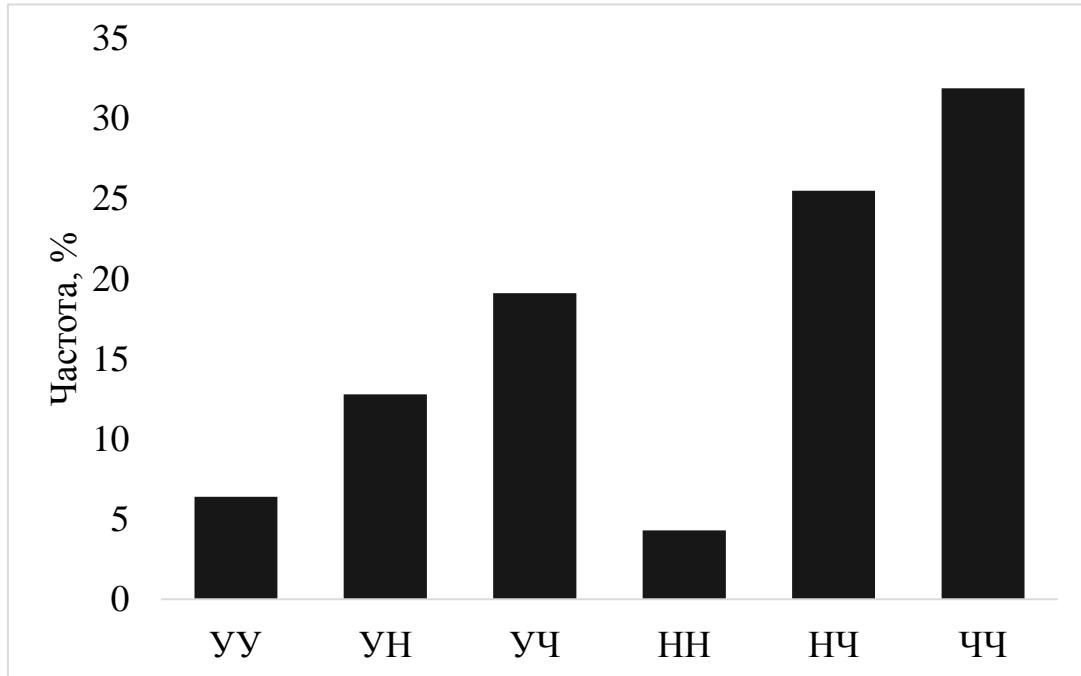
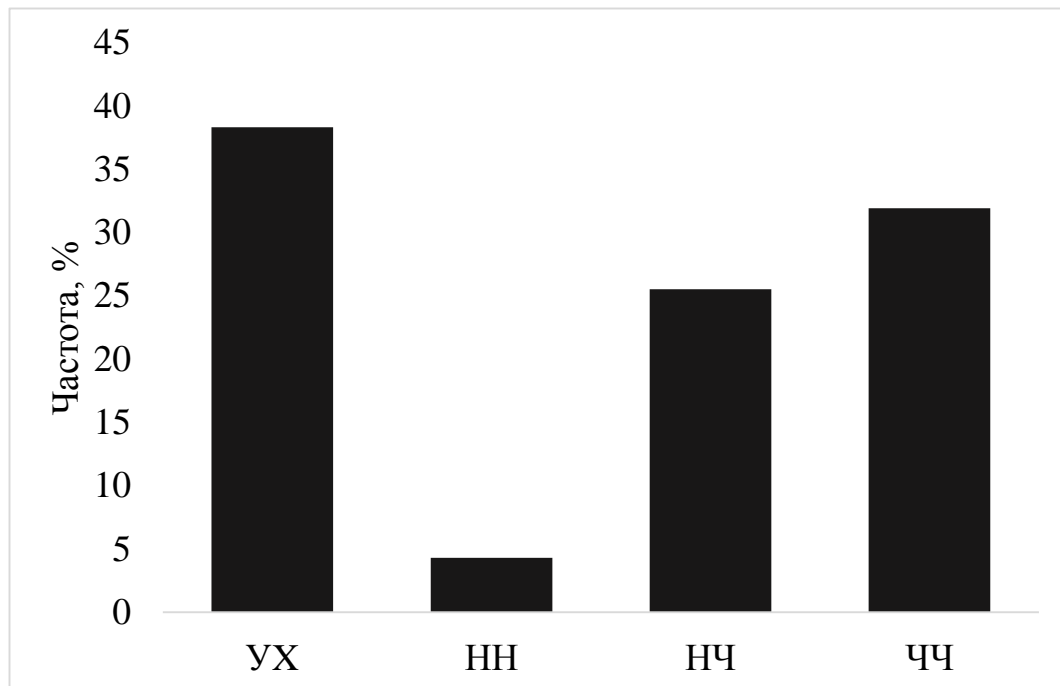


Рисунок 14 – Распределение и частоты генотипов устойчивости к лейкозу



(где, УХ – устойчивые генотипы с учетом доминантности, включают УУ, УН и УЧ)

Рисунок 15 – Устойчивость к вирусу лейкоза выборки коров

В целом, стадо коров черно-пестрой породы из СПК «Агрофирма «Культура» можно охарактеризовать как популяцию близкую к равновесной и подчиняющейся закону Харди-Вайнберга с низким уровнем инбридинга, в которой отмечается незначительный избыток гомозигот, восприимчивой к развитию гемобластоза за счет большой доли гомозигот аллелей чувствительности, с преобладанием генотипов ЧЧ и с относительно небольшим уровнем разнообразия аллелей гена BoLA-DRB3.

3.1.1.2 Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы ОАО «Новый путь»

Сравнительно значительная выборка коров черно-пестрой породы (n=185) ОАО «Новый путь» позволила достаточно объективно оценить полиморфизм гена BoLA-DRB3 и выявить его особенности, характерные для этой популяции коров (таблица 11).

Таблица 11 – Результаты анализа генетического профиля стада коров ОАО «Новый путь»

Аллель BoLA-DRB3	Статус аллеля	Количество	Частота, %	χ^2
*1	Н	2	0,6	3,3
*3	Н	15	4,1	0,0
*4	Н	2	0,6	3,3
*7	Н	23	6,4	0,9
*8	Ч	37	10,2	7,9
*9	Н	1	0,3	3,8
*10	Н	20	5,5	0,3
*11	У	35	9,7	6,5
*12	Н	2	0,6	3,3
*13	Н	1	0,3	3,8

*14	Н	4	1,1	2,4
*15	Н	9	2,5	0,8
*16	Ч	36	9,9	7,2
*17	Н	18	5,0	0,1
*19	Н	2	0,6	3,3
*20	Н	6	1,7	1,7
*21	Н	3	0,8	2,8
*22	Ч	37	10,2	7,9
*23	У	32	8,8	4,6
*24	Ч	50	13,8	20,6
*25	Н	11	3,0	0,4
*26	Н	6	1,7	1,7
*28	У	10	2,8	0,6
Всего: 23				$\Sigma=87,4$

Выявлено 23 аллеля, среди них наиболее часто представленными оказались *8, *11, *16, *22, *23 и *24 со значениями частот: 10,2; 9,7; 9,9; 10,2; 8,8; 13,8%, соответственно, реже – аллели *3, *7, *10, *17, с частотой встречаемости 4,1; 6,4; 5,5; 5,0%, соответственно, и очень редко – аллели *1, *4, *9, *12, *13, *14, *15, *19, *20, *21, *25, *26, *28, с вариабельностью частоты встречаемости от 0,6 до 3,0%.

Характерной особенностью аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* исследуемой популяции черно-пестрого скота в этом хозяйстве явилось преобладание аллелей, принадлежащих группе нейтральных, с суммарной частотой встречаемости 34,8%. Лидирующее положение по частоте встречаемости принадлежит аллелям, относящихся к категории чувствительных к вирусу лейкоза (*8, *16, *22, *24).

Наблюдается превышение количества гомозигот над ожидаемым, при этом индекс Райта, отражающий уровень инбридинга составляет 0,22.

Вероятность обнаружить гетерозиготу при случайном отборе проб

составляет 92%. Обнаруживается значительное отклонение от закона Харди-Вайнберга, вероятность ошибиться при принятии этой гипотезы составляет 0% (таблица 12).

Таблица 12 – Показатели генетической структуры стада коров
ОАО «Новый путь»

Параметр		Значение
Количество особей выборки		181
Количество гомозигот	наблюдаемое	50
	ожидаемое	14,1
Количество гетерозигот	наблюдаемое	130
	ожидаемое	165,9
A		23
h		0,92
F _{is}	W&C	0,2167
	R&H	0,2205
Def (SE)		0,0000

Выявленная ситуация нашла отражение в генотипической структуре изучаемой выборки коров (таблица 13). Генотипическая структура изучаемой популяции черно-пестрого скота представлена гомозиготными (ЧЧ, УУ, НН) и гетерозиготными (ЧН, ЧУ, НЧ) генотипами с разной частотой встречаемости.

В целом, генотипы представлены девятью аллелями (*3, *8, *10, *11, *16, *18, *22, *23, *24).

Все мажорные аллели стада являются значимыми в отношении развития гемобластоза. Суммарная частота аллелей устойчивости составляет 21,3%, тогда как аллели чувствительности – 44,2%. На долю нейтральных аллелей приходится 34,5% (рисунок 16).

На диаграмме четко отображено преобладание генотипов с аллелями чувствительности. Их суммарная частота – 51,4%. Генотипы, несущие аллели

устойчивости, представлены в меньшем количестве: УУ – 8,3%, УЧ – 12,7%, УН – 13,3%, с суммарной концентрацией – 34,3%, нейтральных генотипов – 14,4%. Общее количество генотипов, несущих аллели устойчивости почти вдвое меньше, чем генотипов с аллелями чувствительности (рисунок 17).

Таблица 13 – Генотипическая структура стада коров ОАО «Новый путь»

Генотип по локусу BoLA-DRB3		Количество особей	Частота, %
8/8	ЧЧ	4	2,2
8/10	ЧН	5	2,8
8/11	ЧУ	4	2,2
11/11	УУ	4	2,2
3/16	НЧ	4	2,2
8/16	ЧЧ	5	2,8
11/16	УЧ	5	2,8
16/16	ЧЧ	5	2,8
18/18	НН	4	2,2
22/22	ЧЧ	7	3,9
8/23	ЧУ	7	3,9
11/23	УУ	4	2,2
3/24	НЧ	5	2,8
16/24	ЧЧ	4	2,2
22/24	ЧЧ	7	3,9
24/24	ЧЧ	8	4,4

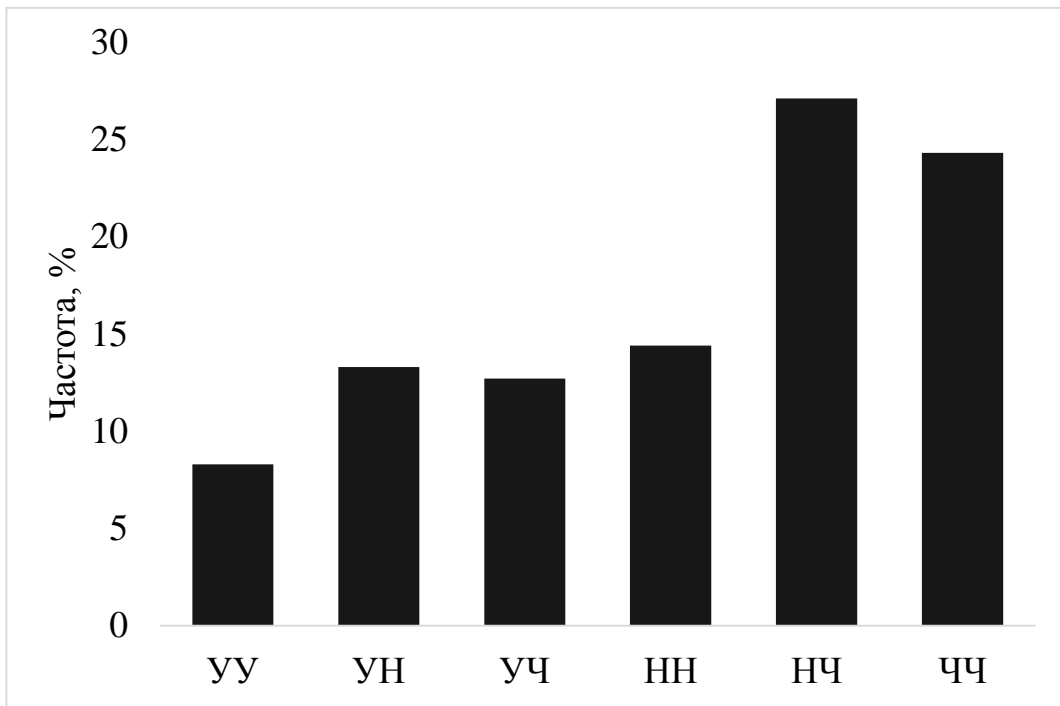


Рисунок 16 – Распределение и частоты генотипов устойчивости к лейкозу

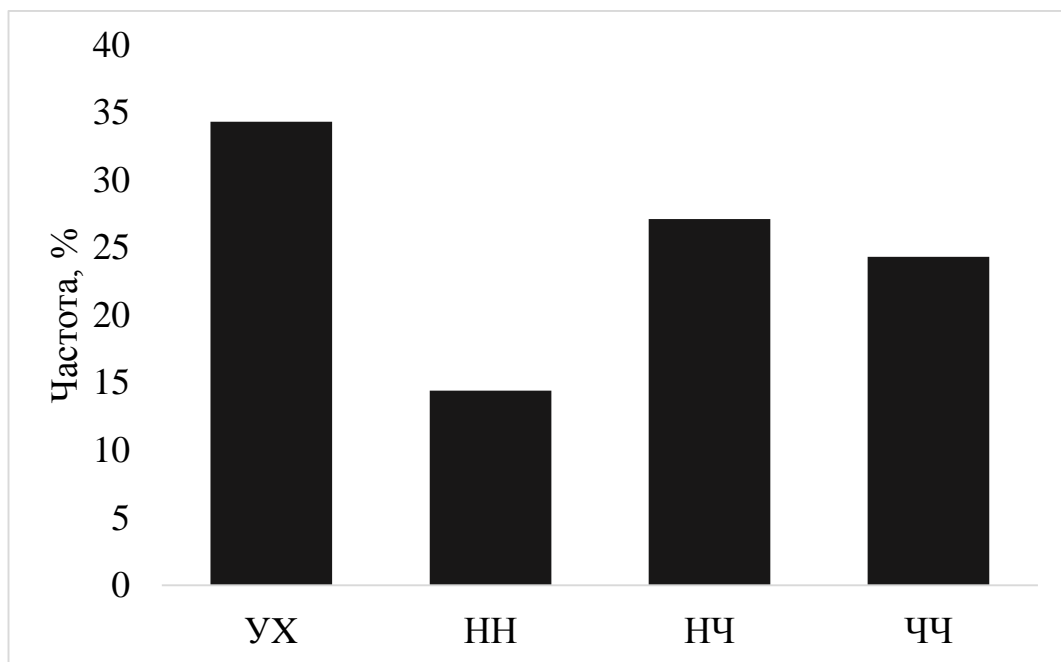


Рисунок 17 – Устойчивость к вирусу лейкоза выборки коров

Таким образом, стадо ОАО «Новый путь» представляет собой популяцию, отличающуюся от равновесной, с уровнем превышения гомозигот в 22%, восприимчивую к вирусу лейкоза из-за более, чем в два раза, преобладания суммарного количества аллелей восприимчивых к заболеванию гемобластозом, а также отличающуюся высоким разнообразием аллелей гена BoLA-DRB3.

3.1.1.3 Аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* коров чернопестрой породы ООО «Снежка-Госома»

Генетический профиль выборки коров (n=63) этого хозяйства достаточно разнообразен и представлен 25 аллелями.

В рассматриваемом стаде наиболее многочисленными оказались аллели: *23, *11, *24, *8, с частотой встречаемости 16,4; 13,9; 13,1; 9,0% соответственно (таблица 14).

Отличительной особенностью для данного стада является то, что минорные аллели образуют довольно большую группу: *1, *2, *3, *4, *5, *6, *12, *14, *18, *19, *25, *26, представленные в единичном экземпляре, с суммарной концентрацией 9,6%.

Таблица 14 – Результаты анализа генетического профиля стада коров ООО «Снежка-Госома»

Аллель <i>BoLA-DRB3</i>	Статус аллеля	Количество	Частота, %	χ^2
*1	Н	1	0,8	2,5
*2	Н	1	0,8	2,5
*3	Н	1	0,8	2,5
*4	Н	1	0,8	2,5
*6	Н	1	0,8	2,5
*7	Н	3	2,5	0,6
*8	Ч	11	9,0	6,3
*10	Н	7	5,7	0,8
*11	У	17	13,9	24,7
*12	Н	1	0,8	2,5
*13	Н	2	1,6	1,4
*14	Н	1	0,8	2,5
*15	Н	8	6,6	1,6

*16	Ч	2	1,6	1,4
*18	Н	1	0,8	2,5
*19	Н	1	0,8	2,5
*20	Н	7	5,7	0,8
*22	Ч	7	5,7	0,8
*23	У	20	16,4	38,4
*24	Ч	16	13,1	20,8
*25	Н	1	0,8	2,5
*26	Н	1	0,8	2,5
*28	У	5	4,1	0,0
*30	Н	2	1,6	1,4
*36	Н	4	3,3	0,1
Всего: 25				$\Sigma=126,7$

В группе мажорных аллелей, ассоциированных с развитием гемобластоза, аллели восприимчивости и устойчивости представлены поровну, минорные аллели представлены нейтральными.

Исследуемая выборка коров характеризуется отклонением от закона Харди-Вайнберга за счет преобладания гомозигот. Индексы F_{IS} составили 0,0707 и 0,0935, что означает низкий уровень инбридинга. Вероятность ошибиться при отклонении гипотезы о равновесности данной популяции составляет 0,02%. Вероятность присутствия гетерозигот составляет 91% (таблица 15).

Отмечено преобладание гетерозиготных генотипов, включающих мажорные аллели с присутствием нейтрального аллеля *20 (таблица 16).

При оценке генетической устойчивости стада к вирусу лейкоза установлено преобладание генотипа УН, при сравнительно одинаковом распределении остальных генотипов (рисунки 18 и 19).

Таблица 15 – Показатели генетической структуры стада коров
ООО «Снежка-Госома»

Параметр		Значение
Количество особей выборки		61
Количество ГОМОЗИГОТ	наблюдаемое	9
	ожидаемое	5,1
Количество гетерозигот	наблюдаемое	52
	ожидаемое	55,9
A		25
h		0,91
F _{is}	W&C	0,0707
	R&H	0,0935
Def (SE)		0,0002 (0,0000)

Таблица 16 – Генотипическая структура стада коров «Снежка-Госома»

Генотип по локусу BoLA-DRB3		Количество животных	Частота, %
11/22	УЧ	3	4,9
11/23	УУ	4	6,6
20/23	НУ	4	6,6
8/24	ЧЧ	4	6,6

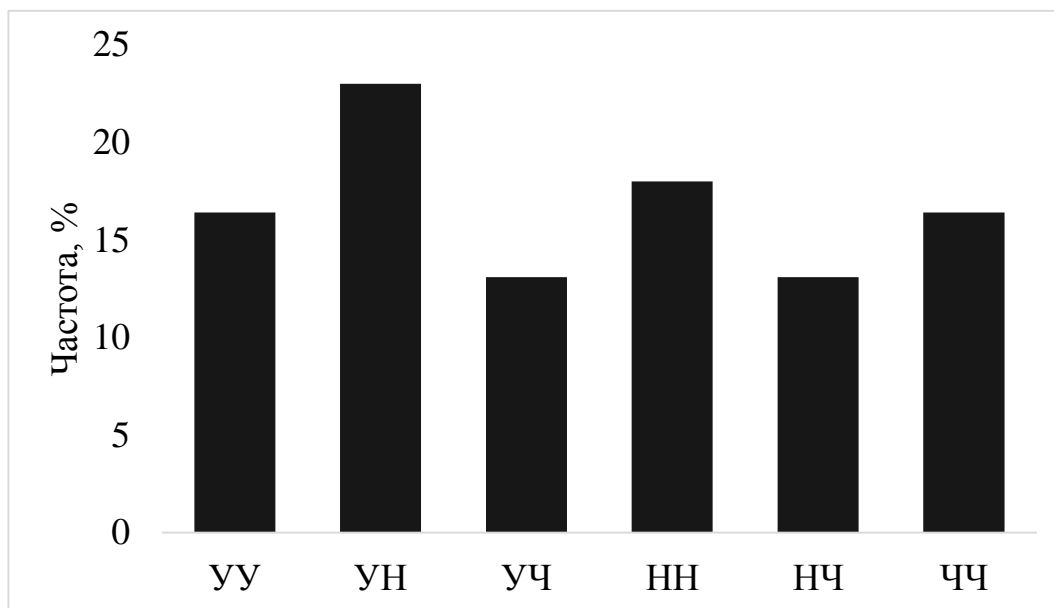


Рисунок 18 – Распределение и частоты генотипов устойчивости к лейкозу

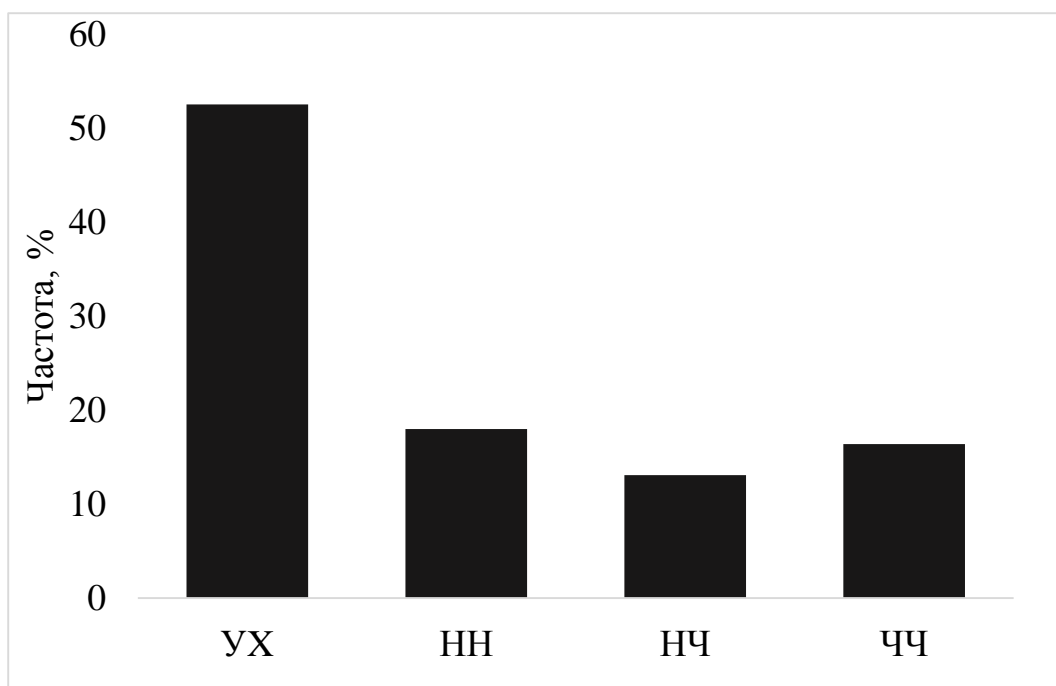


Рисунок 19 – Устойчивость к вирусу лейкоза выборки коров

Обращает на себя внимание присутствие значительного количества генотипов с нейтральными аллелями, а также устойчивых к лейкозу. В целом, стадо, содержащееся в условиях ООО «Снежжа-Госома» можно охарактеризовать как популяцию черно-пестрой породы, незначительно

отличающуюся от равновесной, с уровнем инбридинга 9%, сравнительно устойчивую к вирусу лейкоза за счет сравнительно большой доли генотипов устойчивости, с преобладанием генотипа УН, с большим пулом нейтральных к лейкозу аллелей и высоким уровнем разнообразия гена BoLA-DRB3.

3.1.1.4 Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы г. Жирятино

Выборка животных черно-пестрой породы, разводимой в г. Жирятино отличается от других проанализированных групп тем, что представляет собой совокупность коров из разных дворов, выпас которых осуществляется совместно. Особенностью генетического профиля изучаемой популяции, представленной 25 аллелями, является присутствие мажорных аллелей *7, *23, *10, *11 с частотой встречаемости 13,6; 9,3; 8,0; 8,0% соответственно (таблица 17).

Таблица 17 – Результаты анализа генетического профиля стада коров г. Жирятино

Аллель BoLA-DRB3	Статус аллеля	Количество	Частота, %	χ^2
*2	Н	1	0,6	2,9
*3	Н	1	0,6	2,9
*4	Н	5	3,1	0,2
*7	Н	22	13,6	22,9
*8	Ч	12	7,4	2,9
*10	Н	13	8,0	4,0
*11	У	13	8,0	4,0
*12	Н	1	0,6	2,9
*13	Н	3	1,9	1,2
*14	Н	2	1,2	1,9
*15	Н	8	4,9	0,2

*16	Ч	9	5,6	0,6
*17	Н	1	0,6	2,9
*18	Н	5	3,1	0,2
*19	Н	1	0,6	2,9
*20	Н	8	4,9	0,2
*21	Н	3	1,9	1,2
*22	Ч	5	3,1	0,2
*23	У	15	9,3	6,9
*24	Ч	6	3,7	0,0
*25	Н	5	3,1	0,2
*26	Н	8	4,9	0,2
*28	У	8	4,9	0,2
*30	Н	2	1,2	1,9
*36	Н	5	3,1	0,2
Всего: 25				$\Sigma=63,8$

Их доля в аллельном спектре – менее половины. Суммарная доля минорных аллелей (*2, *3, *12, *17, *19) составляет 3%. Оставшаяся доля аллелей распределена сравнительно одинаково.

Для данного стада характерна большая величина индексов фиксации: 0,4895 и 0,4288, что свидетельствует о высоком уровне инбридинга. Количество гомозигот значительно преобладает над ожидаемым (таблица 18).

В исследуемом стаде отмечено преобладание нейтральных аллелей (58%), аллели чувствительности и устойчивости распределились примерно поровну: 19,8; 22,2% соответственно, (рисунки 20 и 21). Выявленное аллельное разнообразие гена BoLA-DRB3 нашло отражение в преобладании нейтральных аллелей и сравнительно одинаковом присутствии аллелей устойчивости и восприимчивости к ВЛ КРС

Таблица 18 – Показатели генетической структуры стада коров г. Жирятино

Параметр		Значение
Количество		81
Количество гомозигот	наблюдаемое	42
	ожидаемое	4,8
Количество гетерозигот	наблюдаемое	39
	ожидаемое	76,2
A		25
h		0,93
F _{is}	W&C	0,4895
	R&H	0,4288
Def (SE)		0,0000 (0,0000)

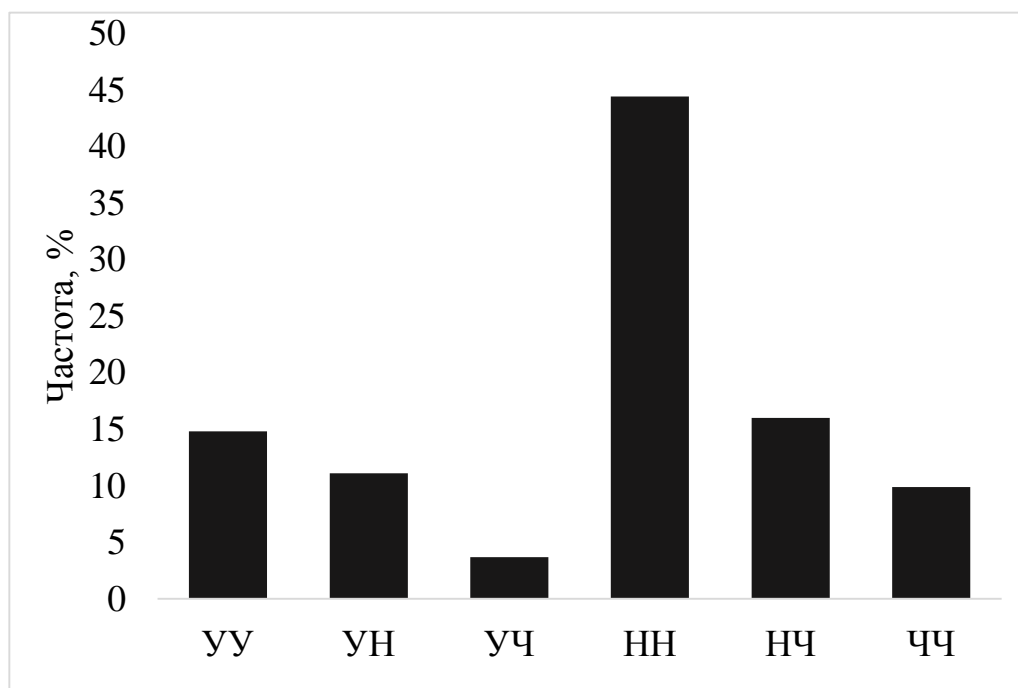


Рисунок 20 – Распределение и частоты генотипов устойчивости к лейкозу

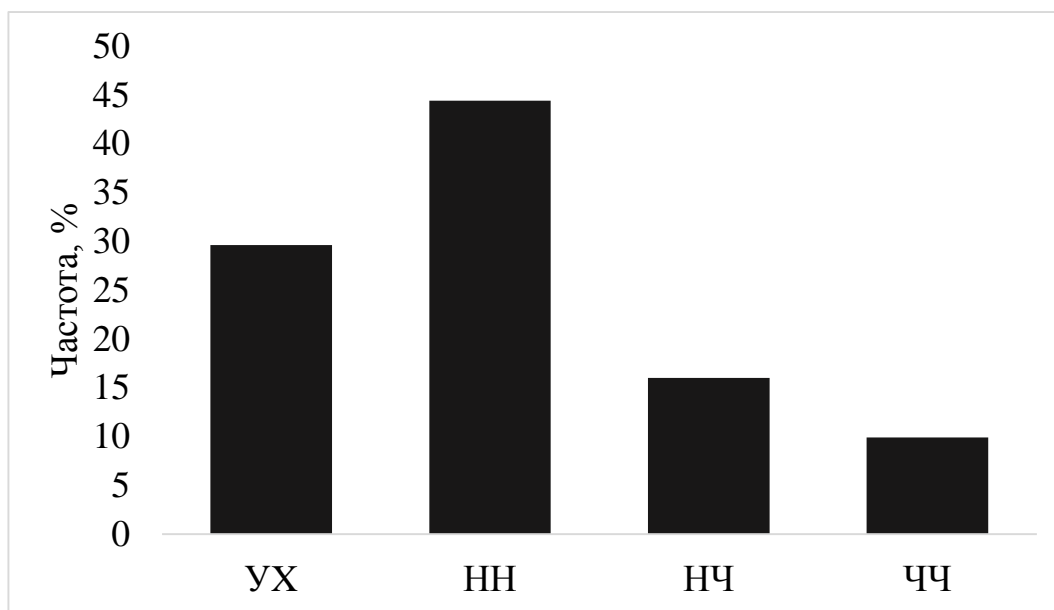


Рисунок 21 – Устойчивость к вирусу лейкоза выборки коров

Таким образом, исследуемую выборку коров можно охарактеризовать как значительно отклоняющуюся от закона Харди-Вайнберга с уровнем преобладания гомозигот около 40%, не отличающуюся устойчивостью или восприимчивостью к вирусу лейкоза, обладающую большим пулом нейтральных аллелей с преобладанием генотипа НН и высоким уровнем разнообразия гена BoLA-DRB3.

3.1.1.5 Аллельный полиморфизм гена VoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы с признаками гемобластоза

Анализом аллельного профиля гена VoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы больных лейкозом (ООО «Снежка-Новоселки», n=8; ОАО «Агрогородок Гетманобудский», n=18) установлено минимальное присутствие аллелей, ассоциированных с устойчивостью к вирусу лейкоза: по одной аллели (*11) в обоих хозяйствах и одна аллель (*23) – ОАО «Агрогородок Гетманобудский» с суммарной концентрацией 2,8% (таблица 19, рисунки 22 и 23).

Таблица 19 – Результаты анализа генетического профиля стада коров с признаками гемобластоза

Аллель VoLA-DRB3	ООО «Снежка-Новоселки»		ОАО «Агрогородок Гетманобудский»	
	Кол-во, голов	%	Кол-во, голов	%
Аллели устойчивости				
*11	1	6,25	1	2,8
*23	-	-	1	2,8
*28	-	-	-	-
Нейтральные аллели				
*1	-	-	2	5,6
*2	-	-	3	8,3
*4	-	-	-	-
*7	2	12,5	4	11,1
*10	-	-	-	-
*12	1	6,25	-	-
*15	3	18,75		
*18	-	-	1	2,8
*21	2	12,5	1	2,8
*25	-	-		
*27	-	-	2	5,6
*32	-	-	2	5,6
*35	-	-	1	2,8
*36	-	-	-	-
*41	-	-	1	2,8
Аллели чувствительности				
*8	-	-	3	8,3
*16	-	-	7	19,4
*22	1	6,25	5	13,9

*24	6	37,5	2	5,6
-----	---	------	---	-----

Суммарная доля чувствительных аллелей (*22, *24) в выборке коров ООО «Снежка-Новоселки» составила 43,75, ОАО «Агрогородок Гетманобудский» – 47,2%, доля нейтральных аллелей (*7, *12, *15, *21) и (*1, *2, *7, *18, *21, *27, *32, *35, *41) соответственно – 50,0 и 47,4%.

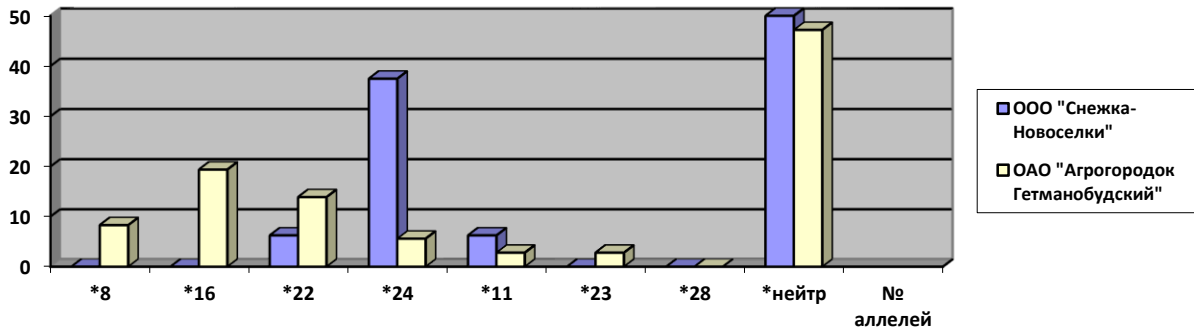


Рисунок 22 – Распределение аллелей гена BoLA-DRB3 у больных коров

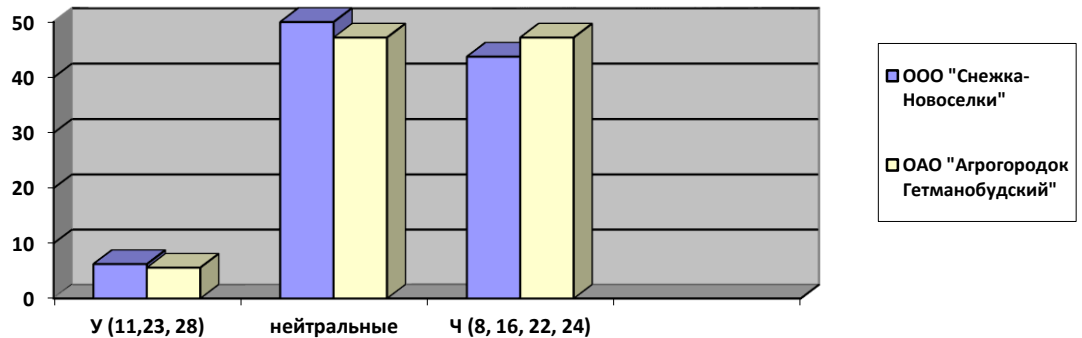


Рисунок 23 – Распределение аллелей устойчивости и чувствительности к лейкозу у больных коров

Выявленная специфичность аллельного профиля нашла отражение в распределении генотипов в изучаемой популяции коров черно-пестрой породы (таблице 20). Из шести рассматриваемых генотипов (гомозиготные УУ, ЧЧ, НН; гетерозиготные УН, УЧ, НЧ) установлено отсутствие гомозиготного УУ генотипа и высокая частота (50,0 и 38,9%) гетерозиготного НЧ генотипа, частота встречаемости гомозиготного ЧЧ генотипа составила 12,5 и 22,2% – в ООО «Снежка-Новоселки» и ОАО «Агрогородок Гетманобудский» соответственно.

Поскольку аллель устойчивости является доминантным, то можно предположить, что выявленные гетерозиготные генотипы УН (12,5%), УЧ (11,1%) являются фенотипически устойчивыми к лейкозу.

Таблица 20 – Частоты генотипов гена BoLA-DRB3 больных коров

Генотипы гена BoLA-DRB3	ООО «Снежка-Новоселки»		ОАО «Агрогородок Гетманобудский»	
	кол-во, ГОЛОВ	%	кол-во, ГОЛОВ	%
УУ	0	0	0	0
УН	1	12,5	0	0
УЧ	0	0	2	11,1
НН	2	25	5	27,8
НЧ	4	50	7	38,9
ЧЧ	1	12,5	4	22,2
Всего:	8		18	

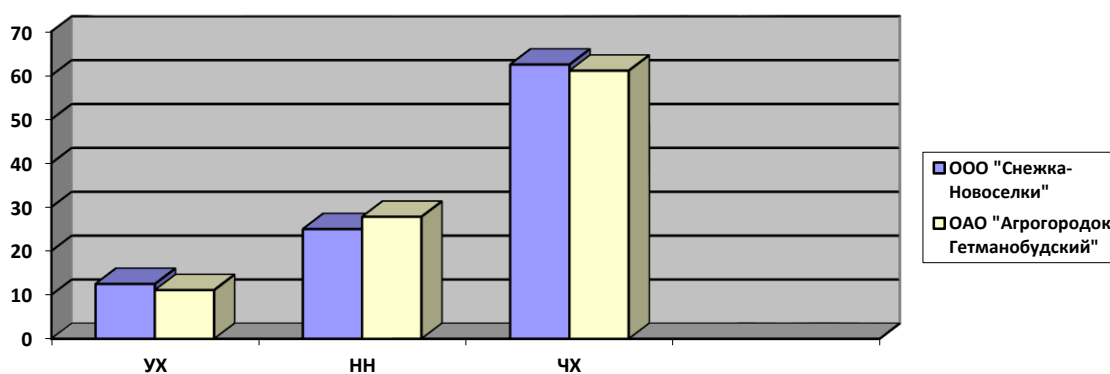


Рисунок 24 – Распределение генотипов гена BoLA-DRB3 больных коров

На рисунке 24 представлены данные, из которых следует, что среди коров ООО «Снежка-Новоселки» и ОАО «Агрогородок «Гетманобудский» выявлено около 12% животных, являющихся генотипически устойчивыми к лейкозу. Генотипы, несущие аллель чувствительности к ВЛКРС, составляют 62,5% и 61,1% исследованной выборки коров, соответственно.

Сравнение частоты встречаемости аллелей устойчивости и чувствительности в выборках здоровых и больных коров черно-пестрой породы в 5 хозяйствах Брянской области свидетельствует о том, что в локус гена BoLA-DRB3 больных коров представлен существенно меньшим (2-2,5 раза) числом аллелей устойчивости, но большим (1,5-2 раза) количеством аллелей восприимчивости к вирусу лейкоза (таблица 21).

Таблица 21 – Частоты аллелей устойчивости и чувствительности гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных гемобластозом коров черно-пестрой породы

Хозяйство	Аллели гена BoLA-DRB3, %	
	УХ	ЧХ
Выборка здоровых животных		
СПК «Агрофирма «Культура»	22,4	54,3
ОАО «Новый путь»	21,3	44,1
Выборка больных животных		
ООО «Снежка-Госома»	34,4	29,4
ООО «Снежка-Новоселки»	12,5	62,5
ОАО «Агрогородок «Гетманобудский»	11,1	61,1

Полученные данные согласуются с литературными данными, полученными Н.В. Ковалюк (2008), В.Ф. Сацук (2009), Н.М. Шарифуллиной (2005) и другими авторами [19; 39; 56].

Для повышения сопротивляемости к лейкозу необходимо:

- использовать в селекционном процессе носителей гомозигот аллелей устойчивости;
- проводить постепенное замещение носителей аллелей чувствительности, снижая их долю в популяции;
- сохранять пул нейтральных аллелей

3.1.2 Генетический полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров симментальской породы СХПК «Большевик»

В хозяйствах Брянской области кроме черно-пестрого скота большой популярностью пользуется и симментальская порода, что послужило основанием для рассмотрения особенностей полиморфизма в локусе гена BoLA-DRB3.

Аллельный спектр гена BoLA-DRB3 выборки коров (n=192) симментальской породы, разводимой в СХПК «Большевик», представлен 27 аллелями (ПДРФ – типов) с разной частотой встречаемости (таблица 22).

Из них 5 мажорных аллелей (*7, *11, *24, *10, *16) встречаются, соответственно, 15,1; 14,1; 14,1; 10,9; 9,4%. Значительная часть аллелей (*1, *3, *12, *25, *33, *38, *39, *46, *53, *54), представлена в единичном числе, с частотой менее 1% и столько же (*2, *5, *9, *13, *15, *20, *22, *28, *32, *36) – менее 5%, относящихся, в основном, к группе нейтральных, кроме аллелей *22, *28, принадлежащих группам чувствительных и устойчивых, соответственно, к вирусу лейкоза.

При анализе распределения частот аллелей BoLA-DRB3, ассоциированных с устойчивостью (У) и чувствительностью (Ч) к вирусу лейкоза в выборке коров симментальской породы, установлено, что в 4-х случаях (14,8%) вариабельность встречаемости аллелей Ч (*8, *16, *22, *24) находилась в пределах 1,6-14,1% при их суммарной концентрации 31,4%.

Что касается аллелей У (*11, *28), то они выявлены в двух случаях (7,4%) с частотой встречаемости 14,1% и 1,0%, соответственно, с суммой концентрации 15,1%.

При оценке генетической структуры стада обращает на себя внимание достаточно высокие значения индексов инбридинга: 0,2449 и 0,1462. Существует вероятность того, что данная популяция подчиняется закону Харди-Вайнберга, менее 0,01% (таблица 23).

Таблица 22 – Результаты анализа генетического профиля стада коров симментальской породы СХПК «Большевик»

Аллель BoLA-DRB3	Статус аллеля	Количество	Частота, %	χ^2
*1	Н	1	0,5	2,7
*2	Н	3	1,6	1,2
*3	Н	1	0,5	2,7
*5	Н	4	2,1	0,7
*7	Н	29	15,1	35,1
*8	Ч	12	6,3	1,8
*9	Н	9	4,7	0,3
*10	Н	21	10,9	14,1
*11	У	27	14,1	29,0
*12	Н	1	0,5	2,7
*13	Н	2	1,0	1,9
*15	Н	5	2,6	0,3
*16	Ч	18	9,4	8,7
*18	Н	11	5,7	1,1
*20	Н	3	1,6	1,2
*22	Ч	3	1,6	1,2
*24	Ч	27	14,1	29,0
*25	Н	1	0,5	2,7
*28	У	2	1,0	1,9
*32	Н	2	1,0	1,9
*33	Н	1	0,5	2,7
*36	Н	4	2,1	0,7
*38	Н	1	0,5	2,7
*39	Н	1	0,5	2,7
*46	Н	1	0,5	2,7
*53	Н	1	0,5	2,7
*54	Н	1	0,5	2,7
Всего: 27				$\Sigma=157,5$

Таблица 23 – Показатели генетической структуры стада коров симментальской породы

Параметр		Значение
Количество		96
Количество гомозигот	наблюдаемое	30
	ожидаемое	8,7
Количество гетерозигот	наблюдаемое	66
	ожидаемое	87,3
A		27
h		0,9
F _{is}	W&C	0,2449
	R&H	0,1462
Def (SE)		0,0000 (0,0000)

Выявленные особенности аллельного профиля выборки коров симментальской породы нашли отражение в генотипических характеристиках, сводившихся к тому, что гомозиготные генотипы, восприимчивые к вирусу лейкоза (16/16) и (24/24), встречались с частотой – 5,2 и 7,3% соответственно, при суммарной доле 12,5%. Доля гомозиготного генотипа устойчивости (11/11) составила 5,2% (таблица 24).

Выявленная закономерность нашла отражение в рисунках 25 и 26, свидетельствующая о большей суммарной доле в данной популяции скота симментальской породы генотипов восприимчивых к вирусу лейкоза при преобладании генотипа НН.

Таблица 24 – Генотипическая структура выборки коров симментальской породы

Генотип по локусу BoLA-DRB3		Количество особей	Частота, %
7/7	НН	4	4,2
8/10	ЧН	5	5,2
7/11	НУ	5	5,2
11/11	УУ	5	5,2
16/16	ЧЧ	5	5,2
11/18	УН	4	4,2
7/24	НЧ	5	5,2
24/24	ЧЧ	7	7,3

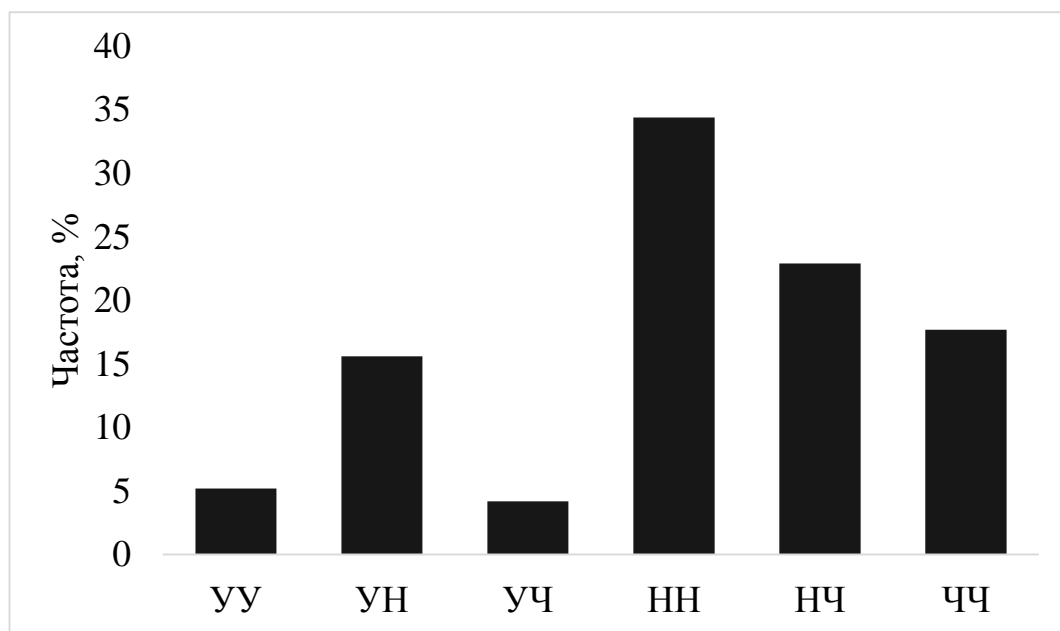


Рисунок 25 – Распределение и частота генотипов устойчивости к лейкозу

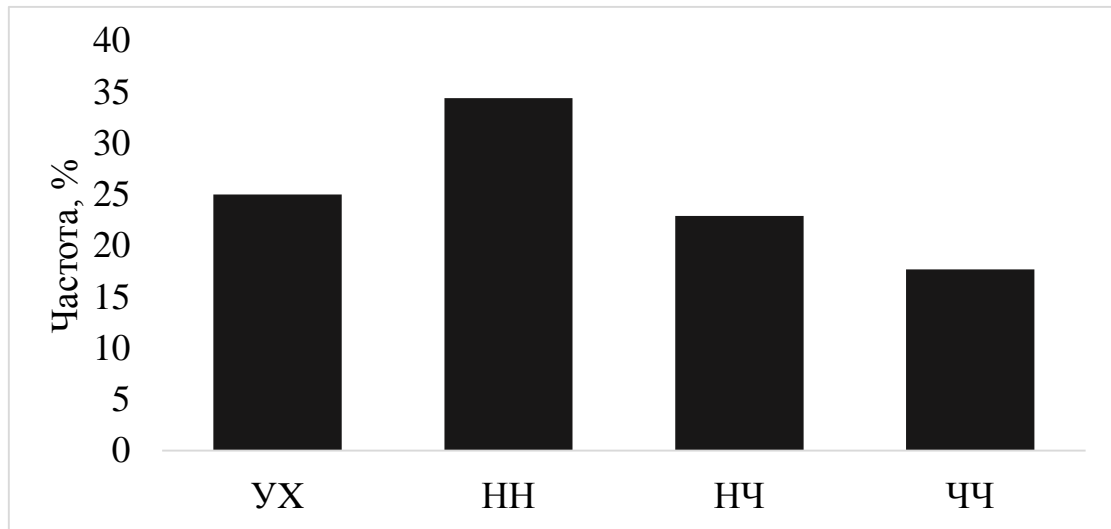


Рисунок 26 – Устойчивость к вирусу лейкоза коров симментальской породы

Таким образом, стадо коров симментальской породы (СХПК «Большевик») можно охарактеризовать как популяцию неравновесную, с преобладанием гомозигот (20%), неустойчивую к вирусу лейкоза за счет значительной доли аллелей восприимчивости к этому заболеванию, преобладания генотипов НН, с большим пулом нейтральных аллелей и небольшим уровнем разнообразия на фоне большого количества аллелей в локусе гена BoLA-DRB3.

3.1.3 Генетический полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров швицкой породы СПК «Красный рог»

При рассмотрении распределения аллелей гена BoLA-DRB3 в выборке коров (n=68) швицкой породы, разводимой в СПК «Красный рог» обращает на себя внимание присутствие значительного количества аллелей, относящихся к классу нейтральных, с суммарным количеством 77,1%.

При этом мажорные аллели не представляют большинство, пять отнесены к минорным: *2, *13, *15, *20, *25, с суммарной частотой встречаемости 7% (таблица 25).

Таблица 25 – Результаты анализа генетического профиля стада коров швицкой породы СПК «Красный рог»

Аллель BoLA-DRB3	Статус аллеля	Количество	Частота, %	χ^2
*1	Н	3	4,3	0,3
*2	Н	1	1,4	3,1
*7	Н	19	27,1	83,9
*8	Ч	8	11,4	6,2
*10	Н	4	5,7	0,0
*11	У	2	2,9	1,3
*12	Н	4	5,7	0,0
*13	Н	1	1,4	3,1
*15	Н	1	1,4	3,1
*16	Ч	2	2,9	1,3
*18	Н	6	8,6	1,6
*20	Н	1	1,4	3,1
*21	Н	4	5,7	0,0
*22	Ч	4	5,7	0,0
*25	Н	1	1,4	3,1
*26	Н	3	4,3	0,3
*27	Н	2	2,9	1,3
39	Н	4	5,7	0,0
Всего: 18				$\Sigma=111,6$

Частота встречаемости аллелей, принадлежащих к группе чувствительных (*8, *16, *22) составила 20%, в то время как устойчивых (*11) – 2,9%.

Выборка коров швицкой породы данного хозяйства характеризуется превышением количества гомозигот над ожидаемым, этому соответствует

значение индексов F_{IS} 0,3330 и 0,1993. Гетерозиготность составляет 0,9. Вероятность ошибиться при принятии гипотезы об отклонении данной популяции от равновесной составляет <0,001% (таблица 26).

Выявленная ситуация нашла отражение в частоте встречаемости генотипов с ярко выраженным преимуществом НН и отсутствием УУ генотипов

(рисунки 27 и 28).

Таблица 26 – Показатели генетической структуры стада коров швицкой породы СПК «Красный рог»

Параметр		Значение
Количество		35
Количество гомозигот	наблюдаемое	14
	ожидаемое	3,7
Количество гетерозигот	наблюдаемое	21
	ожидаемое	31,3
A		18
h		0,90
F_{is}	W&C	0,3330
	R&H	0,1993
Def (SE)		0,0000 (0,0000)

Поскольку в исследуемой выборке коров преобладают генотипы НН и практически отсутствуют генотипы устойчивости УУ, то данное стадо следовало бы характеризовать как восприимчивое к лейкозу.

Однако, согласно исследованиям Roberts D.H., Bushnell S. (1982) и Джупиной С.И. (2002) и собственным наблюдениям, швицкая порода (мясное направление) в целом менее подвержена лейкозу, по сравнению с черно-пестрой и голштино-фризской породами [14; 127]. Весьма вероятно, что большая доля аллеля *7 может обуславливать устойчивость данной породы к

ВЛ КРС, так как рядом исследователей установлена связь этой аллели с устойчивостью к вирусу лейкоза [54].

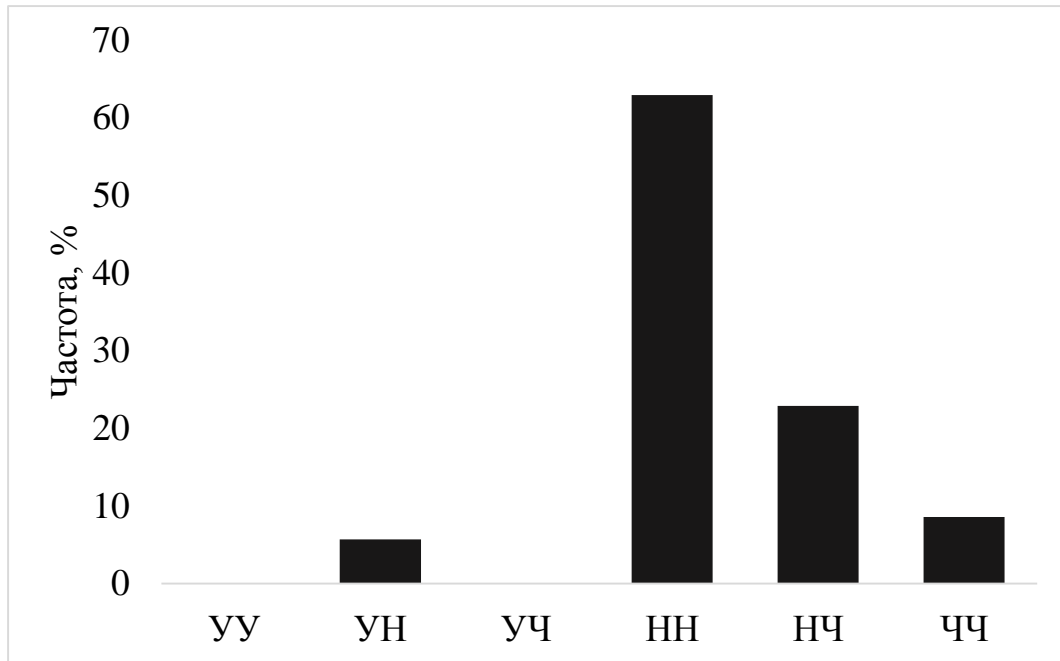


Рисунок 27 – Распределение и частота генотипов устойчивости к лейкозу

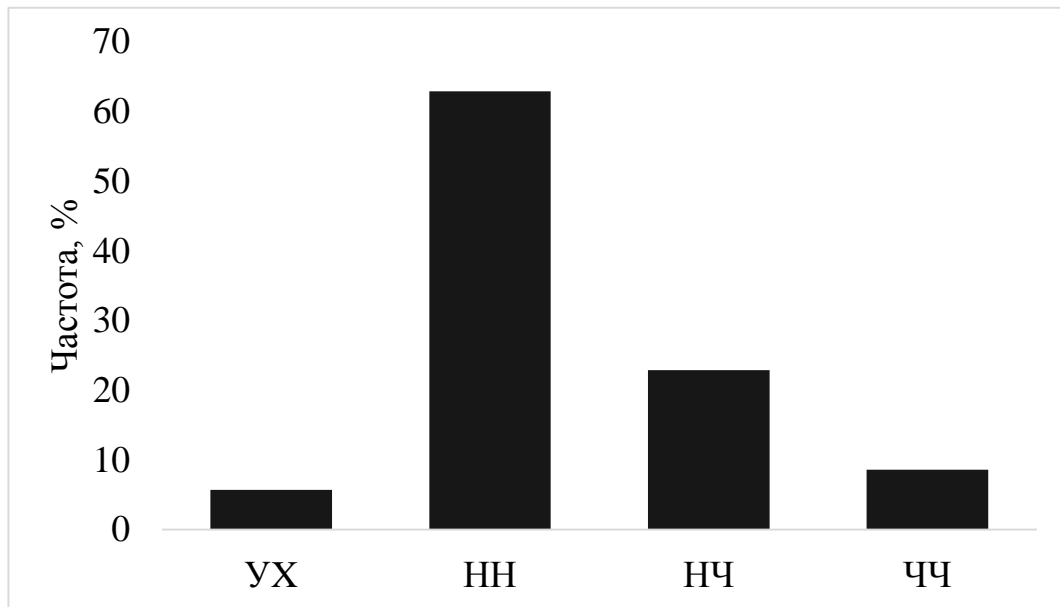


Рисунок 28 – Устойчивость к вирусу лейкоза стада коров швицкой породы

Таким образом, стадо коров швицкой породы, разводимой в СПК «Красный рог», можно отнести к популяции, отклоняющуюся от закона Харди-Вайнберга, с уровнем превышения гомозигот 20%, нейтральную в

отношении вируса лейкоза с преобладанием генотипа НН, с невысоким разнообразием гена BoLA-DRB3.

3.1.4 Генетический полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров айрширской породы п. Сельцо

Анализ частоты встречаемости аллелей локуса гена BoLA-DRB3 выборки коров (n=100) айрширской породы выявил особенности аллельного профиля, включающего 16 аллелей (таблица 27).

Таблица 27 – Результаты анализа генетического профиля стада коров айрширской породы п. Сельцо

BoLA-DRB3		Количество	Частота, %	χ^2
*2	Н	1	1,0	4,4
*7	Н	37	37,0	151,3
*8	Ч	1	1,0	4,4
*10	Н	1	1,0	4,4
*11	У	7	7,0	0,1
*12	Н	4	4,0	0,8
*15	Н	3	3,0	1,7
*16	Ч	2	2,0	2,9
*18	Н	2	2,0	2,9
*19	Н	4	4,0	0,8
*20	Н	5	5,0	0,3
*23	У	8	8,0	0,5
*24	Ч	9	9,0	1,2
*25	Н	6	6,0	0,0
*28	У	8	8,0	0,5
*36	Н	2	2,0	2,9
Всего: 16				$\Sigma=179,0$

В данной выборке присутствует единственный мажорный аллель *7, с частотой встречаемости 37,0%, три минорных аллеля (*2, *8, *10), с суммарной частотой – 3,0%.

Частота встречаемости аллелей, ассоциированных с восприимчивостью к лейкозу (*8, *16, *24), составила 12%, с устойчивостью

(*11, *23, *28) – в 2 раза выше – 23%. Данное стадо имеет избыток гомозигот. Индекс инбридинга равен 25% (таблица 28).

Таблица 28 – Показатели генетической структуры стада коров айрширской породы

Параметр		Значение
Количество		50
Количество гомозигот	наблюдаемое	20
	ожидаемое	8,3
Количество гетерозигот	наблюдаемое	30
	ожидаемое	41,7
A		16
h		0,83
F _{is}	W&C	0,2826
	R&H	0,2310
Def (SE)		0,0000 (0,0000)

Наличие единственного мажорного аллеля отражается на распределении генотипов. Наиболее часто встречаемыми являются НН и УУ генотипы (таблица 29).

Таблица 29 – Генотипическая структура выборки коров айрширской породы

Генотип по локусу BoLA-DRB3		Количество особей	Частота, %
7/7	НН	10	20
11/20	УН	3	6
7/23	НУ	7	14
7/24	НЧ	4	8
7/28	НУ	3	6

Доминирование нейтральных аллелей с преобладанием генотипа НН четко отображено на диаграммах (рисунок 29 и 30).

Обращает на себя внимание тот факт, что согласно нашим исследованиям, в данном хозяйстве не зарегистрированы случаи заболевания

животных лейкозом. Кроме того, в работах, выполненных в лаборатории сравнительной генетики животных ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН на айрширской породе, указывается на возможную роль аллеля *7 в формировании устойчивости к ВЛ КРС.

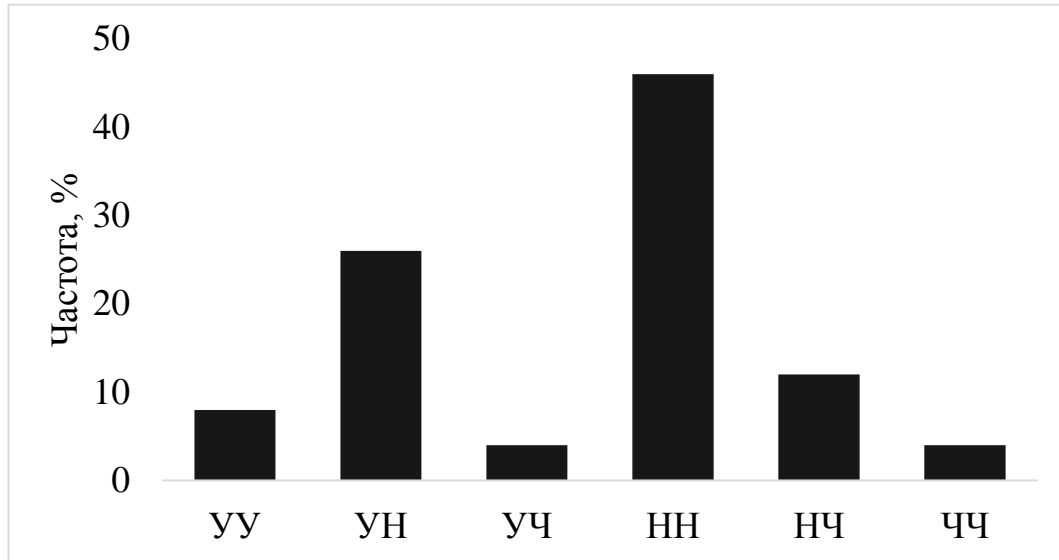


Рисунок 29 – Распределение и частота генотипов устойчивости к лейкозу

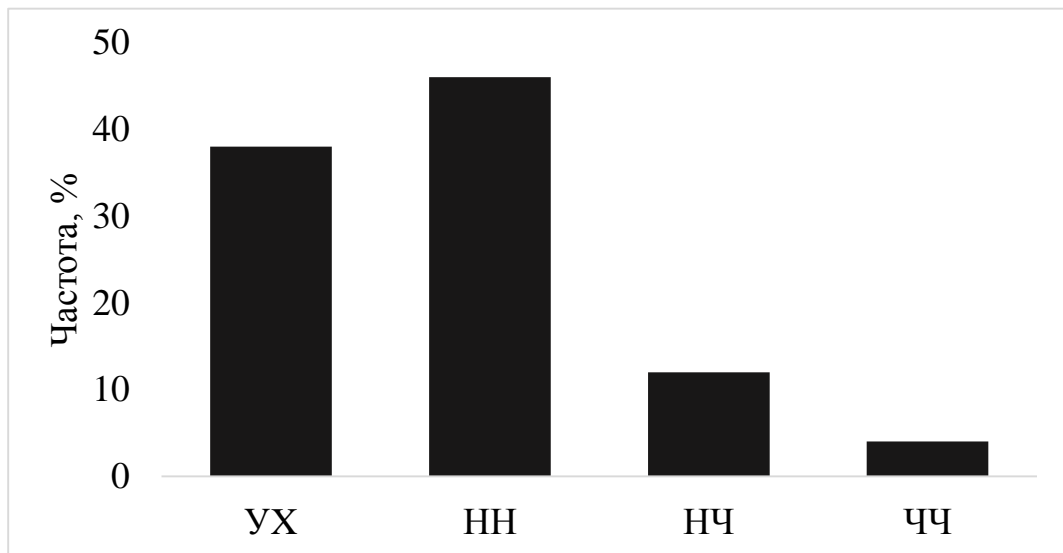


Рисунок 30 – Устойчивость к вирусу лейкоза стада коров айрширской породы

Таким образом, стадо айрширской породы является популяцией неравновесной за счет превышения уровня гомозигот над ожидаемым,

устойчивой к вирусу лейкоза с преобладанием генотипа НН и низким разнообразием гена BoLA-DRB3.

3.1.5 Генетический полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров красно-пестрой породы колхоза «Память Ленина»

Особенностью выборки коров (n=29) красно-пестрой породы является то, что из 18 выявленных аллелей, доля мажорных составила 64,3%, минорных (*1, *4, *5, *8, *9, *15, *22, *26, *33, *43) – 18% (таблица 30).

Таблица 30 – Результаты анализа генетического профиля стада коров красно-пестрой породы колхоз «Память Ленина»

Аллель BoLA-DRB3	Статус аллеля	Количество	Частота, %	χ^2
*1	Н	1	1,8	2,6
*4	Н	1	1,8	2,6
*5	Н	1	1,8	2,6
*7	Н	10	17,9	27,2
*8	Ч	1	1,8	2,6
*9	Н	1	1,8	2,6
*11	У	2	3,6	0,7
*12	Н	3	5,4	0,0
*15	Н	1	1,8	2,6
*16	Ч	6	10,7	4,8
*18	Н	2	3,6	0,7
*22	Ч	1	1,8	2,6
*23	У	3	5,4	0,0
*24	Ч	12	21,4	45,4
*26	Н	1	1,8	2,6
*28	У	8	14,3	13,7
*33	Н	1	1,8	2,6
*43	Н	1	1,8	2,6

Всего: 18			$\Sigma=118,1$
-----------	--	--	----------------

Частота встречаемости аллелей (*8, *16, *22, *25, *24), отвечающих за восприимчивость к вирусу лейкоза, составила 35,7%, аллелей устойчивости (*11, *23, *28) – 23,3%, остальные – 41,0% – нейтральные.

Для данной выборки коров красно-пестрой породы характерно смещение равновесия в сторону превышения гомозигот. Вероятность ошибиться при отклонении гипотезы о подчинении исследуемой группы закону Харди-Вайнберга составляет 4% (таблица 31).

Таблица 31 – Показатели генетической структуры стада коров красно-пестрой породы

Параметр		Значение
Количество особей выборки		28
Количество гомозигот	наблюдаемое	7
	ожидаемое	2,9
Количество гетерозигот	наблюдаемое	21
	ожидаемое	25
A		18
h		0,88
F _{is}	W&C	0,1643
	R&H	0,0535
Def (SE)		0,0429 (0,0002)

Аллельный спектр послужил основой для формирования генотипов. Оказалось, что в исследуемой выборке коров преобладает генотип ЧН (рисунки 31 и 32). При этом суммарное количество устойчивых генотипов превалирует над чувствительными, что свидетельствует о достаточно высокой генетической устойчивости к вирусу лейкозу стада в целом.

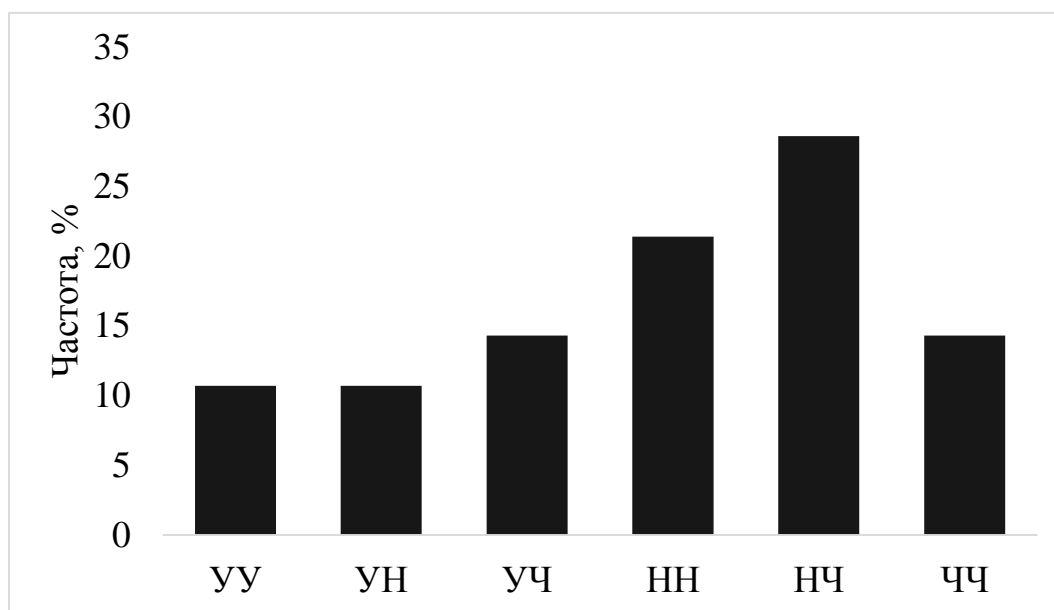


Рисунок 31 – Распределение и частоты генотипов устойчивости к лейкозу

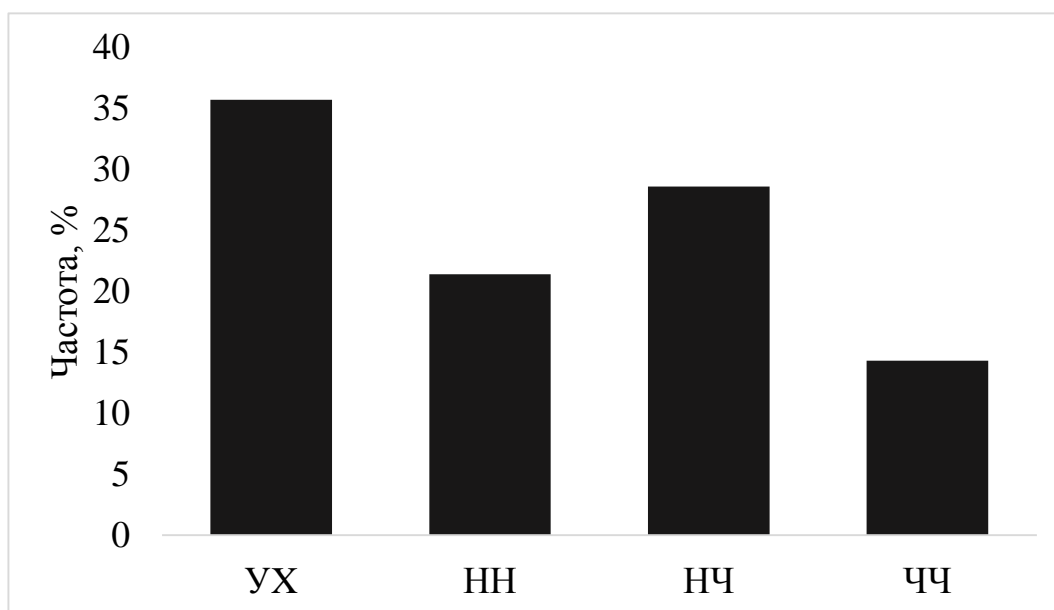


Рисунок 32 – Устойчивость к вирусу лейкоза выборки коров красно-пестрой породы

Таким образом, стадо коров красно-пестрой породы, разводимой в колхозе «Память Ленина» можно охарактеризовать как популяцию, отличающуюся от закона Харди-Вайнберга с уровнем превышения гомозигот в 10%, восприимчивую к вирусу лейкоза за счет значительной доли

генотипов ЧЧ и ЧН, с преобладанием генотипа ЧН и низким уровнем разнообразия гена BoLA-DRB3.

3.2 Сравнительная характеристика генетической устойчивости молочного скота к вирусу лейкоза

Анализ проведенного исследования позволил выявить особенности аллельного разнообразия локуса BoLA-DRB3 молочного скота, разводимого в племенных и товарных хозяйствах Брянской области.

Генотипированием репрезентативной выборки коров черно-пестрой (СПК «Агрофирма «Культура», ОАО «Новый путь», ООО «Снежка-Госома» и Жирятино), швицкой (СПК «Красный рог»), айрширской (Сельцо), красно-пестрой (колхоз «Память Ленина») пород было выявлено 37 ПДРФ-типа аллелей в локусе гена BoLA-DRB3 с различной частотой встречаемости (таблица 32, рисунок 33).

Установлено присутствие общих аллелей (*7, *8, *11, *12 и *16) во всех исследуемых стадах. Для 4-х исследуемых популяций черно-пестрого скота характерны 12 общих аллелей (*7, *8, *11, *12, *13, *14, *16, *20, *22, *23, *24 и *28), из них 3 ассоциированы с устойчивостью (*11, *23, *28), 4 аллеля – с чувствительностью к вирусу лейкоза (*8, *16, *22, *24). Аллель *7 в ряде работ описан как нейтральный, авторы делают вывод, что этот аллель, составляющий значительную долю в стадах айрширской породы, отвечает за устойчивость в ВЛ КРС, что подтверждается данными о том, что коровы этой породы реже заболевают лейкозом [54].

Анализом и сопоставлением установлено, что аллель, являющийся мажорным в одной популяции, в другой может быть менее широко представлен, а в некоторых случаях является минорным. Так, аллель *7, доминирующий в стадах айрширской и симментальской пород, является минорным в группах черно-пестрой породы (кроме стада г. Жирятино). Аллель *11 мажорный в трех стадах черно-пестрой породы (СПК

«Агрофирма «Культура», ООО «Снежка-Госома», СХПК «Большевик»), в двух (швицкой и айрширской) – минорный.

Таблица 32 – Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 пород крупного рогатого скота, разводимого в Брянской области

Аллель BoLA- DRB3	Стадо								Номер аллеля
	ЧП1	ЧП2	ЧП3	ЧП4	СИМ	ШВ	АЙР	КП	
	Частота аллеля, %								
*1	—	0.6	0.8	—	0.5	4.3	—	1.8	*1
*2	—	—	0.8	0.6	1.6	1.4	1.0	—	*2
*3	4.3	4.1	0.8	0.6	0.5	—	—	—	*3
*4	—	0.6	0.8	3.1	—	—	—	1.8	*4
*5	—	—	—	—	2.1	—	—	1.8	*5
*6	—	—	0.8	—	—	—	—	—	*6
*7	3.2	6.4	2.5	13.6	15.1	27.1	37.0	17.9	*7
*8	9.6	10.2	9.0	7.4	6.3	11.4	1.0	1.8	*8
*9	—	0.3	—	—	4.7	—	—	1.8	*9
*10	—	5.5	5.7	8.0	10.9	5.7	1.0	—	*10
*11	16.0	9.7	13.9	8.0	14.1	2.9	7.0	3.6	*11
*12	2.1	0.6	0.8	0.6	0.5	5.7	4.0	5.4	*12
*13	1.1	0.3	1.6	1.9	1.0	1.4	—	—	*13
*14	1.1	1.1	0.8	1.2	—	—	—	—	*14
*15	—	2.5	6.6	4.9	2.6	1.4	3.0	1.8	*15
*16	5.3	9.9	1.6	5.6	9.4	2.9	2.0	10.7	*16
*17	—	5.0	—	0.6	—	—	—	—	*17
*18	8.5	—	0.8	3.1	5.7	8.6	2.0	3.6	*18
*19	—	0.6	0.8	0.6	—	—	4.0	—	*19
*20	1.1	1.7	5.7	4.9	1.6	1.4	5.0	—	*20

*21	—	0.8	—	1.9	—	5.7	—	—	*21
*22	16.0	10.2	5.7	3.1	1.6	5.7	—	1.8	*22
*23	3.2	8.8	16.4	9.3	—	—	8.0	5.4	*23
*24	23.4	13.8	13.1	3.7	14.1	—	9.0	21.4	*24
*25	—	3.0	0.8	3.1	0.5	1.4	6.0	—	*25
*26	—	1.7	0.8	4.9	—	4.3	—	1.8	*26
*27	1.1	—	—	—	—	2.9	—	—	*27
*28	3.2	2.8	4.1	4.9	1.0	—	8.0	14.3	*28
*30	—	—	1.6	1.2	—	—	—	—	*30
*32	—	—	—	—	1.0	—	—	—	*32
*33	—	—	—	—	0.5	—	—	1.8	*33
*36	—	—	3.3	3.1	2.1	—	2.0	—	*36
*38	—	—	—	—	0.5	—	—	—	*38
*39	—	—	—	—	0.5	5.7	—	—	*39
*43	—	—	—	—	—	—	—	1.8	*43
*46	—	—	—	—	0.5	—	—	—	*46
*50	1.1	—	—	—	—	—	—	—	*50
*53	—	—	—	—	0.5	—	—	—	*53
*54	—	—	—	—	0.5	—	—	—	*54
Всего	16	23	25	25	27	18	16	18	37
Число особей	47	181	61	81	96	35	50	28	

Ярко выраженная вариабельность частот встречаемости характерна и для аллелей *22, *23, *24, *28, *8, *16. Из них аллели *22, *24, *8, *16 относятся к категории восприимчивых к вирусу лейкоза, аллели *23, *28 – устойчивых.

Особого внимания заслуживает анализ распределения спектра аллелей в стадах черно-пестрой породы. Выявленные различия касаются не только

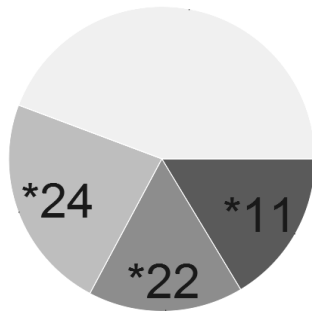
количества (частота встречаемости), но и качества характеристик (набор аллелей). Сопоставление полученных данных с результатами других исследователей по распределению аллелей гена *BoLA-DRB3* среди стад черно-пестрой породы, позволяет сделать вывод о неоднородности генетической структуры черно-пестрой породы. Так, по данным Н.М. Шарифуллиной (2005) два стада черно-пестрой породы Башкортостана различались по частотам как доминирующих аллелей, так и по набору нейтральных в отношении к ВЛ КРС аллелей [56]. В тоже время, в этих стадах не обнаружен аллель *10, присутствующий в стадах Московской области [17]. Не обнаружен этот аллель и в стадах черно-пестрой породы в хозяйствах Краснодарского края [29].

Одной из причин неоднородности генетической структуры популяции одной и той же породы в разных хозяйствах является, вероятно, проводимая в каждом конкретном хозяйстве селекционная работа, в частности, использование быков-производителей разных линий, на что указывают в своих работах В.Ф. Сацук и Н.В. Ковалюк. Быки-производители, имеющие различное происхождение (страна экспорта), и принадлежащие к разным линиям, различаются по набору и распределению аллелей гена *BoLA-DRB3* [19; 21; 22; 39]. В то же время, исследователи отмечают, что такие аллели как *22 и *24 присутствовали во всех исследуемых стадах черно-пестрой породы.

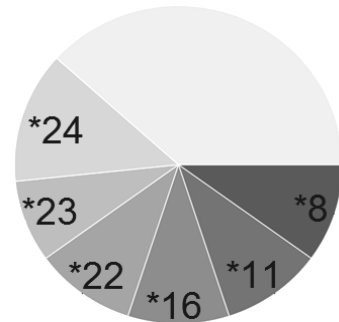
Наибольшие дифференцирующие свойства из аллелей, относящихся к мажорным, характерны для аллелей *24 и *28 при достаточно высокой их представленности в изученных стадах, кроме стада швицкой породы СПК «Красный рог».

Значительные различия между стадами наблюдаются по минорным аллелям, но ввиду низкой частоты их встречаемости, выводы об их дифференцирующих свойствах могут быть недостоверными. Наибольший набор минорных аллелей (*32, *38, *46, *53 и *54) характерен для выборки коров симментальской породы. Аллель *6 присутствовал только в стаде

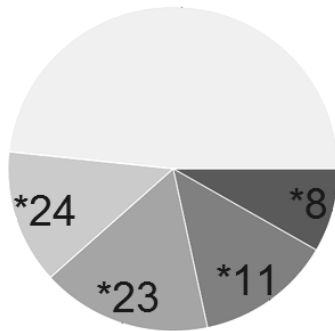
черно-пестрой породы (ООО «Снежка-Госома»), а аллель *43 в стаде – колхоза «Память Ленина» красно-пестрой породы. Для минорного аллеля *14 характерно равномерное распределение во всех популяциях черно-пестрой породы и отсутствие в остальных изучаемых породах (рисунок 33).



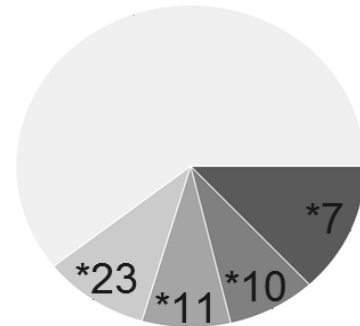
ЧП1



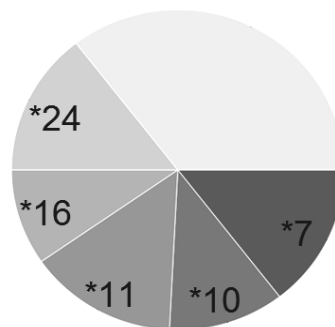
ЧП2



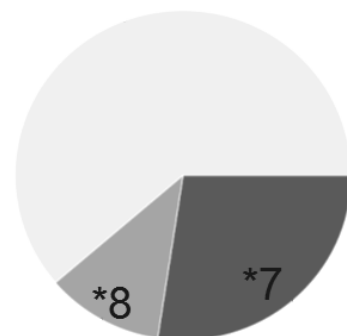
ЧП3



ЧП4



СИМ



ШВ

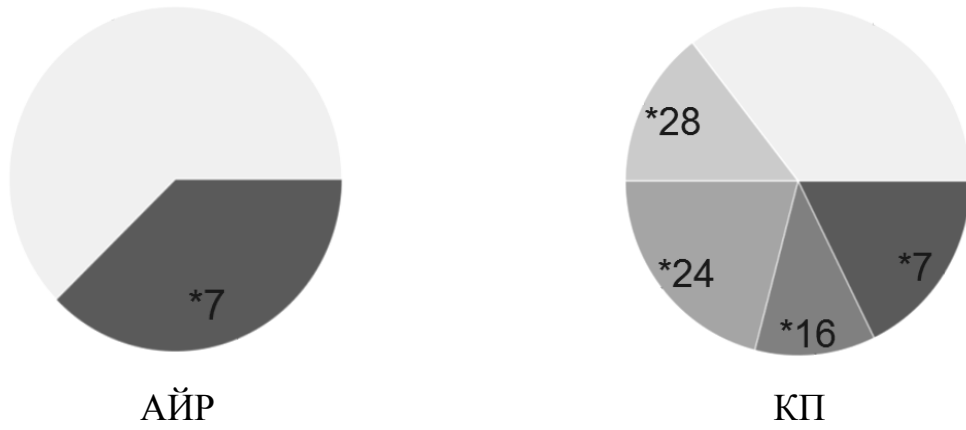


Рисунок 33 – Аллельный спектр гена BoLA-DRB3 разных пород крупного рогатого скота

Вариабельность суммарной частоты аллелей устойчивых к вирусу лейкоза в изучаемых стадах варьировала от 34,4 в выборке коров черно-пестрой породы ООО «Снежжа-Госома» до 2,9% в швицкой породе (таблица 33, рисунки 34 и 35).

Сравнительно равномерно (22,4; 21,3; 22,2; 23,0; 23,3%) представлено распределение аллелей в популяциях черно-пестрой породы (СПК «Агрофирма «Культура», ОАО «Новый путь», Жирятино), айрширской и красно-пестрой породах, несколько реже 15,1% – в швицкой.

Таблица 33 – Частота встречаемости аллелей гена VoLA-DRB3, ассоциированных с развитием гемобластоза

Аллель VoLA- DRB3	Стадо							
	ЧП1	ЧП2	ЧП3	ЧП4	СИМ	ШВ	АЙР	КП
	Частота аллеля устойчивости к ВЛ КРС, %							
*11	16,0	9,7	13,9	8,0	14,1	2,9	7,0	3,6
*23	3,2	8,8	16,4	9,3	-	-	8,0	5,4
*28	3,2	2,8	4,1	4,9	1,0	-	8,0	14,3
Сумма	22,4	21,3	34,4	22,2	15,1	2,9	23,0	23,3
Аллель VoLA- DRB3	Стадо							
	ЧП1	ЧП2	ЧП3	ЧП4	СИМ	ШВ	АЙР	КП
	Частота аллеля чувствительности к ВЛ КРС, %							
*8	9,6	10,2	9,0	7,4	6,3	11,4	1,0	1,8
*16	5,3	9,9	1,6	5,6	9,4	2,9	2,0	10,7
*22	16,0	10,2	5,7	3,1	1,6	5,7	-	1,8
*24	23,4	13,8	13,1	3,7	14,1	-	9,0	21,4
Сумма	54,3	44,1	29,4	19,8	31,4	20,0	12,0	35,7

Максимальную суммарную концентрацию аллелей устойчивости к лейкозу в выборке коров черно-пестрой породы (ООО «Снежжа-Госома») обеспечили аллели *23 и *11.

В популяции коров этой же породы (СПК «Агрофирма «Культура»), частота аллеля *11 составила 16,0%. С частотой встречаемости (13,9 и 14,1%)

представлен аллель *11 в стаде черно-пестрой породы ООО «Снежка-Госома» и симментальской породе. В популяциях черно-пестрой породы (ОАО «Новый путь» и Жирятино) аллели *11 и *23 распределились 9,7; 8,8; 8,0; 9,3% соответственно.

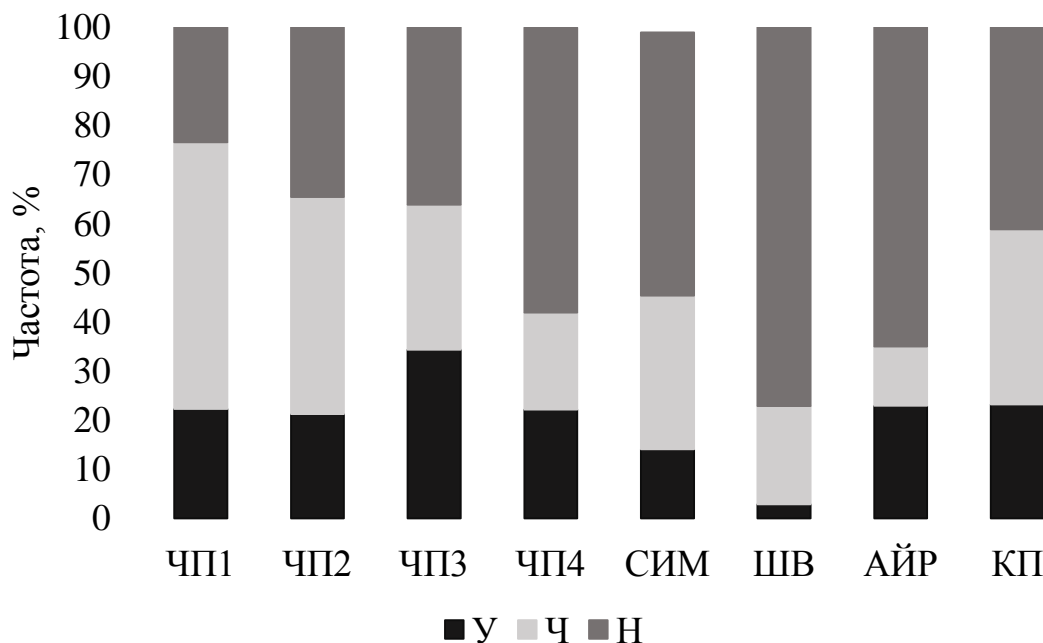


Рисунок 34 – Распределение аллелей устойчивости, чувствительности, нейтральных к ВЛ КРС в разных породах крупного рогатого скота

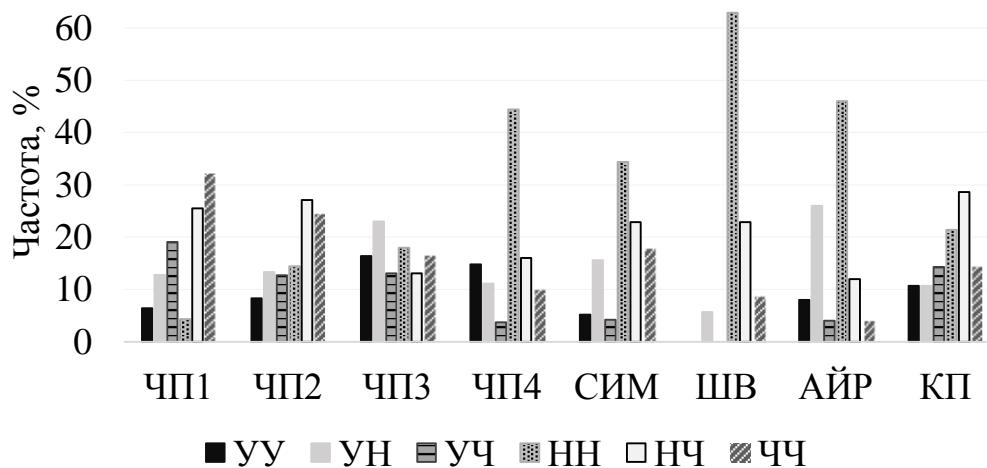


Рисунок 35 – Распределение и частоты генотипов BoLA-DRB3 в исследованных породах и стадах крупного рогатого скота

В выборке коров айрширской породы присутствие аллелей *11, *23, *28 составило 7,0; 8,0; 8,0% соответственно. Среди коров черно-пестрой породы с наибольшей концентрацией (14,3%) выявлен аллель *28.

Что касается суммарного распределения частоты встречаемости аллелей восприимчивых к ВЛ КРС, то больше половины (54,3%) было обнаружено в выборке коров СПК «Агрофирма «Культура», несколько ниже (44,1; 35,7%) – среди коров черно-пестрой ОАО «Новый путь» и красно-пестрой пород.

Сравнительно равномерно (29,4 и 31,4%) распределилась суммарная концентрация аллелей чувствительности в популяции черно-пестрой (ООО «Снежка-Госома») и симментальской пород, соответственно. Наименьшая концентрация восприимчивых к ВЛ КРС характерна для выборки коров айрширской породы – 12,0%.

Однако делать вывод об устойчивости или восприимчивости конкретного стада в целом, возможно лишь с учетом доминантного характера наследования признака устойчивости к ВЛ КРС. Диаграмма, позволяющая провести такое сравнение, представлена на рисунке 36.

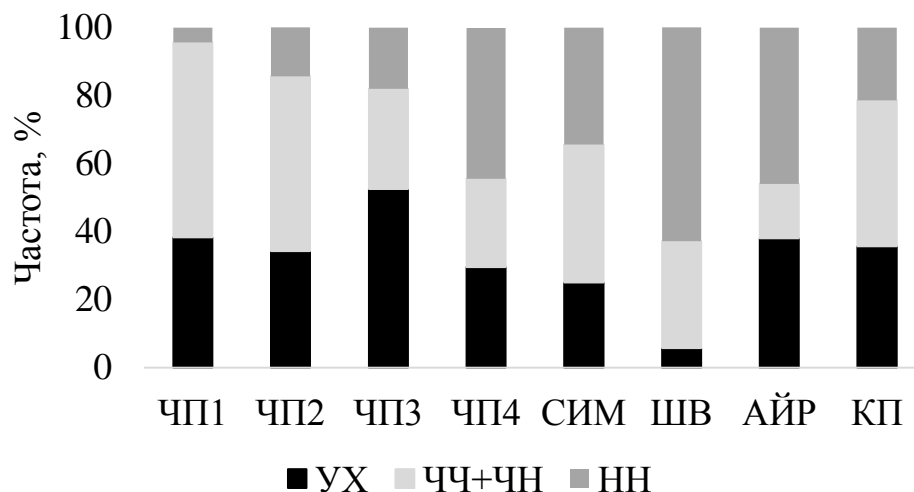


Рисунок 36 – Соотношение генотипов BoLA-DRB3 в породах и стадах крупного рогатого скота ассоциированных с устойчивостью и чувствительностью к вирусу лейкоза

Наибольшая доля генотипов устойчивости выявлена в стаде черно-пестрой породы (ООО «Снежка-Госома»), при этом доля генотипов чувствительности в этом стаде относительно низка.

В стадах черно-пестрой породы (СПК «Агрофирма «Культура» и ОАО «Новый путь») относительно высока доля генотипов чувствительности с преобладанием доли генотипов устойчивости к вирусу лейкоза. В стаде швицкой породы сравнительно высока доля нейтральных генотипов, в основном за счет генотипов с аллелем *7.

Высокая доля нейтральных генотипов присутствует в стаде айрширской породы с достаточно высокой долей генотипов устойчивости.

Выявление в ходе анализа специфических аллелей, характерных для конкретной породы, возможно, носит случайный характер и не отражает общей закономерности. Более детальная межпородная дифференциация возможна с помощью оценки уровня разнообразия и вычисления генетических дистанций.

Установлено, что во всех исследованных стадах наблюдаемое количество гомозигот превышало ожидаемое, причем в некоторых случаях существенно (таблица 34).

Это отразилось и на больших значениях индекса фиксации, отражающего инбридинг в популяции. Ввиду высокой полиморфности исследуемого локуса, высока вероятность гомозиготности и по другим генам. Но гомозиготность по гену *BoLA-DRB3* не обязательно означает высокий уровень инбридинга. Обнаруженный в некоторых стадах низкий уровень гетерозиготности может быть связан со скрытым инбридингом [40]. Это явление может быть причиной низкой продуктивности, сниженного выхода телят и повышенной заболеваемости.

Вычисление генетических дистанций по Nei позволило сравнивать выборки не только по наличию-отсутствию разных аллелей, но и по их частотам. Матрица генетического сходства между изученными стадами приведена в таблице 35.

Таблица 34 – Генетическая структура стад разных пород крупного рогатого скота

Параметр		Значение							
		ЧП1	ЧП2	ЧП3	ЧП4	СИМ	ШВ	АЙР	КП
Количество особей		47	181	61	81	96	35	50	28
Количество гомозигот	наблюдаемое	9	50	9	42	30	14	20	7
	ожидаемое	5,6	14,1	5,1	4,8	8,7	3,7	8,3	2,9
Количество гетерозигот	наблюдаемое	38	130	52	39	66	21	30	21
	ожидаемое	41,4	165,9	55,9	76,2	87,3	31,3	41,7	25
A		15	23	25	25	27	18	16	18
h		0,87	0,92	0,91	0,93	0,90	0,90	0,83	0,88
F _{is}	W&C	0,0819	0,2167	0,0707	0,4895	0,2449	0,3330	0,2826	0,1643
	R&H	0,0281	0,2205	0,0935	0,4288	0,1462	0,1993	0,2310	0,0535
Def (SE)		0,1508 (0,0002)	0,0000 (0,0000)	0,0002 (0,0000)	0,0000 (0,0000)	0,0000 (0,0000)	0,0000 (0,0000)	0,0000 (0,0000)	0,0429 (0,0002)

На основе данной матрицы были построены дендрограмма и кладограмма, на которых выборки объединились в кластеры (рисунок 37 и 38). По сходству аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 на

дендрограмме выделяются две группы: 1) швицкая и айрширская; 2) группа стад черно-пестрого скота. Отмечается высокий полиморфизм между различными стадами внутри черно-пестрой породы.

Таблица 35 – Матрица генетических дистанций по Неи у исследованных стад крупного рогатого скота

Стадо	ЧП1	ЧП2	ЧП3	ЧП4	СИМ	ШВ	АЙР	КП
ЧП1	0,0000	0,1698	0,2969	0,6319	0,3394	1,1447	1,0239	0,4256
ЧП2	0,1698	0,0000	0,1736	0,2520	0,2604	0,7434	0,6924	0,3669
ЧП3	0,2969	0,1736	0,0000	0,2579	0,4251	1,0401	0,8111	0,5735
ЧП4	0,6319	0,2520	0,2579	0,0000	0,2499	0,3159	0,2795	0,4164
СИМ	0,3394	0,2604	0,4251	0,2499	0,0000	0,4312	0,3990	0,3058
ШВ	1,1447	0,7434	1,0401	0,3159	0,4312	0,0000	0,2562	0,6275
АЙР	1,0239	0,6924	0,8111	0,2795	0,3990	0,2562	0,0000	0,2842
КП	0,4256	0,3669	0,5735	0,4164	0,3058	0,6275	0,2842	0,0000

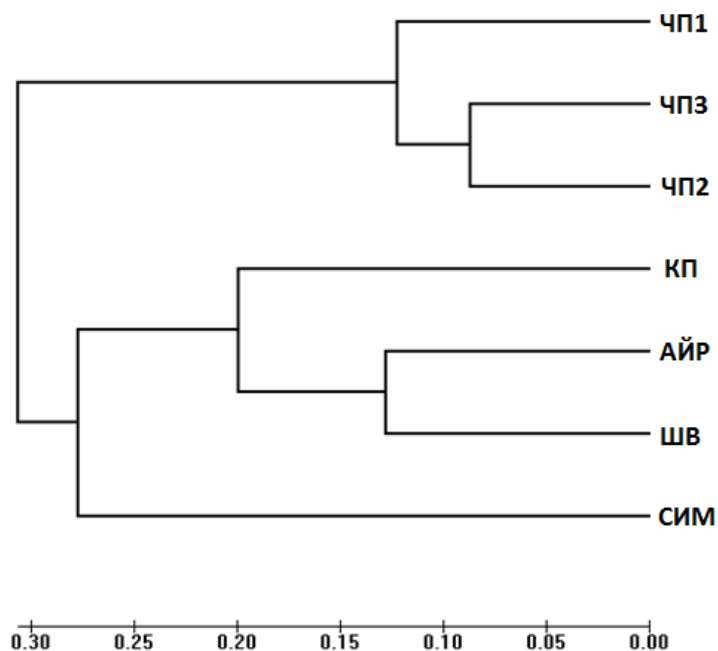


Рисунок 37 – Дендрограмма, построенная на основании коэффициентов генетической дистанции Неи, показывающая степень генетической дифференциации исследованных стад крупного рогатого скота

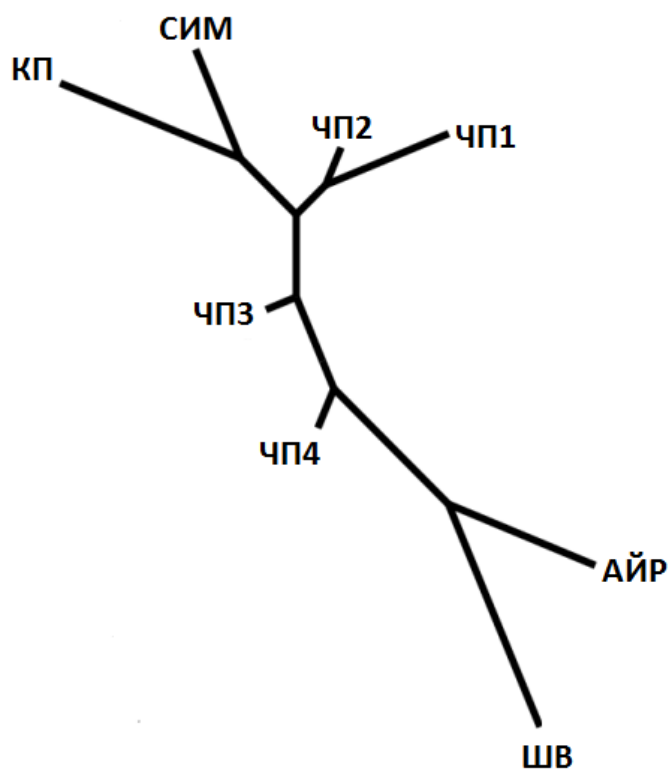


Рисунок 38 – Кладограмма, построенная на основании коэффициентов генетической дистанции Неи, показывающая степень генетической дифференциации исследованных стад крупного рогатого скота

Таким образом, проведенный анализ позволил оценить полиморфизм гена *BoLA-DRB3* разных пород крупного рогатого скота, разводимого в хозяйствах Брянской области. В целом, изученные популяции характеризуются довольно высоким уровнем полиморфизма данного гена, отличающиеся от равновесной, подчиняющейся закону Харди-Вайнберга, – наблюдается превышение уровня гомозигот в среднем на 20%. Изученное поголовье крупного рогатого скота имеет довольно высокий уровень аллелей чувствительности (в отдельных хозяйствах в гомозиготном состоянии), поэтому обладает незначительной генетической устойчивостью к вирусу лейкоза. Несмотря на довольно большой суммарный пул нейтральных аллелей, их число в отдельных хозяйствах невелико, что свидетельствует о потенциально пониженной устойчивости животных к различным инфекционным заболеваниям.

3.3 Оценка биоразнообразия популяций крупного рогатого скота на основе аллельной структуры гена BoLA-DRB3

Полученные данные, их анализ о распределении частоты аллелей гена BoLA-DRB3 крупного рогатого скота разных пород, разводимых в хозяйствах Брянской области дает возможность оценить степень их разнообразия. Разнообразие популяции в целом определяет степень её продуктивности, пластичности и устойчивости к меняющимся факторам окружающей среды, в частности устойчивость к заболеваниям [22]. Известно, что высокая молочная продуктивность зависит не только от наличия определенных аллелей, но и от их комбинации, т.е. гетерозиготные особи более продуктивны [7; 17; 18; 53; 56].

Высокая степень гетерозиготности популяции сопряжена с высоким уровнем биоразнообразия. В данном случае определение биологического разнообразия стада необходимо как способ оценки уровня устойчивости популяции и её генетический потенциал. Это актуально также в связи с проблемой обеднения генофондов, вплоть до полного исчезновения определенных аллелей в некоторых стадах [15; 30]. Наличие эффективного количественного метода оценки биоразнообразия позволит сравнивать популяции и предупреждать снижение их генетического потенциала.

Оценка разнообразия аллелей высокополиморфных генов, такого как BoLA-DRB3, может сравниться с оценкой около десятка дву- или трехаллельных генов. Поэтому использование результатов анализа уже по одному этому гену может дать определенную информацию для оценки уровня разнообразия популяции в целом и отдельных стад в частности.

При этом немаловажное значение имеет объективность оценки. Наиболее целесообразным видится использование числового индекса, который являлся бы интегральным показателем, учитывающим как общее количество компонентов разнообразия, так и характер их распределения (выравненность).

Изучаемая система представляет собой совокупность аллелей высокополиморфного гена, поэтому индекс, используемый для оценки биоразнообразия должен соответствовать следующим критериям:

- возможность учета как количества различных аллелей, так и характера их распределения по частотам;
- широкий диапазон варьирования значений критериев оценки позволяет достоверно сравнивать различные популяции между собой;
- слабая зависимость от аллелей с низкой частотой встречаемости: часто популяции бывают представлены ограниченными выборками, в результате чего попадание в выборку малопредставленных аллелей случайно и не дает возможности опираться на эти данные;
- индекс должен возрастать при увеличении количества аллелей и степени выравнивания их распределения.

В связи с этим в данной работе были рассчитаны индексы биоразнообразия, используемые в экологии, а также в теории информации и экономике применительно к аллельному пулу полиморфного гена (BoLA-DRB3) популяции.

Для сравнения уровня разнообразия локуса BoLA-DRB3 выборки коров из различных хозяйств использовали несколько индексов: Шеннона, Бриллюэна, Вильямса, Бергера-Паркера, Тейла, индекс, предложенный В.А. Топтиковым с соавторами, Макинтоша, Пиелу [32; 57; 49]. Так как значения индексов Симпсона и Бергера-Паркера обратно пропорциональны разнообразию, то для удобства сравнительного анализа использовали их обратные значения (индекс обратный индексу Симпсона – индекс «полидоминантности» или индекс Вильямса) [147]. Следует отметить, что для простоты, расчёты индексов проводили без учета гомозиготности, т.е. аллели рассматривались как общая совокупность, независимо от их распределения по особям.

Результаты расчёта индексов разнообразия аллелей гена BoLA-DRB3 в исследованных стадах крупного рогатого скота, а также коэффициентов

вариации и средние арифметические рассчитанных индексов приведены в таблице 36.

Таблица 36 – Индексы разнообразия аллелей в стадах крупного рогатого скота

	ЧП1	ЧП2	ЧП3	ЧП4	СИМ	ШВ	АЙР	КП	С, %	М
H	3,32	3,89	3,88	4,2	3,82	3,62	3,22	3,5	8%	3,68
HВ	2,99	3,72	3,49	3,9	3,53	3,14	2,89	2,97	11%	3,33
λ	8,33	12,50	12,50	16,67	11,11	10,00	5,88	9,09	28%	10,76
1/d	4,35	7,14	6,25	7,14	6,67	3,70	2,70	4,76	30%	5,34
R _T	9,87	12,39	10,81	11,54	11,41	9,75	9,86	9,31	10%	10,62
K _D	49,97	104,50	76,63	112,02	79,35	52,26	38,10	47,84	37%	70,08
U	34,04	103,24	36,69	41,47	59,36	23,97	41,76	19,51	55%	45,01
D _M	0,71	0,75	0,77	0,81	0,74	0,75	0,65	0,75	6%	0,74
E _M	0,85	0,90	0,87	0,93	0,86	0,86	0,78	0,85	5%	0,86
E	0,85	0,86	0,84	0,9	0,8	0,87	0,8	0,84	4%	0,85

Наиболее универсальными являются индексы Шеннона (H), Тейла (R_T) и Топтикова (K_D), так как их формулы учитывают распределение мажорных и минорных аллелей, т.е. оба компонента разнообразия. Индексы Вильямса λ и Бергера-Паркера 1/d представляют группу «индексов доминирования», т.е. их величины больше зависят от частоты мажорных аллелей.

Индексы Пиелу (E) и Макинтоша (U, D_M, E_M) позволяют оценить отдельно выравненность распределения аллелей в популяции. Их сравнение с другими индексами интересно для понимания различий между наблюдаемыми значениями индексов, и их применение является важным дополнением к оценке биоразнообразия.

Таким образом, существует большое число математических индексов для оценки биоразнообразия и формул их расчета, однако для практического применения необходимо выбрать один, наиболее универсальный и информативный.

Анализ индексов проводился путем сопоставления характера изменения их значений от популяции к популяции, расчета корреляций, сравнением значений среднего арифметического и коэффициентов вариации. Дополнительным инструментом для анализа индексов являются кривые значимости, приведенные на рисунке 39.

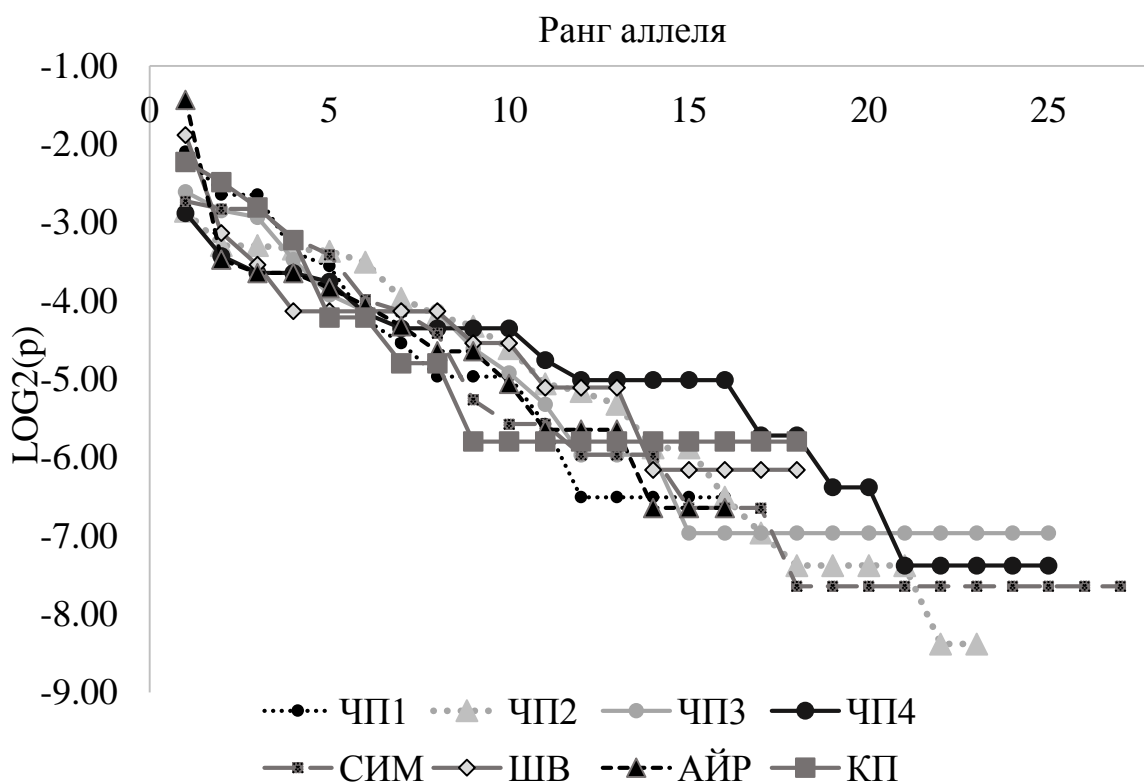


Рисунок 39 – График значимости аллелей гена BoLA-DRB3 исследованных стад крупного рогатого скота

В таблице 37 представлены данные попарной корреляции между индексами. Для расчета использовался непараметрический коэффициент, т.к. распределения значений индексов отличаются от нормальных. Для ряда пар индексов была рассчитана также корреляция по Кендаллу. Сравнение полученных значений показало их тождественность с коэффициентом корреляции 0,92, что позволяет использовать критерий Спирмена как единственно необходимый.

Таблица 37 – Значения коэффициентов корреляции Спирмена для исследуемых индексов

	H	HВ	λ	1/d	R _T	K _D	U	D _M
H	0	0,95	0,99	0,90	0,76	0,95	0,38	0,81
HВ		0	0,93	0,90	0,86	1,00	0,5	0,63
λ			0	0,87	0,72	0,93	0,33	0,83
1/d				0	0,82	0,89	0,49	0,60
R _T					0	0,86	0,81	0,30
K _D						0	0,5	0,63
U							0	-0,17
D _M								0

На рисунке 40 представлено сопоставление изменения индексов от стада к стаду. График получен путем выравнивания показателей изученных пород по шкале нормальных чисел по возрастанию. График позволяет визуально оценить значения индексов в исследуемых стадах. Для получения сопоставимых значений индексы U и K_D пересчитаны в логарифмической шкале. Индекс Пиелу представлен десятикратными значениями.

На примере изученных стад молочного скота видно, что в некоторых случаях индексы меняются синхронно. Для двух стад черно-пестрой породы ЧП1 и ЧП2 все индексы одинаково отображают биоразнообразие одной группы относительно другой. Различия между показателями проявляются для стад ЧП4, симментальской и айрширской пород. При этом, исходя из данных, представленных на рисунке 40, все показатели можно разбить на четыре группы:

- 1) показатели, меняющиеся более-менее синхронно (Шеннона, Бриллиуэна, Бергера-Паркера, K_D, Вильямса);
- 2) показатели, изменение которых отличается от остальных (Тейла и Макинтоша U);
- 3) показатели, изменение которых слишком незначительно (индекс Макинтоша D_M и E_M);
- 4) показатели выравнивания (Пиелу и Макинтоша E_M).

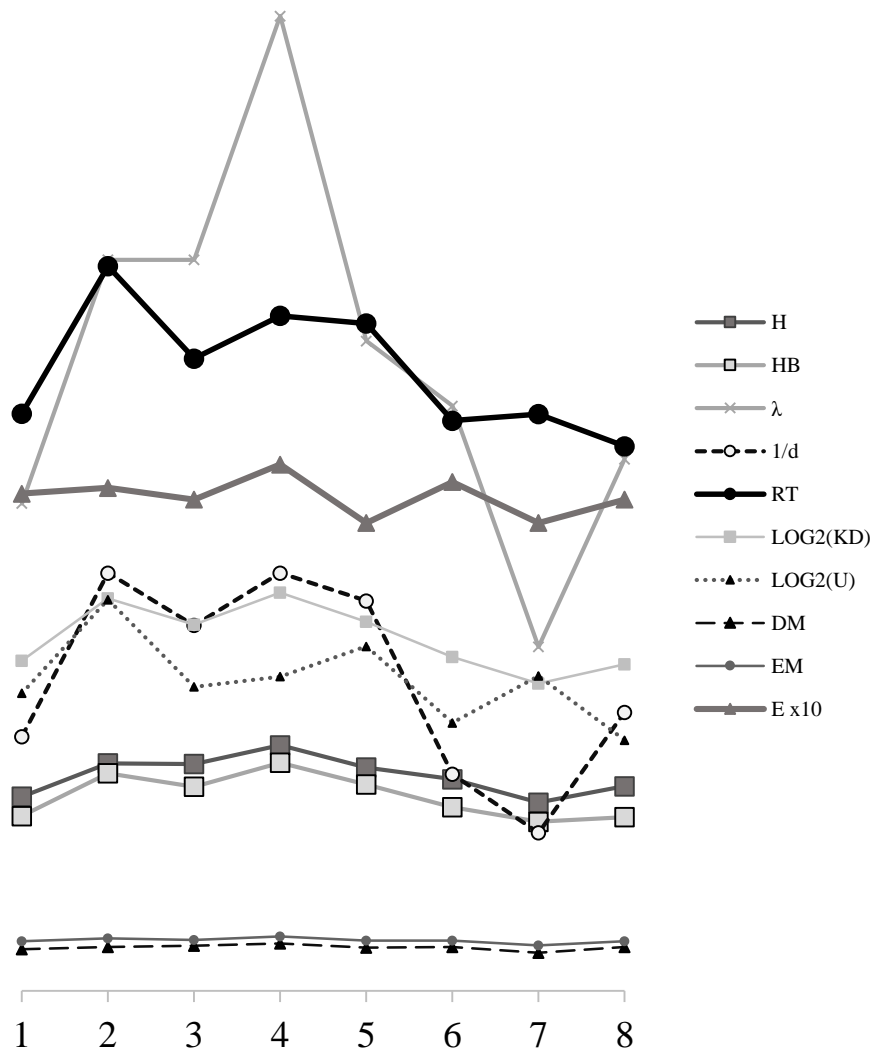


Рисунок 40 – Графическое сопоставление значения различных индексов в исследуемых породах (1 – ЧП1, 2 – ЧП2, 3 – ЧП3, 4 – ЧП4, 5 – СИМ, 6 – ШВ, 7 – АЙР, 8 – КП)

Индексы Макинтоша D_M и E_M нецелесообразно использовать для оценки биоразнообразия данной системы, так как их низкая вариабельность не позволяет эффективно сравнивать популяции между собой.

В группу синхронно изменяющихся попадают показатели, которые обнаруживают высокую степень корреляции между собой (таблица 37).

Обращает внимание на себя высокая корреляция между некоторыми энтропийными индексами и индексами доминирования (индексы Шеннона, Бриллюэна, Вильямса и Бергера-Паркера). Это может быть связано со значительной невыровненностью частот аллелей во всех наблюдаемых стадах, когда преобладает небольшое число мажорных аллелей, что подтверждается малыми колебаниями индекса Пиелу, следует из графика значимости (и просто при визуальном сравнении распределения частот аллелей). Индекс Шеннона H слабо зависит от изменения в минорных аллелях, хотя и «стремится» учитывать их. Индекс Бриллюэна по сути является двойником индекса Шеннона. Отсюда следует, что первая группа индексов на графике наиболее четко отражает изменения в мажорных аллелях популяций, характеризующихся невыравненностью распределения частот аллелей.

Интересны резкие колебания индекса доминирования Вильямса для стад ЧП4 и АЙР. Стадо ЧП4 отличается наибольшей выровненностью по частотам аллелей, это видно исходя из кривых значимости, а также из максимального значения индекса Пиелу. При этом, группа коров ЧП1 имеет всего четыре мажорных аллеля, суммарная доля которых невелика. Влияние немажорных аллелей, частоты которых более выровнены, чем в других стадах, приводит к большим значениям индексов доминирования. Индекс Шеннона также имеет большое значение для данного стада ЧП4, так как этот индекс в большей степени «опирается» на выровненность.

В стаде айрширской породы только один мажорный аллель, на который приходится значительная доля частот, что приводит в свою очередь к невыравненности (минимальное значение индекса Пиелу и характерный вид кривой значимости). На различие в мажорных аллелях реагируют минимальным значением индексы доминирования (Вильямса и обратный Бергера-Паркера), сигнализируя о наименьшем количестве мажорных аллелей среди всех изученных стад. Следствием относительной невыравненности является уменьшение и энтропийных показателей.

Однако, несмотря на уменьшение невыравненности в стаде симментальской породы, для неё характерно наличие большого количества минорных аллелей. Вот почему индекс Тейла для данного стада характеризуется не низким значением относительно других. Этот индекс зависит от количества аллелей в популяции: при минимальных значениях больше реагирует на изменение числа аллелей и учитывает изменения в минорных аллелях. Тот же эффект наблюдается и в группе айрширской породы, но не из-за большого количества минорных аллелей, а из-за возможности учесть изменения в немажорных аллелях с помощью индекса Тейла.

Одинаково хорошо все индексы отражают ситуацию в стаде швицкой породы, где несмотря на высокую выравненность частот, малое количество аллелей снижает уровень биоразнообразия.

Предпочтительным при сравнении различных популяций между собой является использование индексов с большими значениями и максимально варьирующими между собой. Такие индексы обладают большей «разрешающей способностью» и будут применимы для самых разнообразных вариантов.

С учетом изложенного выше и данных статистики, наиболее универсальными для применения оказались индексы Тейла и индекс, предложенный Топтиковым с соавторами К_Д. Недостатком применения индекса Тейла является его низкая вариабельность.

Однако следует сказать, что применение того или иного индекса в конечном счете зависит от конкретных объектов. Так, индекс Симпсона хорошо позволяет сравнивать изменения в мажорных аллелях популяции, а индекс Шеннона больше чувствителен к колебаниям распределения. В то же время применение индекса Шеннона затруднено при сравнении систем с примерно одинаковым характером распределения. Индекс Бриллюэна дает более достоверные результаты, когда выборка является малорепрезентативной. Индекс Тейла позволяет учесть изменения в том

числе в распределении минорных аллелей. Индекс Пиелу рассчитывает выровненность.

Универсальным методом оценки разнообразия является построение кривых значимости (рисунок 40). Однако, как видно из рисунка, сложно сравнивать одновременно большое количество похожих популяций.

Среди изученных стад наибольшим разнообразием характеризуется стадо черно-пестрой породы г. Жирятино. Это логично сочетается с тем фактом, что данное стадо представляет собой совокупность коров из частных подворий. В этом стаде отсутствует направленная селекционная работа, и оно не является чистопородным.

Наименьшее разнообразие выявлено в стаде айрширской породы, что может быть связано с тем, что коровы этой породы были завезены из Финляндии несколько лет назад, и для осеменения частично могут использоваться быки, выращенные в этом же хозяйстве, что приводит к сужению аллельного разнообразия и накоплению гомозигот по мажорным аллелям.

Таким образом, доказана возможность использования индексов разнообразия для оценки биоразнообразия аллелей в популяции. В качестве индикаторного гена можно использовать любой высокополиморфный ген, такой к примеру, как BoLA-DRB3, с помощью которого возможно измерить биоразнообразие популяции в целом. Числовые значения удобны в практическом применении и отражают генетический потенциал популяции в целом, складывающийся из устойчивости к меняющимся внешним факторам и продуктивности. Использование индексов биоразнообразия может быть применено для сравнения генетического потенциала популяций, планирования селекционной работы, в целях мониторинга и в борьбе с обеднением генофондов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы:

1. В выборке, состоящей из 626 коров черно-пестрой (4 популяции n=381), симментальской (n=100), швицкой (n=40), айрширской (n=51), красно-пестрой (n=29) пород, разводимых в Брянской области, выявлено 37 BoLA-DRB3 ПДРФ-типа, вариабельность частоты встречаемости которых составила 15-27%.

2. Установлено, что наибольшее разнообразие (27 и 25 аллелей) характерно для симментальской (СХПК «Большевик»), черно-пестрой пород (частное стадо г. Жирятино), наименьшее (по 16 аллелей) – для популяции черно-пестрой (СПК «Агрофирма «Культура») и айрширской пород.

3. В исследуемых выборках коров наблюдается отклонение закона Харди-Вайнберга за счет преобладания гомозигот и недостатка гетерозигот, что наиболее характерно для выборки коров айрширской, швидской и симментальской пород.

4. Распределение частоты аллелей BoLA-DRB3, ассоциированных с устойчивостью и восприимчивостью к вирусу лейкоза в изучаемых стадах крупного рогатого скота неодинаково. Суммарная концентрация аллелей чувствительных к вирусу лейкоза (*8, *16, *22, *24) в стадах черно-пестрой породы (СПК «Агрофирма «Культура» и ОАО «Новый путь») составила 54,3 и 44,1%, устойчивых (*11, *23, *28) – 22,4; 23% соответственно. В стадах этой же породы, разводимой в ООО «Снежжа-Госома» и Жирятино, доля устойчивых аллелей составила 34,4; 22,2%, восприимчивых – 29,4; 19,8% соответственно.

5. Исследование аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 у больных коров черно-пестрой породы подтверждает ранее открытую зависимость: низкий уровень аллелей устойчивости *11, *23, *28 и высокий уровень аллелей чувствительности к лейкозу – *8, *16, *22, *24 коррелирует с заболеваемостью животных лейкозом.

6. На основе матрицы генетического сходства между изучаемыми популяциями, с учетом аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 четко обозначились два кластера: I – черно-пестрый скот, II – шведская и айрширская породы.

7. Установлен высокий межпопуляционный полиморфизм гена BoLA-DRB3 в черно-пестрой породе. Величина генетических дистанций по Неи между популяциями достигла 0,13, что сопоставимо с дистанцией между разными породами, например, швицкой и айрширской.

8. Математическая оценка биоразнообразия аллелей в различных хозяйствах проведенная с помощью десяти индексов, выявила, что наиболее универсальным оказались индексы Бриллюэна (НВ), Тейла (RT) и Топтикова (Kd). Индекс Пиелу (E) учитывает выровненность распределения, а индекс Бергера-Паркера (1/d) в большей мере отражает характер доминирования аллелей.

9. Ввиду наличия очень большого числа возможных аллелей и высокого уровня полиморфизма ген BoLA-DRB3 может быть использован для оценки общего генетического разнообразия пород крупного рогатого скота и их генетического сходства.

Предложения производству

Метод определения аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 предлагается использовать в племенной работе и при разведении крупного рогатого скота в племенных и товарных хозяйствах.

Для повышения генетической устойчивости стада к лейкозу предлагается:

– насыщать стада аллелями гена BoLA-DRB3, определяющими устойчивость к вирусу лейкоза, за счет использования в разведении носителей гомозигот по аллелям *11, *23, *28;

– снижать долю аллелей чувствительности к вирусу лейкоза и проводить постепенное замещение особей, гомозиготных по аллелям *8, *16, *22, *24;

– сохранять пул нейтральных аллелей, что повышает общую устойчивость поголовья к различным заболеваниям.

Для оценки генетического полиморфизма и биоразнообразия популяции, стад пород крупного рогатого скота целесообразно использовать ген BoLA-DRB3 и математические индексы Бриллюэна (НВ), Тейла (R_T) и Топтикова (Kd).

Перспективы дальнейшей разработки темы

Результаты дальнейших исследований могут быть интересны, как в теоретическом, так и в практическом плане. В перспективе планируется широкое использование данных ДНК-диагностики в селекционно-племенной работе с целью насыщения стад крупного рогатого скота аллелями устойчивости к лейкозу, путем целенаправленного подбора родительских пар.

Список литературы

1. Администрация Брянской области. Постановление от 21.07.2003 №309 (ред. от 02.03.2005). Об утверждении целевой программы оздоровления крупного рогатого скота от заболевания лейкозом в Брянской области на 2002-2006 годы [электронный ресурс]. – Режим доступа: http://bryansk.news-city.info/docs/sistemsas/dok_leyazz.htm.
2. Аксёнова, Е.Н. Анализ генетического разнообразия крупного рогатого скота разных пород Брянской области по гену BoLA-DRB3, кодирующему устойчивость КРС к лейкозу / Е.Н. Аксёнова, А.Л. Козлов, И.А. Смазнова // Материалы Международной практической конференции [«Трансфер инновационных биотехнологий в растениеводстве, животноводстве, медицине, экологии»]. – Брянск. – 2012. – С. 7-10.
3. Бусол, Л.В. Ветеринарно-санитарные проблемы и медико-социальное значение лейкоза крупного рогатого скота [Электронный ресурс] / Л.В. Бусол, Л.В. Коваленко, Т.Г. Тонська // Современные направления теоретических и прикладных исследований 2012: материалы международной научно-практической интернет-конференции. – 2012. – Режим доступа: <http://www.sworld.com.ua/konfer26/794.pdf>.
4. Всемирная организация здравоохранения животных: [электронный ресурс]. URL: <http://www.oie.int>.
5. Генджиева, О.Б. Сравнительный анализ распространения лейкоза крупного рогатого скота и злокачественных новообразований людей на территории РК [Текст] / О.Б. Генджиева, М.И. Гулюкин // Ветеринарная патология. 2009. – № 3. – С. 15 – 18.
6. Гладырь, Е.А. Молекулярные методы в диагностике заболеваний и наследственных дефектов сельскохозяйственных животных [Текст] / Е.А. Гладырь, Н.А. Зиновьева, Л.К. Эрнст, О.В. Костюнина, А.С. Быкова, А.Д. Банникова, Е.П. Кудина, Г. Брем // Зоотехния. – 2009. – № 8. С. 26 – 28.
7. Гладырь, Е.А. Молочная продуктивность коров в зависимости от инфицированности вирусом лейкоза и генотипа по BoLA-DRB3 [Текст] / Е.А.

Гладырь, Н.А. Зиновьева, А.С. Быкова, И.В. Виноградова, Л.К. Эрнст // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – № 8. – С. 46 – 49.

8. Гулюкин, М.И. Пути передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / М.И. Гулюкин, А.В. Васин, Н.В. Замараева // Ветеринария. – 1990. – №1. – С. 27 – 31.

9. Гулюкин, М.И. Роль молока и крови в распространении вируса лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / М.И. Гулюкин, Н.И. Снежков, В.Н. Снежкова, А.В. Васин // Бюллетень ВИЭВ. – 1991. – Т.70. – С. 14 – 16.

10. Гулюкин, М.И. Эпизоотологическая оценка методов прижизненной диагностики лейкоза КРС [Текст] / М.И. Гулюкин, Е.А. Дун, Н.В. Замараева, Н.В. Баркова, Н.И. Петров // Вестник РАСХН. – 2000. – №3. – С. 60 – 62.

11. Гулюкин, М.И. Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Российской Федерации [Текст] / М.И. Гулюкин, Л.А. Иванова, Н.А. Замараева, Г.А. Симонян, К.П. Грек, В.В. Храмцов, А.С. Донченко // Ветеринарная газета. – 2002. – №10. – С. 4 – 5.

12. Гулюкин, М.И. Особенности инфекционного процесса лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / М.И. Гулюкин, В.М. Нахмансон, Н.И. Петров, С.В. Лопунов // Ветеринария и кормление. – 2005. – № 6. – С. 12 – 13.

13. Гулюкин, М.И. Экспериментальное заражение кроликов вирусом лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / М.И. Гулюкин, Л.А. Иванова, Е.А. Шишкина, А.В. Шишкин, Л.Б. Прохвятилова // Ветеринария. – 2008. – № 11. – С. 23 – 27.

14. Джупина, С.И. Эпизоотический процесс и его контроль при факторных инфекционных болезнях [Текст] / С.И. Джупина. – М.: РУДН, 2002. – 212 с.

15. Дроздов, Е.В. Полиморфизм генов, связанных с молочной продуктивностью крупного рогатого скота [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07 / Дроздов Евгений Владимирович. – Пушкин. – 2013. – 128 с.

16. Зиновьева, Н.А. Перспективы использования молекулярной генной диагностики с. - х. животных [Текст] / Н.А. Зиновьева, Е.А. Гладырь // Сб. мат. междунар. научн. конф. «ДНК-технологии в клеточной инженерии и маркировании признаков с. - х. животных». – 2001. – С. 44 – 49.

17. Измestьев, С.В. Влияние антигенов главного комплекса гистосовместимости на заболеваемость лейкозом у коров айрширской и черно-пестрой пород [Текст]: дис. ... канд. биол. наук : 06.02.01 / Измestьев Сергей Викторович. – М., 2006. – 127 с.

18. Ковалюк, Н.В. Селекционно-генетический способ создания высокопродуктивного и устойчивого к персистентному лимфоцитозу крупного рогатого скота [Текст] / Н.В. Ковалюк, В.А. Шостак, В.Ф. Сацук, Д.В. Фоменко // Вестник РАСХН. – 2005. – № 6. – С. 67 – 69.

19. Ковалюк, Н.В. Молекулярно-генетические аспекты в селекции и ранней диагностике лейкоза крупного рогатого скота [Текст]: дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.23 / Ковалюк Наталья Викторовна. – Краснодар. – 2008. – 174 с.

20. Ковалюк, Н.В. Система селекционно-диагностических мероприятий для эффективного оздоровления стад от лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Н.В. Ковалюк, В.Ф. Сацук, А. Марков, В. Пищулина // Молочное и мясное скотоводство. – 2010. – № 5. – С. 25 – 31.

21. Ковалюк, Н.В. Выявление возможных причин и последствий распространения отдельных аллельных вариантов локуса BoLA-DRB3 в группах голштинского и айрширского скота [Текст] / Н.В. Ковалюк, В.Ф. Сацук, А.В. Матвиец, Е.В. Мачульская // Генетика. – 2010. – № 3. – С. 429 – 432.

22. Ковалюк, Н.В. Изменчивость гена BoLA-DRB3 у крупного рогатого скота молочного направления продуктивности и его влияние на параметры жизнеспособности [Текст] / Н.В. Ковалюк, В.Ф. Сацук, А.Е. Волченко // Генетика. – 2012. – № 8. – С. 962 – 965.

23. Кожевина, О.А. Изучение генетической устойчивости к лейкозу крупного рогатого скота методом ПЦР-ПДРФ: на примере популяции КРС

Брянской области / О.А. Кожевина, И.А. Смазнова, А.Л. Козлов, В.В. Заякин, И.Я. Нам // Сборник трудов первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». – Санкт-Петербург. – 2010. – С. 249-251.

24. Козлов, А.Л. Анализ полиморфизма гена BoLA-DRB3 у симментальской породы крупного рогатого скота / А.Л. Козлов, И.А. Смазнова, В.В. Заякин, И.Я. Нам // Известия Самарского научного центра Российской академии наук – 2011. – Том 13. – №5 (3). – С. 248-250.

25. Козлов, А.Л. Применение метода ПЦР-ПДРФ для выявления генетической устойчивости к лейкозу некоторых пород крупного рогатого скота Брянской области / А.Л. Козлов, В.В. Заякин, И.Я. Нам // Материалы научно-практической конференции. Брянск: НОЧУ «Центр бизнес-образования». – 2011. – С. 64-66.

26. Кузин, А.И. Влияние лейкоза на продуктивность коров и качество молока [Текст] / А.И. Кузин, Е.Н. Закрепина // Ветеринария. – 1997. – № 2. – С. 19 – 21.

27. Кукайн, Р.А. Выявление онкорнавируса типа С у крупного рогатого скота со спонтанным и экспериментально производимым лимфолейкозом [Текст] / Р.А. Кукайн, Л.И. Нагаева, С.В. Чапоненко // Вопросы онкологии. – 1973. – Т. 19. – С. 44 – 49.

28. Кукайн, Р.А. Вирус лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Р.А. Кукайн, Л.И. Нагаева, В.П. Ложа. – Рига: Зинатне, 1982. – 175с.

29. Масленников, М.Г. Использование генотипирования по локусу BoLA DRB 3 в селекции крупного рогатого скота на устойчивость к персистентному лимфоцитозу [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Масленников Михаил Геннадьевич. – Краснодар. – 2005. – 91 с.

30. Моисеева, И.Г. Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России [Текст] / И.Г. Моисеева, С.В. Уханов, Ю.А. Столповский, Г.Е. Сулимова, С.В. Каштанов; отв. Редактор – И.А. Захаров. – М.: Изд-во «Наука», 2006. – 478 с.

31. Москалик, Р.С. Сывороточные и колостральные анти-ВЛКРС антитела у больных лейкозом коров [Текст] / Р.С. Москалик // Лейкозы крупного рогатого скота. – М.: Колос, 1985. – С. 33 – 36.
32. Мэгарран, Э. Экологическое разнообразие и его измерение [Текст] / Э. Мэгарран. – М.: Мир, 1992. – 184 с.
33. Нам, И.Я. Генетическая предрасположенность к лейкозу у больных коров черно-пестрой породы Брянской области / И.Я. Нам, В.В. Заякин, А.Л. Козлов, И.А. Смазнова, Р.Б. Ахмедов, М.С. Кобозева // Материалы I Евразийской научно-практической конференции «Инновационные агробiotехнологии в животноводстве и ветеринарной медицине», С-Петербург. – 2015. – С. 52-55.
34. Нахмансон, В.М. Лейкоз крупного рогатого скота [Текст] / В.М. Нахмансон. – М.: Россельхозиздат, 1986. – 220 с.
35. Нахмансон, В.М. Использование коров, зараженных вирусом лейкоза крупного рогатого скота, в системе противолейкозных мероприятий [Текст] / В.М. Нахмансон, Е.А. Дун, Л.Г. Бурба // Ветеринария. – 1995. – № 1. – С.8 – 11.
36. Неофициальный перевод Disease Information [электронный ресурс]. – Всемирная организация здравоохранения животных. – 2011. Том 24. – № 14 – Режим доступа: ftp://ftp.oie.int/infos_san_archives/rus/2011/ru_110407v24n14.pdf.
37. Опанасюк, А.С. Пренатальная передача вируса лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / А.С. Опанасюк, П.Н. Смирнов // Диагностика и профилактика инфекционных болезней животных. – 1989. – С. 77 – 78.
38. Пианка, Э. Эволюционная экология [Текст] / Э. Пианка. – М.: Мир, 1981. – 400 с.
39. Сацук, В.Ф. Использование маркера VOLA-DRB3 в селекционно-племенной работе с крупным рогатым скотом [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 06.02.01 / Сацук Владимир Федорович. – Ставрополь. – 2009. – 118 с.

40. Сацук, В.Ф. Влияние «скрытого» селекционного инбридинга на хозяйственно полезные признаки скота [Текст] / В.Ф. Сацук, А. Матвиец, Н.В. Ковалюк // Молочное и мясное скотоводство. – 2010. – № 7. – С. 10 – 12.
41. Симонян, Г.А. Ветеринарная гематология [Текст] / Г.А. Симонян, Ф.Ф. Хисамутдинов. – Колос, 1995. – 256 с.
42. Симонян, Г.А. Искоренение лейкоза – залог сохранения генофонда [Текст] / Г.А. Симонян // Животноводство России. – 2007. – № 4 – С. 2 – 4.
43. Симонян, Г.А. Современные методы борьбы с лейкозом крупного рогатого скота и устранение экономического ущерба [Текст] / Г.А. Симонян // Ветеринария. – 2011. – № 9. – С. 3 – 8.
44. Смазнова, И.А. Аллельный анализ гена BoLA-DRB3 в стадах крупного рогатого скота Брянской области / И.А. Смазнова, А.Л. Козлов, В.В. Заякин, И.Я. Нам // Вестник Брянского государственного университета. – 2010. – Т. 4. – С. 227-232.
45. Смазнова, И.А. Полиморфизм гена BoLA-DRB3 у коров разных пород Брянской области / И.А. Смазнова, И.Я. Нам, В.В. Заякин, А.Л. Козлов // Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции «Научное обеспечение инновационного развития животноводства». – Жодино. – 2013. – С. 144-146.
46. Смирнов, П.Н. Пути передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / П.Н. Смирнов, А.В. Кисилев, А.Т. Левашев, В.В. Смирнова, В.В. Замцов // Диагностика лейкоза крупного рогатого скота. – 1988. – Вып. 2. – С. 3 – 10.
47. Смирнов, Ю.П. Лейкоз крупного рогатого скота в Нечерноземной зоне РФ [Текст]: дис. ... д-ра вет. Наук: 16.00.03 / Смирнов Юрий Петрович. – СПб., 1995. – 386 с.
48. Сулимова, Г.Е. ДНК-полиморфизм гена BoLA-DRB3 у крупного рогатого скота в связи с устойчивостью и восприимчивостью к лейкозу [Текст] / Г.Е. Сулимова, И.Г. Удина, Г.О. Шайхаев, И.А. Захаров // Генетика. – 1995. – Т.31. – С.1294 – 1299.

49. Топтиков, В.А. Оценка спектров множественных форм ферментов с помощью показателя уровня внутреннего разнообразия системы [Текст] / В.А. Топтиков, Л.Ф. Дьяченко, В.Н. Тоцкий // Цитология и генетика. – 2010. – №1. – С. 46 – 53.

50. Туркова, С.О. Полиморфизм генов *BoLA-DRB3*, пролактина и гормона роста у крупного рогатого скота в связи с устойчивостью к лейкозу и молочной продуктивностью [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Туркова Светлана Олеговна. – М., 2003. – 105 с.

51. Удина, И.Г. Гены главного комплекса гистосовместимости человека и животных [Текст] / И.Г. Удина // Успехи современной генетики. – 1994. – Вып. 19. – С. 133 – 177.

52. Удина, И.Г. Сравнительный анализ айрширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота по маркерам гистосовместимости [Текст] / И.Г. Удина, Е.Е. Карамышева, Г.Е. Сулимова, С.П. Павленко, С.О. Туркова, А.Р. Орлова, Л.К. Эрнст // Генетика. – 1998. – № 12. – С. 1 – 7.

53. Удина, И.Г. Полиморфизм гена пролактина (микросателлиты, ПЦР-ПДРФ) у крупного рогатого скота [Текст] / И.Г. Удина, С.О. Туркова, М.В. Костюченко, Л.А. Лебедева, Г.Е. Сулимова // Генетика. – 2001. – № 4. – С.511 – 516.

54. Удина, И.Г. Генетические механизмы устойчивости и чувствительности к лейкозу у айрширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота, установленные на основе распределения аллелей гена *BoLA-DRB3* [Текст] / И.Г. Удина, Е.Е. Карамышева, С.О. Туркова, А.Р. Орлова, Г.Е. Сулимова // Генетика. – 2003. – № 3. – С. 383 – 396.

55. Хусаинов, Р.Ф. Колостральный иммунитет и внутриутробное инфицирование телят вирусом лейкоза от коров - матерей с различной степенью выраженности инфекционного процесса [Текст]: автореферат дис. ... канд. биол. наук: 16.00.03 / Хусаинов Руслан Фанилевич. – Уфа. – 2009. – 22 с.

56. Шарифуллина, Н.М. Полиморфизм гена *BoLA-DRB3* в связи с устойчивостью и восприимчивостью к лейкозу крупного рогатого скота

черно-пестрой и симментальской пород в условиях Республики Башкортостан [Текст]: дис. ... канд. с.-х. наук : 06.02.01 / Шарифуллина Наиля Мусагитовна. – Уфа. – 2005. – 111 с.

57. Шитиков, Г.С. Оценка биоразнообразия: попытка формального обобщения [Текст] / Г.С. Шитиков, В.К. Розенберг; отв. ред. чл.-корр. РАН Г. С. Розенберг // Структурный анализ экологических систем. Количественные методы экологии и гидробиологии (Сборник научных трудов, посвященный памяти А.И. Баканова). – Тольятти: СамНИЦ РАН, 2005. – С. 91 – 129.

58. Шишков, В.П. Использование микроносителей для получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / В.П. Шишков, Е.А. Михалева, М.А. Завальный // Вестник с.-х. науки. – 1986. – № 11. – С. 118 – 121.

59. Шишков, В.П. Лейкозы и злокачественные опухоли животных [Текст] / В.П. Шишков, Л.Г. Бурба. – М.: Агропромиздат, 1988. – 301с.

60. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации (2008 год) [электронный ресурс] // Информационно Аналитический Центр РСХН ФГБУ «ВНИИЗЖ». – 2008. – Режим доступа: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2008/files/iac2008.pdf>.

61. Эпидситуация в мире: сопредельные страны и торговые партнеры РФ: январь – декабрь 2013 [электронный ресурс] // Информационно Аналитический Центр РСХН ФГБУ «ВНИИЗЖ». – 2013. – Режим доступа: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/foreign/2013/dec/partners.pdf>.

62. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации (2013 год) [электронный ресурс] // Информационно Аналитический Центр РСХН ФГБУ «ВНИИЗЖ». – 2013. – Режим доступа: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2013/files/iac2013.pdf>.

63. Эрнст, Л.К. Новые аспекты селекции крупного рогатого скота на устойчивость к лейкозу [Текст] / Л.К. Эрнст, В.П. Шишков // Сельскохозяйственная биология. – 1984. – №2. – С. 96 – 104.

64. Эрнст, Л.К. Особенности распространения антигенов BoLA-DRB3 у черно-пестрого скота в связи с ассоциацией с лейкозом [Текст] / Л.К.

Эрнст, Г.Е. Сулимова, А.Р. Орлова, И.Г. Удина, С.П. Павленко // Генетика. – 1997. – №1. – С. 87 – 95.

65. Эрнст, Л.К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке [Текст] / Л.К. Эрнст, Н.А. Зиновьева. – М.: РАСХН, 2008. – 501 с.

66. Якушева, Л.И. Совершенствование генетической структуры стада крупного рогатого скота по локусу BoLA DRB 3 как фактор оздоровления от лейкоза [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 06.02.07 / Якушева Людмила Ивановна. – Ставрополь, 2012. – 109 с.

67. Alexander, J.A. Analysis of equine lymphocyte antigen system by Southern blot hybridization [Text] / J.A. Alexander, E. Bailey, J. Woodward // Immunogenetics. – 1987. – V. 25. – P. 47-54.

68. Amorena, B. Serologically defined SD locus in cattle [Text] / B. Amorena, W.H. Stone // Science. – 1978.1. – V. 201. – P. 159–160.

69. Andersson, L. Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions [Text] / L. Andersson, A. Lunden, S. Sigurdottir, Ch. J. Davies, L. Rask // Immunogenetics. – 1988. – V. 27. – P. 273–280.

70. Auffray, C. Molecular genetics of the human major histocompatibility complex [Text] / C. Auffray, J.L. Strominger // Adv. Hum. Genet. – 1986. – V. 15. – P. 197–247.

71. Beever, J.E. Report of the First Workshop on the Genetic Map of Bovine Chromosome 23 [Text] / J.E. Beever, H.A. Lewin, W. Barendse, L. Andersson, S.M. Armitage, C.W. Beattie, B.M. Burns, S.K. Davis, S.M. Kappes, B.W. Kirkpatrick, R.Z. Ma, R.A. McGraw, R.T. Stone, J.F. Taylor // Animal Genetics. – 1996. – V. 27. – P.69–75.

72. Berry, D.P. Genetics of animal health and disease in cattle [Text] / D.P. Berry, M.L. Bermingham, M. Good, S.J. More // Irish Veterinary Journal. – 2011. – V. 64. – P. 5.

73. Botstein, D Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [Text] / D. Botstein, R.L. White, M. Skolnick, R.W. Davis // Am J Hum Genet. – 1980. – V. 32(3). – P. 314–331.

74. Briles, W.E. Marker s disease resistance in chicken affected by complementation of B alloalleles in a cross of commercial parent stocks [Text] / W.E. Briles, R.W. Briles, D.L. Pollock, M. Petrison // *Anim. Blood Grps. and Biochem. Genet.* – 1980. – №. – 11, Suppl.1. – P. 14.
75. Brillouin, L. Science and information theory [Text] / L. Brillouin – New York: Academic Press, 1956. – 320 p.
76. Caldwell, J. Serologically detected limphocyte antigens in Holstein cattle [Text] / J. Caldwell, C.F. Brayn, P.A. Cumferland, D.F. Weseli // *Anim. Blood. Grps. Biochem. Genet.* – 1977. – V. 8. – P. 197 – 207.
77. Cameron, P.U. Consirvation of central MHC genome: PFGE mapping and RFLP analysis of complement, HSP70, and TNF genes in the goat [Text] / P.U. Cameron, H.A. Tabarais, B. Pulendran, W. Robinson, R.L. Dawkins // *Immunogenetics.* – 1990. – V. 31. – P. 253 – 264.
78. Capparelli, R. et al. Protective Effect of the Nramp1 BB Genotype against *Brucella abortus* in the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) [Text] / R. Capparelli, F. Alfano, M.G. Amoroso, G. Borriello, D. Fenizia, A. Bianco, S. Roperto, F. Roperto, D. Iannelli // *Infect. Immun.* February. – 2007. – V. 75. – № 2. – P. 988 – 996.
79. Chevenet, F. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees [Text] / F. Chevenet, C. Brun, A.L. Banuls, B. Jacq, R. Chisten // *BMC Bioinformatics.* –2006. – № 7. – P. 439.
80. Croshaw, Jr. J. E. Pedigree studies in bovine lymphosarcoma [Text] / Jr. J.E. Croshaw, D.A. Abt, R.R. Marshak, W.C. D. Hare, J. Switzer, J. Ipsen, R.M. Dutcher // *Ann N Y Acad Sci.* – 1963. – № 4. – P. 1193 – 1202.
81. Davies, C.J. Polymorphism of bovine MHC class I genes [Text] / C.J. Davies, I. Joosten, D. Bernoco, M.A. Arriens, J. Bester, G. Ceriotti, S. Ellis, E.J. Hensen, H.C. Hines, P. Horin // *Eur J Immunogenet.* – 1994. – V. 21. – № 4. – P. 239 – 258.
82. Davies, C.J. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the IS AG BoLA Nomenclature Committee [Text] / C.J. Davies, L. Andersson, S.A. Ellis // *Animal Genetics.* – 1997. – V. 28. – P. 159 – 168.

83. Dereeper, A. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist [Text] / A. Dereeper, V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J.F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J.M. Claverie, O. Gascuel // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – № 36. – P. 465 – 469.
84. Deverson, E.V. Class II major histocompatibility complex genes of the sheep [Text] / E.V. Deverson, H. Wright, S. Watson, K. Ballingall, N. Huskisson, A.G. Diamond, J.C. Howard // *Animal Genetics.* – 1991. – V. 22. – P. 211 – 227.
85. Elias, I. Fast computation of distance estimators [Text] / I. Elias, J. Lagergren // *BMC Bioinformatics.* – 2007. – № 8. – P. 89.
86. Felsenstein, J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2) [Text] / J. Felsenstein // *Cladistics.* – 1989. – № 5. – P. 164 – 166.
87. Ferrer, J.F. Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma [Text] / J.F. Ferrer, R.R. Marshak, D.A. Abt, S.J. Kenyon // *Annals of Veterinary Research.* – 1978. – V. 9. – № 4. – P. 851 – 857.
88. Ferrer, J.F. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: a review [Text] / J.F. Ferrer, R.R. Marshac, D.A. Abt // *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* – 1979. – V. 175. – P. 705 – 708.
89. Figueroa, F. Class II MHC genes in rodent evolution [Text] / F. Figueroa, J. Gutknecht, H. Tyichy, J. Klein // *Immunological reviews.* – 1990. – V. 113. – P. 27 – 46.
90. Flajnik, M.F. The major histocompatibility complex of frogs [Text] / M.F. Flajnik, L.D. Pasquier // *Immunological Reviews.* – 1990. – № 113. – P. 47 – 64.
91. Gascuel, O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data [Text] / O. Gascuel // *Mol Biol. Evol.* – 1997. – № 7. P. 685 – 695.
92. Gelhaus, A. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles [Text] / A. Gelhaus, L. Schnittger, D. Mehlitz, R.D. Horstmann, C.G. Meyer // *Animal Genetics.* – 1995 – V. 26(3). – P. 147.

93. Germain, R.N. MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding [Text] / R.N. Germain, L.R. Hendrix // *Nature*. – 1991. – V. 12. – № 6340. – P. 134 – 139.
94. Giles, R.C. Structure, function, and genetics of human class II molecules [Text] / R.C. Giles, J.D. Capra // *Adv Immunol.* – 1985. – № 37. – P. 1 – 71.
95. Gorer, P.A. The detection of antigenetic differences in mouse erythrocytes by the employment of the immune sera [Text] / P.A. Gorer // *British. Exp. Pathol.* – 1936. – Vol. 17. – P. 42 – 50.
96. Groenen, M.A.M., Cloning of the bovine major histocompatibility complex class II genes [Text] / M.A.M. Groenen, J.J. van der Poel, R.J.M. Dijkhof, M.J. Giphart // *Animal genetics*. – 1989. – V. 20. – P. 267-268.
97. Heaton, M. P. DNA markers developed to improve food beef quality [Electronic resource] / M.P. Heaton // *Cattle Today*. – 2006. – URL: <http://www.cattletoday.com/archive/2006/October/CT658.shtml>.
98. Hirsch, F. Class II genes of miniature svine.III. Characterisation of an expressed pig class II gene homologous to HLA-DQA [Text] / F. Hirsch, D. Sachs, K. Gustafsson, K. Pratt, S. Germana, C. LeGuern // *Immunogenetics*. – 1990. – V. 31. – P. 52 – 56.
99. Hoss, H.E. Infectivity of bovine C-type (leukemia) virus for sheep and goats [Text] / H.E. Hoss, C. Olson. // *Amer. J. Veterinary Research*. – 1974. – Vol. 35. – № 5. – P. 633 – 637.
100. Juliarena, M.A. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene [Text] / M.A. Juliarena, M. Poli, L. Sala, C. Ceriani, S. Gutierrez, G. Dolcini, E.M. Rodriguez, B. Marino , C. Rodriguez-Dubra, E.N. Esteban // *Animal genetics*. – 2008. – V. 39. – P. 432 – 439.
101. Kabeya, H. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection [Text] / H. Kabeya, K. Ohashi, M. Onuma. // *J. Vet. Med. Sci.* – 2001. – V. 63. – № 7. – P. 703 – 708.

102. Kaufman, J. The MHC molecules of nonmammalian vertebrates [Text] / J. Kaufman, K. Skjoedt, J. Salmonsén // Immunological reviews. – 1990. – № 113. – P. 83 – 118.

103. Kettmann, R. Restriction endonuclease mapping of linear unintegrated proviral DNA of bovine leukemia virus [Text] / R. Kettmann, D. Couez, A. Burny. // J. Virol. – 1981. – V. 38. – P. 27 – 33.

104. Kroemer, G. Molecular genetics of the chicken MHC: current status and evolutionary aspects [Text] / G. Kroemer, A. Bernot, G. Behar, A.M. Chausse, L.N. Gastinel, F. Guillemot, I. Park, P. Thorava, R. Zoorob, C. Auffray // Immunol. Review. – 1990. – V. 113. – P. 119 – 145.

105. Krutovskii, K.V. Forest genomics for conserving adaptive genetic diversity [Electronic resource] / K.V. Krutovskii, D. B. Neale // Forest genetic resources working papers : Forestry department food and agriculture organization of the United Nations. – 2001. – URL: <http://www.fao.org/docrep/003/X6884E/X6884E00.HTM>

106. Lewin, H.A. Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection [Text] / H.A. Lewin, D. Bernoco // Animal Genetics. – 1986. – V. 17. – № 3. – P. 197 – 207.

107. Lewin, H.A. Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows [Text] / H.A. Lewin, M.C. Wu, J.A. Stewart, T.J. Nolan // Immunogenetics. – 1988. – V. 27. – P. 338.

108. Lewin, H.A. Host genetic mechanism of resistance and susceptibility to a bovine retroviral infection [Text] / H.A. Lewin // Animal Biotechnology. – 1994. – V 5. № 2. – P. 183 – 191

109. Lewin, H.A. Genomic Organisation Of The Mhc: Structure, Origin and Function [Text] / H.A. Lewin; G.C. Russell; E.J. Glass // Immunol. Rev. – 1999. – V. 167. – P. 145 – 158.

110. Lewontin, R.C. The apportionment of human diversity [Text] / R.C. Lewontin // Evolutionary Biology. – New York : Appleton-Century-Crofts. – 1972. V. 6. – P. 381 – 398.

111. Licursi, M. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts [Text] / M. Licursi, Y. Inoshima, D. Wu, T. Yokoyama, E. Gonzalez, H. Sentsui. // *Virus Research*. – 2002. – V. 86. – P. 101 – 110.
112. MacArthur, R.H. Fluctuations of animal populations, and measure of community stability [Text] / R.H. MacArthur // *Ecology*. – 1955. V. 36. – № 7. – P. 353 – 356.
113. Maillard, J.C. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles [Text] / J.C. Maillard, C. Renard, P. Chardon, I. Chantal, A. Bensaid // *Animal Genetics*. – 1999. – V. 30 – P. 200 – 203.
114. Mammerickx, M. Experimental cross-transmissions of bovine leukemia virus (BLV) between several animal species [Text] / M. Mammerickx, D. Portetelle, A. Burny. // *Zbl. Veterinarmed.* – 1981. – V. 28. – № 1. – P. 69 – 81.
115. Margalef, R. Information theory in ecology [Text] / R. Margalef // *Gen. Syst.* – 1958. – №3. – P. 36 – 71.
116. Miller, J.M. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with referent to bovine lymphosarcoma [Text] / J.M. Miller, L.D. Miller, C. Olson, K.G. Gillette // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1969 – V. 43. – P. 1297 – 1305.
117. Mirsky, M.L. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle [Text] / M.L. Mirsky, C. Olmstead, Y. Da, H.A. Lewin // *Anim Genet.* – 1998 – V. 29. P. 245 – 252.
118. NAHMS-USDA. Bovine Leukosis Virus on U.S. Dairy Operations : Info sheet [Text] / National Animal Health Monitoring System U.S. Department of Agriculture. – 2008.
119. Nam, I.Ya. The genetic polymorphism of BoLA-DRB3 gene and the resistance to virus leukemia in different herds of cattle at Bryansk region / I.Ya. Nam, V.V. Zayakin, I.A. Smaznova, A.L. Kozlov, R.B. Achmedov, M.S. Kobozeva // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2015. – №6 (1). – P. 1903-1907.

120. Nei, M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals [Text] / M. Nei // *Genetics*. – 1978. – V. 89. – P. 583 – 590.
121. O'Brien, S.J., Molecular genome mapping: lessons and prospects [Text] / S.J. O'Brien // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 1991. V. – 1. P. 105 – 111.
122. Palmer, C. Susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection associated with BoLA type [Text] / C. Palmer, M. Thurmond, J. Picanso, A. Brewer, D. Bemoco // *Proceedings of the 91st Annual Meeting of US Animal Health Association*. – Salt Lake City. – 1987. – P. 218 – 228.
123. Panei, C.J. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected Cattle in argentina [Text] / C.J. Panei, K. Suzuki, M.G. Echeverria, M.S. Serena // *International Journal of Dairy Science*. – 2009. – V. 4. – P. 123 – 128.
124. Pielou, E.C. Shannon's formula as a measure of species diversity: its use and misuse [Text] / E.C. Pielou // *Amer. Natur.* – 1966. – V. 100. – P. 463 – 465.
125. Pielou, E.C. *Ecological Diversity* [Text] / E.C. Pielou. – NY. : Gordon & Breach Sci. Publ., 1975. – 165 p.
126. Rask, L. Parsimony analysis of mammalian class II histocompatibility genes [Text] / L. Rask, L. Andersson, K. Gustafsson, A.K. Jonsson // *Immunol. Rev.* – 1990. – V. 113. – P. 187 – 206.
127. Roberts, D.H. Herd eradication of enzootic bovine leucosis [Text] / D.H. Roberts, S. Bushnell // *Veterinary Record*. – 1982. V. 111. – P. 487 – 492.
128. Sarmiento, U.M. Nucleotide sequence of a dog DRB cDNA clone [Text] / U.M. Sarmiento, R. Storb // *Immunogenetics*. – 1990. – V. 31. – P. 396 – 399.
129. Schulz, A.M. The envelope proteins of bovine leukemia virus: purification and sequence analysis [Text] / A.M. Schulz, T.D. Copeland, S. Oroszlan. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. – 1985. – V. 82. – № 3. – P. 677 – 681.
130. Schwartz, I. Pathobiology of bovine leukemia virus [Text] / I. Schwartz, D. Levy // *Veterinary Research*. – 1994. – V. 25. – P. 521 – 536.

131. Scott, P.C. The nucleotide sequence and evolution of ovine MHC class II B genes: DQB and DRB [Text] / P.C. Scott, J.F. Madox, K.J. Cogolin-Ewens, M.R. Brandon // *Immunogenetics*. – 1991. – V. 34. – P. 80 – 87.
132. Sell, S. Cellular events during hepatocarcinogenesis in rats and the question of premalignancy [Text] / S. Sell, J.M. Hunt, B.J. Knoll, H.A. Dunsford // *Adv. Cancer Res.* – 1987. – V. 48. – P. 37 – 111.
133. Sigurdardottir, S. Restriction fragment length polymorphism of DQ and DR class II genes of the bovine major histocompatibility complex [Text] / S. Sigurdardottir, A. Lunden L. Andersson // *Animal Genetics*. – 1988. – V. 19. – P. 133 – 150.
134. Simpson, E.H. Measurement of diversity [Text] / E.H. Simpson // *Nature*. 1949. – V. 163. P. 688.
135. Shannon, C.E. A mathematical theory of communication [Text] / C.E. Shannon // *The Bell System Technical Journal*. – 1948. V. 27. – P. 379 – 423.
136. Shannon, C.E. *The Mathematical Theory of Communication* [Text] / C.E. Shannon, W. Weaver. – Urbana.: Univ. Illinois Press, 1949. – 117 p.
137. Spooner, R.L. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BoLA) in cattle [Text] / R.L. Spooner, H. Leveziel, F. Grosclaude, R.A. Oliver, M. Vaiman // *Journal of Immunogenetics*. – 1978. – V. 5. – P. 335 – 346.
138. Spooner, R.L. Analysis of alloantisera against bovine lymphocytes. Joint report of the 1st International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) Workshop [Text] / R.L. Spooner, R.A. Oliver, D.I. Sales, C.M. McCoubrey, P. Millar, A.G. Morgan, B. Amorena, E. Bailey, D. Bernoco, M. Brandon, R.W. Bull, J. Caldwell, S. Cwik, R.H. van Dam, J. Dodd, B. Gahne, F. Grosclaude, J.G. Hall, H. Hines, H. Leveziel, M.J. Newman, M.J. Stear, W.H. Stone, M. Vaiman // *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*. – 1979. – V. 10. – P. 63 – 135.
139. Stear, M.J. BoLA antigens are associated with increased frequency of persistent lymphocytosis in bovine leukemia virus infected cattle and with increased incidence of antibodies to bovine leukemia virus [Text] / M.J. Stear, C.K. Dimmock, M.J. Newman, F.W. Nicholas // *Animal Genetics*. – 1988. – V. 19. – P. 151.

140. Stern, L.J. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide [Text] / L.J. Stern, J.H. Brown, T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger, D.C. Wiley // *Nature*. – 1994. V. 368. – P. 215 – 221.

141. Teneva, A. Molecular markers in animal genome analysis [Text] / A. Teneva // *Biotechnology in Animal Husbandry*. – 2009. – V. 25. – P. 1267 – 1284.

142. The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution [Text] / The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, C.G. Elsik, R.L. Tellam, K.C. Worley // *Science*. – 2009. – V. 324. – № 5926. – P. 522 – 528.

143. van Eijk M.J.T. Development of persistent lymphocytosis in cattle is closely associated with DRB2 [Text] / Michiel J.T. van Eijk, Julie A. Stewart-Haynes, Jonathan E. Beever, Rohan L. Fernando, Harris A. Lewin. // *Immunogenetics*. – 1992. – V. 37. – P. 64 – 68.

144. van Eijk, M.J.T. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP [Text] / M.J.T. van Eijk, J.A. Stewart-Haynes, H.A. Lewin // *Anim Genet*. – 1992. – V. 23. – P. 483 – 496.

145. van Eijk M.J.T. Genetic mapping of BoLA-A, CYP21, DRB3, DYA, and PRL on BTA23 [Text] / M.J.T. van Eijk, J.E. Beever, Y. Da, J.A. Stewart, G.E. Nicholaides, C.A. Green, H.A. Lewin // *Mammalian Genome*. – 1995. – V. 6. – P. 151 – 152.

146. Whittaker, R.H. Evolution and measurement of species diversity [Text] / R.H. Whittaker // *Taxon*. – 1972. – V. 21. – № 2/3. – P. 213 – 251.

147. Williams, C.B. Patterns in the Balance of Nature and Related Problems in Quantitative Ecology [Text] / C.B. Williams. – N.Y.: Acad. Press, 1964. – 324 p.

148. Winkler, C. Genetic characterisation of FLA the cat major histocompatibility complex [Text] / C. Winkler, A. Schults, St. Ccvario, St. O'Brien // *Proc.Natl Acad. Sci. USA*. – 1989. – V. 86. – P. 943 – 947.

149. Wray, C. Experimental *Salmonella typhimurium* infection in calves [Text] / C. Wray, W.J. Sojka // *Res Vet Sci.* – 1978. – V. 25. – P. 139 – 143.
150. Wright, S. The genetical structure of populations [Text] / S. Wright // *Ann. Eugenics.* – 1951. – V. 15. – P. 323 – 354.
151. Wright, S. On the roles of directed and random changes in gene frequency in the genetics of population [Text] / S. Wright // *Evolution.* – 1948. – V. 2. – P. 279 – 294.
152. Xu, A. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus [Text] / A. Xu, J.T.M. van Eijk, C. Park, A.L. Harris // *The journal of immunology.* – 1993. – V. 151. – № 12. – P. 6977 – 6985.
153. Yang, D. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis [Text] / D. Yang, R.D. Snanks, J.A. Stewart, H.A. Lewin. // *PNAS.* – 1993. – V. 90. – P. 6538 – 6541.
154. Yuhki, N. Molecular characterization and genetic mapping of class I and class II genes for the domestic cat [Text] / N. Yuhki, S.J. O'Brien // *Immunogenetics.* – 1988. – V. 27. – P. 414 – 425.
155. Zanotti, M. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukemia virus in Holstein-Friesian cattle [Text] / M. Zanotti, G. Poli, W. Ponti, M. Polli, M. Rocchi, E. Bolzani, M. Longeri, S. Russo, H.A. Lewin, M.J.T. van Eijk // *Animal Genetics.* – 1996. – V. 27. – P. 337 – 341.
156. Zoorob, R. Polymorphism of class II MHC genes in the domestic fowl [Text] / R. Zoorob, G. Behar, G. Kroemer, Ch. Auffray // *Animal Genetics.* 1991. V.22. S.1. P.621