

**Козлов Александр Леонидович**

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА BOLA-DRB3 КАК МАРКЕР  
ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И  
УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСУ ЛЕЙКОЗА МОЛОЧНОГО  
СКОТА БРЯНСКОЙ ОБЛАСТИ**

Специальность

06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2016

Работа выполнена в Инновационном научно-образовательном центре биотехнологии и экологии ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Нам Ирина Ян Гуковна**

**Официальные оппоненты:** **Ковалюк Наталья Викторовна**  
доктор биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства» (ФГБНУ СКНИИЖ)

**Сулимова Галина Ефимовна**  
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории сравнительной генетики животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста» (ВИЖ им. Л.К. Эрнста)

Защита диссертации состоится 8 июля 2016 года в 12:00 часов на заседании объединенного диссертационного совета Д 999.041.02 при ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства» по адресу: 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» <http://www.stgau.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г. и размещен на сайтах: ВАК Минобразования и науки РФ <http://www.vak3.ed.gov.ru> «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.; ФГБОУ ВО «Ставропольский ГАУ» <http://www.stgau.ru> «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

**Пономарева Мария Евгеньевна**

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследований.** Одним из важнейших факторов ограничения продуктивности крупного рогатого скота (КРС) являются различные заболевания, в частности вирусный лейкоз КРС, который наносит большой экономический ущерб в животноводстве 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 (Гулюкин М.И. и др., 2002; Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А., 2008; Ковалюк Н.В., 2008; Симонян Г.А., 2011).

Согласно докладу Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, удельный вес лейкоза составляет 57% в инфекционной патологии крупного рогатого скота в России. 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 исследователи отмечают обеднение стад КРС по ряду аллелей разных генов, вплоть до полного исчезновения отдельных аллелей в некоторых регионах и хозяйствах. Эта проблема тесно связана с проблемой сохранения биоразнообразия и, в частности, разнообразия аллелей разных генов. Высокий генетический полиморфизм популяции повышает ее устойчивость к изменяющимся факторам окружающей среды, в частности, формирование защитной реакции на возбудителей различных заболеваний (Ковалюк Н.В. и др., 2010; 2012; Гладырь Е.А. и др., 2012).

**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 (Удина И.Г. и соавт., 1998; Гладырь Е.А. и соавт., 2009; Ковалюк Н.В. и соавт., 2010). При этом инфицированные животные необязательно заболевают лейкозом, наблюдается явление вирусоносительства, когда вирус встраивается в геном хозяйской клетки и присутствует в латентной форме (Mirsky M.L., 1998).

Определяющую роль в устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу играет главный комплекс гистосовместимости КРС BoLA. Ранее в работах Сулимовой Г.Е. (1995), Эрнста Л.К. (1997), Глазко В.И. (1997) было показано, что ГКГ коров содержит ген BoLA-DRB3, аллели которого отвечают за восприимчивость или устойчивость животного к вирусу лейкоза. 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 (Удина И.Г. и соавт., 2003).

**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.

## **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 «Снежка-Госома», частное стадо Жирятино), симментальской (СХПК «Большевик»), швицкой (СПК «Красный рог»), айрширской (с. Сельцо), красно-пестрой (колхоз «Память Ленина»). Всего проанализировано 626 голов (таблица 1). 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.

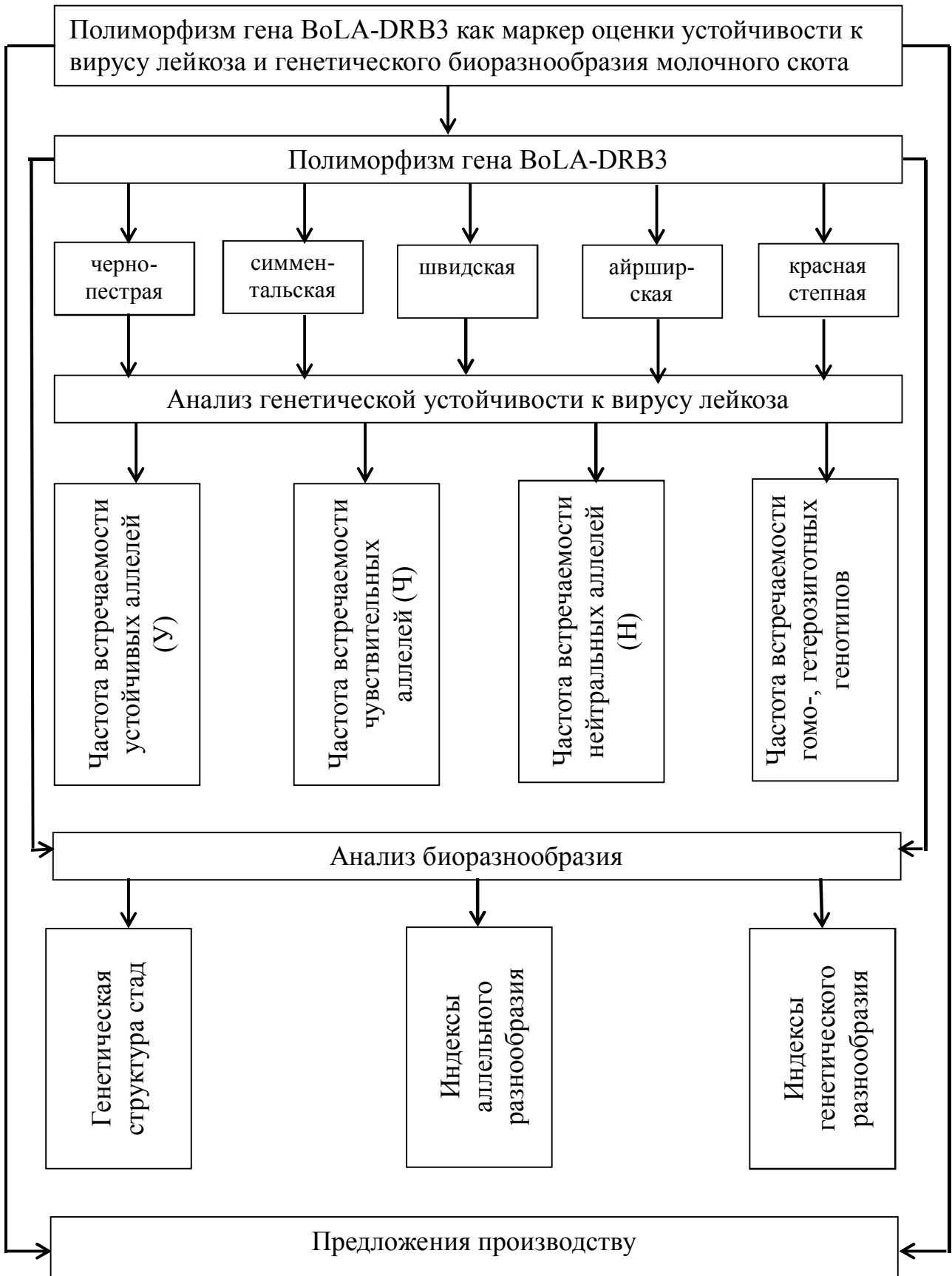


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

Таблица 1 – 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 «Снежка-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 «Снежка-Новоселки»	8	-
	ОАО «Агροгородок Гетманобудский»	18	-

Выделение ДНК проводили из лейкоцитов крови с использованием гуанидинтиоцианатного метода с сорбцией на оксид кремния. Качество препаратов ДНК проверяли с помощью горизонтального гель-электрофореза.

ДНК визуализировали на приборе Gel-Doc фирмы BioRad в проходящем УФ-свете с помощью добавляемого в гель бромистого этидия.

Полимеразную цепную реакцию и синтез праймеров проводили согласно методике Сулимовой Г.Е. (1999):

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

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

Для рестрикции использовали три фермента: Rsa I (37°C), Hae III (37°C) и Bst YI (60°C).

На основании полученных данных проводился аллельный анализ (Excel 2010). Рассчитывался критерий согласия Пирсона (Excel 2010) 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  $\chi^2=3,84$ .

В пакете SPSS 15.0 проводилось сравнение выборки с нормальным распределением с помощью тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка.

Получаемые значения уровня значимости  $\alpha$  близкие к нулю означают значительное отличие исследуемой выборки от нормальной.

Для оценки генетической дифференциации исследуемых популяций использовались F-статистика Райта. Расчет индекса  $F_{IS}$  осуществлялся в программе Генерор. В программе Генерор также 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 исследованных популяций крупного рогатого скота строилась в соответствии со стандартными генетическими дистанциями по Неи.

Генетическая дистанция вычислялась по формуле:

$$D = -\ln I,$$

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

$$I = \sum x_i y_i / \sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2},$$

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

Построение дендрограммы осуществлялось с помощью пакетов программ BioNJ и TreeDун.

Для оценки генетического полиморфизма и биоразнообразия популяции, стад пород крупного рогатого скота были рассчитаны индексы: Шеннона ( $H$ ), Бриллюэна ( $H_B$ ), Вильямса ( $\lambda$ ), Бергера-Паркера ( $1/d$ ), Тейла ( $R_T$ ), индекс, предложенный В.А. Топтиковым 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**

Исследование аллельного полиморфизма локуса **BoLA-DRB3** проводилось в 4-х популяциях коров черно-пестрой породы, разводимой в племенных и товарных хозяйствах Брянской области.

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

Аллельный полиморфизм гена **BoLA-DRB3** в исследуемой выборке коров ( $n=52$ ) представлен 16-ю аллелями с различной частотой встречаемости. 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.

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.

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 FIS, 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.

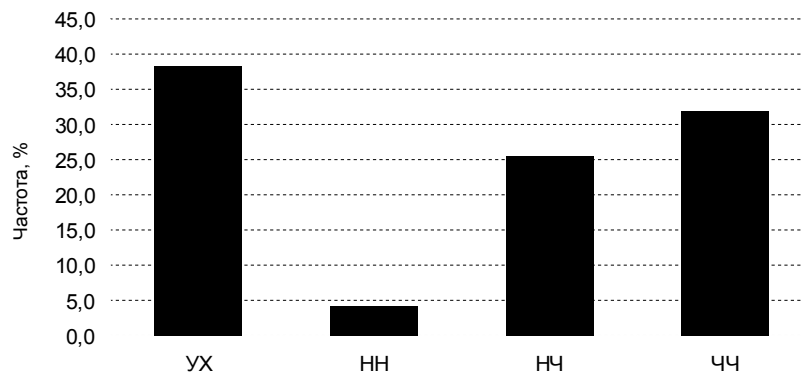
Сравнительный анализ генотипической структуры исследуемой выборки коров осуществлялся с учетом генотипов: гомозиготных чувствительных (Ч/Ч), устойчивых (У/У), нейтральных (Н/Н) и гетерозиготных (Ч/Н, У/Ч, У/Н) генотипов.

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 черно-пестрого 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. Таким образом, суммарное число генотипов, несущих аллели устойчивости к вирусу лейкоза (УХ), в исследуемой популяции оказалось 38,3% (рисунок 2).



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

Рисунок 2 – Распределение генотипов гена BoLA-DRB3 по устойчивости к лейкозу в СПК «Агрофирма «Культура»

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»**

В выборке коров черно-пестрой породы (n=185) ОАО «Новый путь» 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% и 13,8% соответственно. В единичном числе представлены аллели \*9 и \*13, их суммарная частота составила 0,6%.

Суммарная частота аллелей устойчивости составляет 21,3%, аллелей чувствительности – 44,2%. На долю нейтральных аллелей приходится 34,5%.

Суммарная частота генотипов, ассоциированных с восприимчивостью к лейкозу (ЧЧ, ЧН) составляет чуть больше половины – 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 число генотипов, обеспечивающих устойчивость к ВЛ КРС (с учетом доминантности аллелей устойчивости), почти вдвое меньше, чем генотипов с аллелями чувствительности.

Таким образом, стадо ОАО «Новый путь» представляет собой популяцию, отличающуюся от равновесной, с уровнем превышения гомозигот в 22%, восприимчивую к вирусу лейкоза за счет преобладания, более чем в два раза, аллелей чувствительности, по сравнению с устойчивыми и присутствием генотипов ЧН, а также отличающуюся высоким разнообразием аллелей гена BoLA-DRB3.

### **3.1.1.3 Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы ООО «Снежка-Госома»**

В рассматриваемом стаде (n=63) мажорными оказались аллели \*23, \*11, \*24 и \*8. Одной из отличительных особенностей данного стада является широкая представленность группы минорных аллелей: \*1, \*2, \*3, \*4, \*5, \*6, \*12, \*14, \*18, \*19, \*25 и \*26, которые представлены в единичном экземпляре с суммарной частотой – 9,6%. Мажорные аллели, ассоциированные с устойчивостью к ВЛ КРС распределены в равных долях (устойчивости и восприимчивости). Минорные аллели представлены как нейтральные.

В целом, стадо коров черно-пестрой породы ООО «Снежка-Госома» можно охарактеризовать как популяцию, незначительно отличающуюся от равновесной, с уровнем инбридинга 9%, устойчивую к вирусу лейкоза за счет 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 коров (n=81) черно-пестрой породы этого хозяйства 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. 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.

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

Стадо коров черно-пестрой породы (Жирятино) можно охарактеризовать как популяцию, 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 BoLA-DRB3 коров черно-пестрой породы с признаками гемобластоза

Анализом аллельного профиля гена BoLA-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% (рисунок 3).

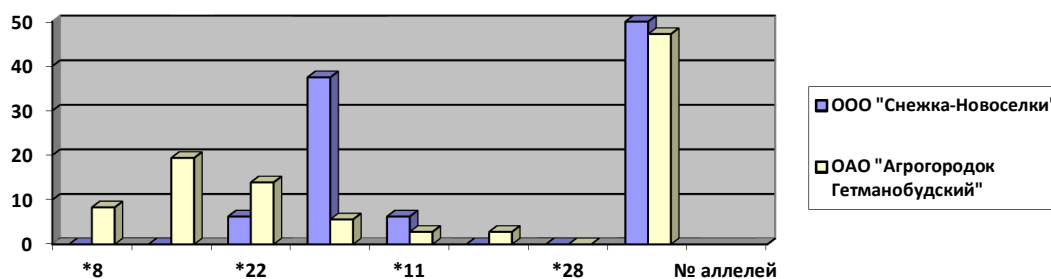


Рисунок 3 – Распределение аллелей гена BoLA-DRB3 у больных коров

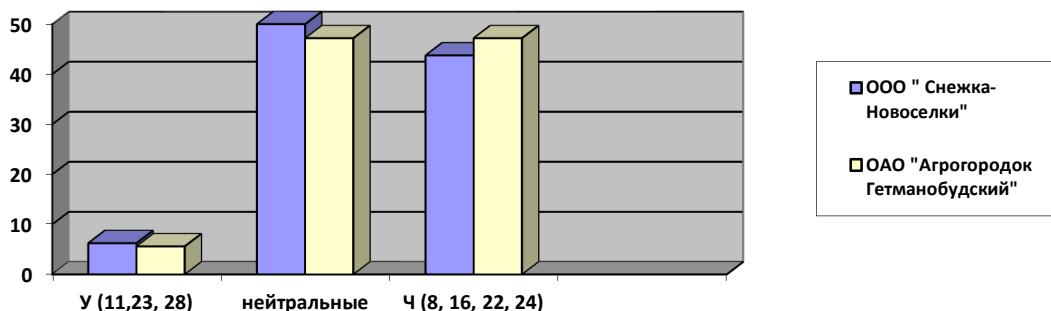


Рисунок 4 – Распределение аллелей устойчивости и чувствительности к лейкозу у больных коров

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 4).

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. Генотипы, несущие аллель чувствительности к ВЛ КРС, составляют 62,5% в ООО «Снежка-Новоселки», 61,1% – ОАО «Агрогородок «Гетманобудский» (таблица 2).

Таблица 2 – 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

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. Полученные данные согласуются с литературными данными, полученными Сулимовой Г.Е. (1995), Ковалюк Н.В. (2008, 2010), Сацук В.Ф. (2009), Шарифуллиной Н.М. (2005) и другими авторами.

### 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. 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%) варибельность 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%.

Стадо коров симментальской породы (СХПК «Большевик») можно охарактеризовать как популяцию неравновесную, с уровнем 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%.

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%.

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 в локусе 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.

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%. Наличие единственного мажорного аллеля отражается на распределении генотипов. Наиболее часто встречаемыми являются НН и УУ генотипы.

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.

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%.

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%.

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

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 ПДФ-типа аллелей в локусе гена *BoLA-DRB3* с различной частотой встречаемости.

Установлено, что выборка коров черно-пестрой (СПК «Агрофирма «Культура»), швицкой (СПК «Красный рог»), айрширской (Сельцо), красно-пестрой пород (колхоз «Память Ленина») представляет собой группу популяций с пониженным числом аллелей: 16-18. Три популяции черно-пестрого скота (ОАО «Новый путь», ООО «Снежка-Госома», частное стадо Жирятино) и стадо симментальской породы отличаются большим разнообразием аллелей гена *BoLA-DRB3* (23-27 аллелей), при этом максимальное количество аллелей характерно для симментальского скота.

Общими для всех стад оказались 5 аллелей (\*7, \*8, \*11, \*12 и \*16). Для четырех стад черно-пестрой породы – 12 общих аллелей (\*3, \*7, \*8, \*11, \*12, \*13, \*14, \*16, \*20, \*22, \*23, \*24 и \*28).

Частота встречаемости аллелей в разных стадах варьирует в достаточно широких пределах. Аллель, являющийся мажорным в одной популяции, в другой может быть менее широко представлен, а в некоторых является минорным. Так, аллель \*7, доминирующий в стадах швицкой и айрширской пород является минорным в популяциях черно-пестрой породы кроме стада из Жирятино. Аллель устойчивости \*11 – мажорный в трех стадах: черно-пестрой породы (ЧП1 и ЧП2) и симментальской, но минорный в двух стадах: швицкой и красно-пестрой пород.

Наибольшее отличие между стадами и породами проявляется в различиях частот встречаемости аллелей \*22, \*23, \*24, \*28, \*8, \*16. Например, частота аллеля \*24 в ЧП1 – 23,4% (максимальна), в ЧП4 – 3,7% (минимальна), но полностью отсутствует у швицкой породы и имеет промежуточные значения для остальных пород. Частота аллеля \*28 у коров черно-пестрой породы варьировала от 2,8% (ЧП2) до 4,9% (ЧП4), при отсутствии у швицкой породы с максимальным превосходством у коров красно-пестрой (14,4%).

Значительные различия между стадами наблюдаются по минорным аллелям, но ввиду низкой частоты выводы об их дифференцирующих свойствах могут быть недостоверными. Наибольшее разнообразие аллельного профиля характерно для популяции симментальской породы, специфичными для исследуемого стада оказались аллели \*32, \*38, \*46, \*53 и \*54. Аллель \*6 был обнаружен только в стаде ЧП3, а аллель \*43 – в стаде красно-пестрой. Минорный аллель \*14 практически равномерно представлен во всех 4-х популяциях черно-пестрой породы и отсутствует в остальных породах (таблица 3).

Таблица 3 – 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	

Особый интерес представляет распределение аллелей, связанных с устойчивостью или восприимчивостью к ВЛ КРС (таблица 4).



Таблица 4 – Частота встречаемости аллелей гена BoLA-DRB3, ассоциированных с развитием гемобластоза

Аллель BoLA-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 BoLA-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

Оказалось, что в стаде швицкой породы отсутствуют аллели \*23, \*28 и \*24, в стаде симментальской – аллель \*23, в стаде айрширской – \*22. Частота встречаемости аллеля \*11 оказалась достаточно вариабельной: наивысшей в двух стадах (ЧП1 и ЧП3) черно-пестрой; а в двух других стадах этой же породы (ЧП2 и ЧП4, а также в айрширской – средней, в выборке коров швицкой и красно-пестрой – наименьшей.

Наибольшая суммарная частота аллелей устойчивости характерна для стада черно-пестрой породы (ООО «Снежка-Госома»), наименьшая – в стаде швицкой породы.

Наибольшая суммарная частота аллелей восприимчивости характерна для стада черно-пестрой породы (СПК «Агрофирма «Культура») – более половины, а наименьшая – для стада айрширской породы. Значительное преобладание аллелей устойчивости над аллелями чувствительности отмечено в стаде айрширской породы (почти вдвое), в то время как, в стаде черно-пестрой породы (ЧП3 и ЧП4) присутствие их незначительно. При этом доля аллелей чувствительности в этих стадах относительно низкая (рисунок 5а).

При характеристике устойчивости или восприимчивости стада в целом к ВЛ КРС необходимо учитывать не только частоты аллелей устойчивости и восприимчивости, но и доминантную природу аллелей устойчивости (рисунок 5б).

При этом значительно уменьшается вклад нейтральных генотипов, а соотношение чувствительных и устойчивых меняется в меньшей степени. В целом можно заключить, что стада черно-пестрой породы ЧП1 и ЧП2 отличаются повышенной восприимчивостью по сравнению с ЧП3 и ЧП4 и по сравнению с

красно-пестрой и айрширской породами. Для стада швицкой породы характерен сравнительно низкий уровень генотипов устойчивых к вирусу лейкоза.

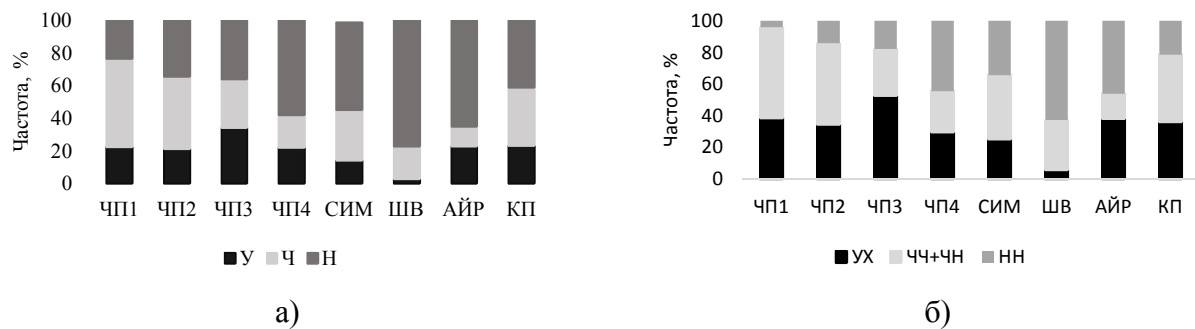


Рисунок 5 – Соотношение а) аллелей и б) генотипов BoLA-DRB3 в исследованных стадах и породах крупного рогатого скота

Таблица 5 – 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 <sub>is</sub>	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)

Во всех исследованных стадах наблюдаемое количество гомозигот превышало ожидаемое, причем в некоторых случаях существенно. Это отразилось и на больших значениях индекса фиксации, отражающего инбридинг в популяции (таблица 5).

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. Это явление может быть причиной низкой продуктивности, сниженного выхода телят и повышенной заболеваемости (Сацук В.Ф., 2009).

Вычисление генетических дистанций по Неи позволяет сравнивать выборки не только по наличию-отсутствию того или иного аллеля, но и по их частотам. На основе матрицы генетического сходства между изученными популяциями была построена дендрограмма, на которой выборки объединились в кластеры (рисунок 6).

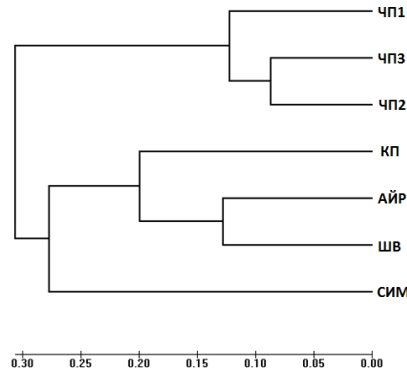


Рисунок 6 – Дендрограмма, построенная на основании коэффициентов генетической дистанции Неи, показывающая степень генетической дифференциации исследованных популяций крупного рогатого скота

По сходству аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* на дендрограмме четко обозначены два кластера: 1 – черно-пестрый скот, 2 – швицкая и айрширская породы. Отмечается высокий полиморфизм между различными популяциями внутри черно-пестрой породы.

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

Разнообразие популяции в целом определяет степень её продуктивности, пластичности и устойчивости к меняющимся факторам окружающей среды, в частности устойчивость к заболеваниям (Ковалюк Н.В. и соавт., 2012). Показано, что высокая молочная продуктивность зависит не только от наличия определенных аллелей, но и от комбинации их, т.е. гетерозиготные особи более продуктивны (Сулимова Г.Е., 2001; Шарифуллина Н.М., 2005; Измestьев С.В., 2006; Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А. и соавт., 2012; Ковалюк Н.В. и соавт., 2005). 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 генетического потенциала. Это актуально также в связи с проблемой обеднения генофондов, вплоть до полного исчезновения отдельных аллелей в некоторых стадах (Дроздов Е.В., 2013; Захаров И.А., 2006). Наличие эффективного количественного метода расчета 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 двух- или трехаллельных генов. Поэтому использование результатов анализа уже по одному этому гену достаточно для оценки уровня разнообразия популяции в целом и сравнения стад различных

хозяйств или пород между собой.

Для сравнения уровня разнообразия локуса BoLA-DRB3 различных хозяйств использовались несколько индексов: Шеннона (Н), Бриллуэна (НВ), Вильямса ( $\lambda$ ), Бергера-Паркера (1/d), Тейла ( $R_T$ ), индекс, предложенный В.А. Топтиковым с соавторами ( $K_D$ ), Макинтоша (U,  $D_M$ ,  $E_M$ ), Пиелу (E) (таблица 6). Следует отметить, что для простоты, расчеты индексов проводили без учета гомозиготности, т.е. аллели рассматривались как общая совокупность в независимости от их распределения по особям.

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. В таблице 7 представлены данные попарной корреляции между индексами.

Таблица 6 – Индексы разнообразия аллелей в стадах крупного рогатого скота

	ЧП1	ЧП2	ЧП3	ЧП4	СИМ	ШВ	АЙР	КП	С, %	М
Н	3,32	3,89	3,88	4,2	3,82	3,62	3,22	3,5	8%	3,68
НВ	2,99	3,72	3,49	3,9	3,53	3,14	2,89	2,97	11%	3,33
$\lambda$	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

Таблица 7 – Значения коэффициентов корреляции Спирмена для исследуемых индексов

	Н	НВ	$\lambda$	1/d	$R_T$	$K_D$	U	$D_M$
Н	0	0,95	0,99	0,90	0,76	0,95	0,38	0,81
НВ		0	0,93	0,90	0,86	1,00	0,5	0,63
$\lambda$			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

Наиболее универсальными являются индексы Шеннона (Н), Тейла ( $R_T$ ) и Топтикова ( $K_D$ ), так как их формулы учитывают распределение мажорных и минорных аллелей, т.е. оба компонента разнообразия.

Универсальным методом оценки является построение кривых значимости (рисунок 7). Но, как видно из рисунка, сложно сравнивать одновременно большое количество похожих групп. На рисунке 8 представлено сопоставление изменения индексов от стада к стаду.

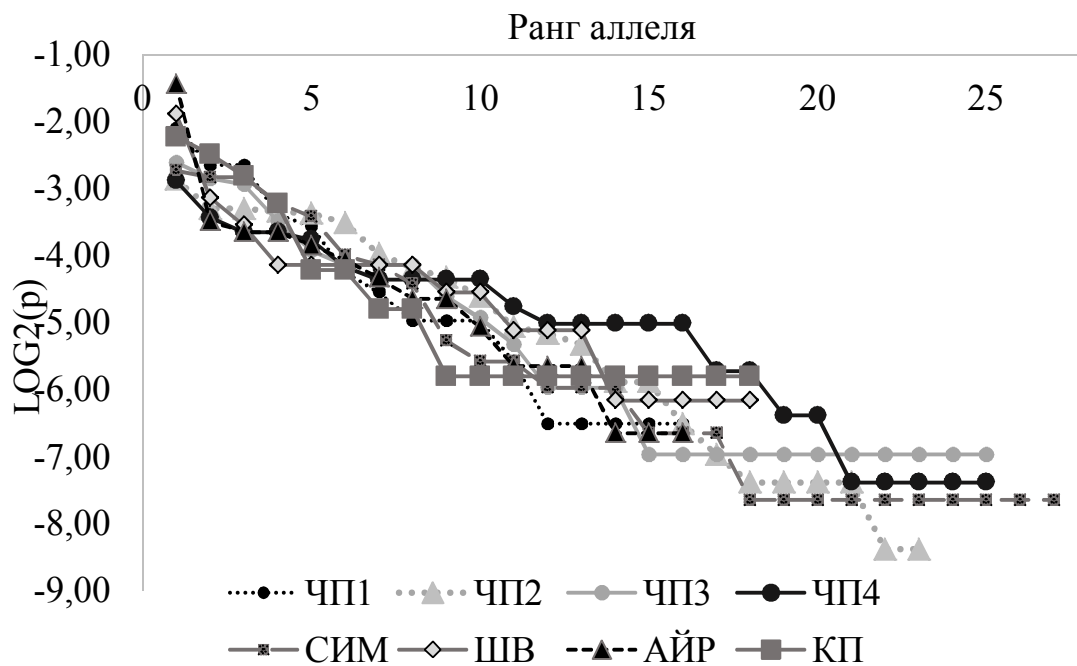


Рисунок 7 – График значимости аллелей гена BoLA-DRB3 исследованных стад крупного рогатого скота

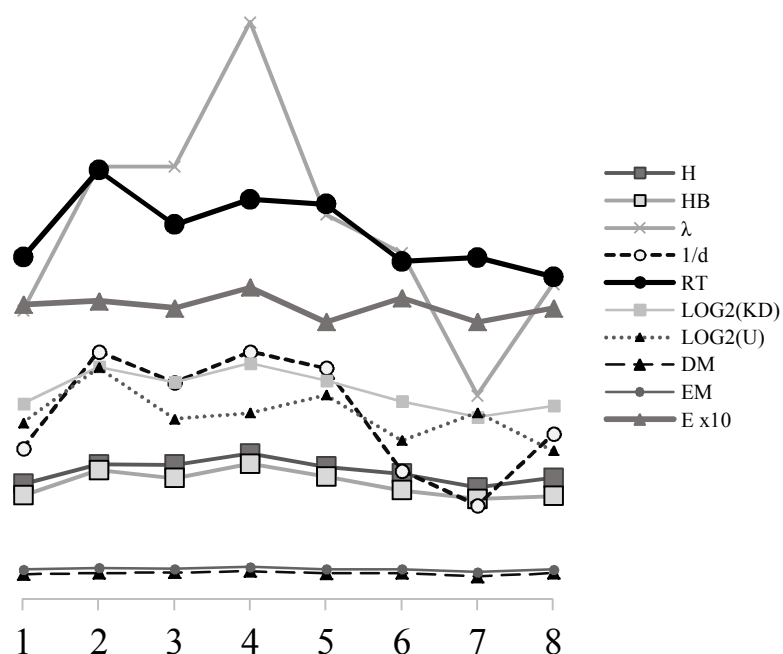


Рисунок 8 – Графическое сопоставление значения различных индексов в исследуемых породах (1 – ЧП1, 2 – ЧП2, 3 – ЧП3, 4 – ЧП4, 5 – СИМ, 6 – ШВ, 7 – АЙР, 8 – КП)

График получен путем выравнивания показателей отдельных хозяйств по шкале нормальных чисел по возрастианию. График позволяет визуальнo оценить значения индексов в исследуемых стадах. Для получения сопоставимых значений индексы  $U$  и  $K_D$  пересчитаны в логарифмической шкале. Индекс Пиелу представлен девятикратными значениями.

На примере изученных стад молочного скота видно, что в некоторых случаях индексы меняются синхронно. Для двух стад черно-пестрой породы ЧП1 и ЧП2, а также для стада швицкой породы все индексы одинаково отображают биоразнообразие одной популяции относительно другой. Различия между показателями проявляются для стад симментальской и айрширской пород. При этом, исходя из графика, все показатели можно разбить на четыре группы: 1) показатели, меняющиеся более-мене синхронно ( $H$ ,  $H_B$ ,  $1/d$ ,  $K_D$ ,  $\lambda$ ); 2) показатели, изменение которых отличается от остальных ( $R_T$  и  $U$ ); 3) показатели, изменение которых слишком незначительно ( $D_M$ ); 4) показатели выравнинности ( $E$  и  $E_M$ ).

Использование индекса  $D_M$  представляется нецелесообразным использовать для данной системы, так как его низкая вариабельность не позволяет эффективно сравнивать популяции между собой.

В группу синхронно меняющихся попадают показатели, которые также обнаруживают высокую степень корреляции между собой.

Среди изученных стад наибольшим разнообразием характеризуется стадо черно-пестрой породы г. Жирятино. Это логично сочетается с тем фактом, что данное стадо представляет собой совокупность животных с частных дворов, пасущихся совместно. В этом стаде отсутствует направленная селекционная работа и, оно, возможно, не является чистопородным. Наименьшее разнообразие найдено в частном стаде айрширской породы. Сложно сказать, является ли это отличительной характеристикой породы в целом или особенностями разведения в данном конкретном подворье.

Таким образом, продемонстрирована возможность использования индексов для оценки биоразнообразия аллелей в популяции. В качестве индикаторного гена можно использовать любой высокополиморфный ген, например  $BoLA-DRB3$ , 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, шведской 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 «Снежка-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 (H<sub>B</sub>), Тейла (R<sub>T</sub>) и Топтикова (K<sub>d</sub>). 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 (H<sub>B</sub>), Тейла (R<sub>T</sub>) и Топтикова (K<sub>d</sub>).

### 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 работ, опубликованных автором по теме диссертации:

#### *публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ:*

1. 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.

2. **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.

#### *Публикации в других изданиях:*

3. 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.

4. **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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.



Козлов Александр Леонидович

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *BOLA-DRB3* КАК МАРКЕР ОЦЕНКИ  
ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСУ  
ЛЕЙКОЗА МОЛОЧНОГО СКОТА БРЯНСКОЙ ОБЛАСТИ

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Подп. в печать 06.05.2016 г. Бумага офсетная. Формат 60/84 1/16.  
Зак. № 57. Печ. лист 1,0. Тираж 100 экз.

---

Цех оперативной полиграфии ФГБНУ ВНИИОК  
г. Ставрополь, пер. Зоотехнический 15.

