

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ**  
**І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ІВАЩЕНКО ОКСАНА ЮРІЇВНА**

УДК 636.2.082

ДИСЕРТАЦІЯ

**ГЕНЕТИЧНЕ РІЗНОМАНІТТЯ ПОПУЛЯЦІЙ**  
**ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА АСОЦІЙОВАНИМИ**  
**З РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДНК-МАРКЕРАМИ**

204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»  
20 «Аграрні науки та продовольство»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.  
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання  
на відповідне джерело О. Ю. Іващенко

**Науковий керівник:**  
Кулібаба Роман Олександрович,  
доктор сільськогосподарських наук,  
старший науковий співробітник

Київ – 2023

## АНОТАЦІЯ

**Іващенко О. Ю. Генетичне різноманіття популяцій великої рогатої худоби за асоційованими з резистентністю ДНК-маркерами.**

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії зі спеціальності 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2023.

Дисертаційну роботу присвячено дослідженню поліморфізму локусів толл-подібного рецептора 1 (*TLR1*); толл-подібного рецептора 4 (*TLR4*); мембранного білка A1 (*SLC11A1*), фактора некрозу пухлини  $\alpha$  (*TNF\alpha*), манозозв'язувального лектину 1 (*MBL1*) і гамма-рецептора інтерферону 2 (*IFNGR2*) та аналізу параметрів продуктивності корів вітчизняної селекції порід українська чорно-ряба молочна та українська червоно-ряба молочна за виявленими поліморфними локусами для збереження генофонду даних порід і підвищення їх продуктивності за рахунок використання перспективних ДНК-маркерів із господарсько цінними ознаками.

За результатами проведених досліджень вперше проаналізовано та встановлено особливості генетичної структури дослідних популяцій корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід за маркерними мутаціями 1596G>A у першому екзоні гена *TLR1*; 8732G>A, 8834G>C та 2021C>T в третьому екзоні *TLR4*; 7400C>G, 7808A>T в одинадцятому екзоні *SLC11A1*; -824A>G у промоторному фрагменті гена *TNF\alpha*; 2651G>A у другому екзоні *MBL1* і 1008A>G у сьомому екзоні *IFNGR2*.

За результатами дослідження поліморфізму локусу толл-подібного рецептора 1 за мутацією 1596G>A показано подібний розподіл частот генотипів та алелів між дослідними популяціями корів. В української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід виявлено три можливі генотипи, що свідчить про поліморфність цього локусу. Частоти генотипів AA, AG та GG

української чорно-рябої породи становлять відповідно 0,12; 0,64; 0,24; червоно-рябої молочної – 0,13; 0,54; 0,33; тобто в обох популяціях найбільш розповсюдженим є гетерозиготний генотип AG. Частоти алелів А і G складають: в чорно-рябої породи – 0,44 і 0,56; в червоно-рябої – 0,40 та 0,60 відповідно. Розраховано, що лише популяція української червоно-рябої молочної породи перебуває у стані генетичної рівноваги, інша дослідна група тварин продемонструвала відхилення від стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом.

Встановлено, що ген *TLR4* є мономорфним за трьома маркерними мутаціями (8732G>A, 8834G>C, 2021C>T) у третьому екзоні в популяціях всіх досліджуваних порід корів. За *MspI*-поліморфізмом (8732G>A) виявлено особин двох дослідних популяцій тільки з генотипом BB; за *RsaI*-поліморфізмом (8834G>C) – виключно особин з генотипом GG; за *VsiHKA1*-поліморфізмом (2021C>T) – лише корів з гомозиготним генотипом CC.

Генетико-популяційні параметри дослідних порід корів за мутацією 7400C>G (SNP5) гена *SLC11A1* характеризуються аналогічними результатами. Визначено, що в української чорно-рябої і червоно-рябої порід домінуючим генотипом є CC з відповідними частотами для кожної з них – 0,66; 0,57. Причому тварин з гомозиготним генотипом GG не ідентифіковано. Найбільш розповсюджений алель у всіх порід – C (0,83-0,79), частота якого найвища в української чорно-рябої породи. За критерієм  $\chi^2$  відхилення від генетичної рівноваги характерно для обох молочних порід.

За результатами дослідження поліморфізму локусу *SLC11A1* за мутацією 7808A>T (SNP6) показано деякі відмінності частот генотипів і алелів між дослідними популяціями ВРХ. Для чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід спостерігається виражена перевага за частотами генотипів AA, які становлять, відповідно 0,68 та 0,83; генотип TT не виявлено взагалі. Як і у випадку SNP5, для SNP6 виявлено домінування частот алеля А (0,92-0,83), при цьому в української червоно-рябої породи цей показник наближається до повної фіксації (0,92). Обидві дослідні популяції

знаходяться у стані генетичної рівноваги.

При дослідженні особливостей розподілу гаплотипів у гені мембранного білка A1 (*SLC11A1*) в дослідних популяціях виявлено гаплотипи CC-AA, CG-AT, CG-AA, CG-TT. В популяції корів дослідних порід найбільш розповсюдженим є гаплотип CC-AA, частота якого в української чорно-рябої і червоно-рябої складає 0,66 і 0,57 відповідно. Крім того, в чорно-рябої з середньою частотою зустрічається гаплотип CG-AT – 0,32; в той час як в червоно-рябої частота даного гаплотипу значно нижча – 0,17 і 0,08 відповідно. Разом з тим, гаплотип CG-TT відсутній в популяціях чорно-рябої та червоно-рябої порід, попри те, що за теоретичними розрахунками в досліджуваних груп корів очікується наявність всіх чотирьох варіантів гаплотипів.

За встановленим поліморфізмом локусу фактора некрозу пухлини  $\alpha$  за мутацією -824A>G показано суттєві відмінності частот генотипів та алелів між дослідними популяціями корів. В української чорно-рябої породи частоти гомозиготних генотипів виявились на досить низькому рівні та з однаковими показниками (AA = GG = 0,8), тоді як в української червоно-рябої частота генотипу GG в 3,5 рази вища порівняно з генотипом AA. Частоти алелів A і G складають: в української чорно-рябої породи – 0,5 і 0,5; в червоно-рябої – 0,39 і 0,61 відповідно. В популяції української чорно-рябої породи має місце відхилення фактичного співвідношення частот генотипів від очікуваного, українська червоно-ряба знаходиться у стані генетичної рівноваги.

В результаті проведеного дослідження виявлено, що ген манозозв'язувального лектину є поліморфним за маркерною мутацією 2651G>A у другому екзоні в обох досліджуваних популяціях. Визначено частоти генотипів AA, AG і GG в чорно-рябої породи – 0,35; 0,57 і 0,08; та в червоно-рябої – 0,13; 0,76 і 0,11 відповідно, тобто найбільш розповсюдженим в двох популяціях є генотип AG, частота якого у популяціях корів вища за середній рівень. Частоти алелів A і G складають: в чорно-рябої породи – 0,63

і 0,37; в червоно-рябої – 0,51 і 0,49 відповідно. В української червоно-рябої породи спостерігається значне збільшення кількості гетерозигот та зменшення гомозигот, що призвело до істотного порушення стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, в той час як для чорно-рябої відхилень від рівноважного стану не зафіксовано.

Дослідження генетичної структури популяцій української чорно-рябої та червоно-рябої порід за мутацією 1008A>G у сьомому екзоні локусу інтерферону гамма-рецептора 2 свідчать про схожу тенденцію розподілу частот генотипів і алелів між дослідними групами тварин. Визначено, що в обох популяціях переважаючим генотипом є AG з практично однаковою частотою частотою 0,51 (чорно-ряба) і 0,53 (червоно-ряба), частота гомозигот AA становить 0,388 та 0,47 відповідно. До того ж, в червоно-рябої породи генотип GG виявився відсутнім, тоді як його частка в чорно-рябої досить мала – 0,102. Найбільш поширений алель у двох дослідних популяціях – алель А (0,64 – чорно-ряба, 0,74 – червоно-ряба). В стані генетичної рівноваги знаходиться тільки українська чорно-ряба порода, для української червоно-рябої, навпаки, характерно високе відхилення даного показника.

За результатами проведеного порівняльного аналізу генетико-популяційних показників двох дослідних популяцій української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід за п'ятьма генами (*TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1*, *IFNGR2*) визначено, що профілі розподілу генотипів в обох порід корів за дослідними об'єктами досить схожі, за винятком локусів *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2*. Слід відмітити, що всі локуси є поліморфними, за винятком гена *TLR4*, який є мономорфним в обох популяціях ВРХ. Українська чорно-ряба порода за локусами *SLC11A1* (мутація 7808A>Т), *MBL1* та *IFNGR2*; червоно-ряба за *TLR1*, *SLC11A1* (мутація 7808A>Т) і *TNF $\alpha$*  перебувають у стані генетичної рівноваги; за іншими локусами спостерігається відхилення фактичного співвідношення частот генотипів від очікуваного, тобто від стану рівноваги, що вказує на дію відбору або дрейфу генів.

Переважаючі генотипи в українській чорно-рябої породи: AG (0,64) за мутацією 1596G>A (*TLR1*), CC (0,66) – за 7400C>G (*SLC11A1*), AA (0,68) – за 7808A>T (*SLC11A1*); AG (0,66) – за мутацією -824A>G (*TNF $\alpha$* ); AG (0,57) – за мутацією 2651G>A (*MBL1*); AG (0,51) – за 1008A>G (*IFNGR2*). Найвищу частоту мають алелі: G (0,56) за мутацією 1596G>A (*TLR1*), C (0,83) – за 7400C>G (*SLC11A1*), A (0,84) – за 7808A>T (*SLC11A1*), A (0,64) – за 2651G>A (*MBL1*) і A (0,63) – за 1008A>G (*IFNGR2*), що також вказує на подібність дослідних порід. Середні величини фактичної та очікуваної гетерозиготності, а також ефективного числа алелів для досліджуваних груп тварин практично не відрізняються, крім того, показник фактичної гетерозиготності перевищував значення очікуваної. Щодо параметра  $F_{is}$ , його значення вказують на дещо вищий рівень аутбредності популяції червоно-рябої молочної породи порівняно з чорно-рябою. Загалом, отримані результати свідчать про ймовірний дрейф генів на фоні застосування штучного добору в нечисленних штучних популяціях дослідних порід корів стосовно маркерних мутацій 1596G>A у гені *TLR1*; 7400C>G у гені *SLC11A1*; 7808A>T в *SLC11A1*; -824A>G в *TNF $\alpha$* ; 2651G>A в *MBL1* та 1008A>G в *IFNGR2*.

Проведено аналіз параметрів продуктивності дослідних популяцій корів з різними генотипами за локусами *TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2*. В результаті дослідження за мутацією 1596G>A у гені *TLR1* встановлено, що в українській чорно-рябої породи домінуючі значення надою за першу лактацію пов'язані з гетерозиготним генотипом AG, за третю – з генотипом AA, тоді як в червоно-рябої, навпаки, гомозиготні особини з генотипом GG мають максимальні значення показника для першої і третьої лактацій. Характер встановлених зв'язків вказує на породоспецифічність мутації 1596G>A як маркера молочної продуктивності корів.

За результатами аналізу продуктивних ознак корів порід українська чорно-ряба і червоно-ряба з різними генотипами за мутацією 2651G>A у локусі *MBL1* статистично достовірної різниці між генотипами та показниками продуктивності тварин не виявлено.

Натомість за мутацією -824A>G в локусі *TNF $\alpha$*  за значеннями показників надою за третю лактацію (AA > GG, AG > GG,  $p < 0,05$ ) і вмісту білка за першу лактацію (AG > GG,  $p < 0,05$ ) в української чорно-рябої породи встановлено статистично достовірну різницю, в української червоно-рябої – тільки за значенням надою за третю лактацію (AG > GG,  $p < 0,05$ ).

Як і для двох вищенаведених локусів, за мутацією 1008A>G у гені *IFNGR2* суттєвої міжпородної різниці між проаналізованими показниками молочної продуктивності корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід залежно від генотипу не спостерігається. За значеннями показників надою для другої лактації в обох популяціях тварин виявлено статистично вірогідну різницю ( $p < 0,05$ ) між генотипами та показниками надою корів, однак для першої та третьої лактацій – вірогідної різниці не встановлено. Достовірності впливу генотипів на величину господарсько цінних ознак (вміст жиру та білка) також не виявлено.

На відміну від інших досліджуваних локусів, в гені *SLC11A1* досліджено дві мутації, що утворюють гаплотипи – CC-AA, CG-AA і CG-AT із дев'яти можливих варіантів. За результатами дослідження продуктивних ознак української червоно-рябої молочної породи із різними гаплотипами за локусом *SLC11A1* (мутації 7400C>G, 7808A>T) з'ясовано, що максимальними значеннями стандартного надою впродовж всіх трьох лактацій характеризуються тварини з гаплотипом CG-AA. Достовірність впливу різних гаплотипів за цим геном на рівень молочної продуктивності (вміст молочного жиру та білка) не виявлено.

Ґрунтуючись на даних стосовно виявленого поліморфізму дослідних генів з показниками молочної продуктивності корів визначено бажані генотипи для дослідних груп великої рогатої худоби. Перспективними у напрямку підвищення молочної продуктивності є наступні комплексні генотипи: *SLC11A1*<sup>CG</sup>*SLC11A1*<sup>AA</sup>, *TNF $\alpha$* <sup>AG</sup>, *IFNGR2*<sup>AG</sup> (українська червоно-ряба молочна); *TNF $\alpha$* <sup>AA</sup> та *IFNGR2*<sup>GG</sup> (українська чорно-ряба молочна).

Зважаючи на аналіз параметрів продуктивності дослідних популяцій

корів з різними генотипами, а також особливості генетичної структури вітчизняних порід корів українська чорно-ряба та червоно-ряба молочна розроблено методичні рекомендації щодо формування популяцій ВРХ з перспективними генотипами за визначеними маркерними мутаціями, які пропонується брати до уваги для розробки спеціальних програм з маркер-асоційованої селекції, для покращення та удосконалення вже наявних селекційних програм та у програмах збереження українського генофонду великої рогатої худоби з метою поліпшення продуктивних ознак.

**Ключові слова:** алель, ген, генотип, популяція, поліморфізм, ампліфікація, рестрикція, велика рогата худоба, локуси кількісних ознак, маркер-асоційована селекція.



## ANNOTATION

**Ivashchenko O. Yu. Genetic diversity of cattle populations by genetic markers associated with disease resistance.** The qualification scientific work on the rights of manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 204 «Technology of production and processing of livestock products». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2023.

The dissertation work presents the results of investigations on toll-like receptor 1 (*TLR1*), toll-like receptor 4 (*TLR4*), membrane protein A1 (*SLC11A1*), tumor necrosis factor  $\alpha$  (*TNF $\alpha$* ), mannose-binding lectin 1 (*MBL1*) and interferon gamma receptor 2 (*IFNGR2*) loci polymorphism and the analysis of productivity parameters of Ukrainian selection breeds of Ukrainian Black-and-White and Ukrainian Red-and-White dairy breeds according to the identified polymorphic loci to preserve the gene pool of these breeds and increase its productivity due to the use of promising PCR-RFLR-markers of economically valuable traits of local cattle breeds.

According to the results of the researches, for the first time, the genetic structure of the experimental cattle populations of Ukrainian Black-and-White and Ukrainian Red-and-White dairy breeds was estimated by marker mutations 1596G>A in the first exon of the *TLR1* gene; 8732G>A, 8834G>C and 2021C>T in the third exon of the *TLR4*; 7400C>G, 7808A>T in the eleventh exon of the *SLC11A1*; -824A>G in the promoter fragment of the *TNF $\alpha$*  gene; 2651G>A in the second exon of the *MBL1* and 1008A>G in the seventh exon of the *IFNGR2*.

During the study of the polymorphism of the toll-like receptor 1 locus by 1596G>A mutation, a similar distribution of the genotype and allele frequencies is shown in experimental populations of cows. Three possible genotypes are found in Ukrainian Black-and-White and Ukrainian Red-and-White dairy breeds, which indicates the polymorphism of this locus. In Ukrainian Black-and-White breed, frequencies of AA, AG, and GG genotypes are 0,12; 0,64; 0,24 respectively; in

Ukrainian Red-and-White – 0,13; 0,54; 0,33; that is, in both populations, the most common is the heterozygous genotype AG. The frequencies of A and G alleles are: in Black-and-White breed – 0,44 and 0,56; in Red-and-White – 0,40 and 0,60 respectively. It is calculated that only the population of Ukrainian Red-and-White dairy breed is in the state of genetic equilibrium, another experimental group of animals demonstrated a deviation from the state of genetic equilibrium by Hardy-Weinberg.

The results of the study demonstrated that in all the experimental populations, the locus *TLR4* by mutations 8732G>A, 8834G>C, and 2021C>T in the third exon was monomorphic. For the MspI polymorphism by 8732G>A mutation, only individuals with genotype BB were found; by 8834G>C (RsaI polymorphism) – with genotype GG; by 2021C>T (BsiHKAI polymorphism) – with genotype CC.

According to results of the study of genetic population parameters of experimental breeds of cattle by 7400C>G (SNP5) mutation of the *SLC11A1* gene, similar results also revealed. It was determined that, in Ukrainian Black-and-White and Ukrainian Red-and-White dairy breeds the predominant genotype is CC with the corresponding frequencies for each of them – 0,66; 0,57. Moreover, animals with the homozygous genotype GG not identified. The most common allele in all cattle breeds is C (0,83-0,79), the frequency of which is the highest in Ukrainian Black-and-White breed. It was calculated that, by the criterion  $\chi^2$ , both dairy breeds are characteristic deviations from genetic equilibrium.

During the study of the polymorphism of the *SLC11A1* locus by 7808A>T (SNP6) mutation, some differences between the genotype and allele frequencies is shown in experimental cattle populations. In both experimental populations of cows, the most common are AA genotype, which frequencies are 0,68 and 0,83 respectively; and TT genotype is not detected at all. As in the case of SNP5, by SNP6 mutation the most dominant allele is A (0,92-0,83), while in Ukrainian Red-and-White dairy breed this indicator is close to complete fixation (0,92). Both experimental populations are in the state of genetic equilibrium.

During the investigation of the haplotype distribution features in the membrane protein A1 gene (*SLC11A1*) in experimental populations CC-AA, CG-AT, CG-AA, CG-TT haplotypes were revealed. In the population of cows of all experimental breeds, the most abundant is CC-AA haplotype, which frequency of Ukrainian Black-and-White and Ukrainian Red-and-White dairy breeds is 0,66 and 0,57 respectively. In addition, in Ukrainian Black-and-White breed haplotype CG-AT is found with an average frequency – 0,32; while in Red-and-White dairy breed the frequency of this haplotype is much lower – 0,17. At the same time, haplotype CG-TT is absent in both experimental populations, despite the fact that, according to theoretical calculations, all four variants of haplotypes are expected in the studied groups of cows.

According to results of the polymorphism of the tumor necrosis factor  $\alpha$  locus by -824A>G mutation, significant differences between experimental populations of cows in the genotypes and alleles frequencies revealed. It was determined that, in Black-and-White breed the frequencies of homozygous genotypes are found at a fairly low level and with the same indicators (AA = GG = 0,17), while in Red-and-White dairy breed, the frequency of the genotype GG is 3,5 times higher compared to the genotype AA. The frequencies of alleles A and G are: in Black-and-White breed – 0,5 and 0,5; in Red-and-White – 0,39 and 0,61 respectively. In the population of Ukrainian Black-and-White breed, there is a deviation from the Hardy-Weinberg genetic equilibrium, while Red-and-White dairy breed is in the state of genetic equilibrium.

The results of the study demonstrated that in both the experimental populations, the mannose-binding lectin gene by mutation 2651G>A in the second exon is polymorphic. Frequencies of AA, AG and GG genotypes were determined in Black-and-White breed – 0,35; 0,57 and 0,08; and in Red-and-White breed – 0,13; 0,76 and 0,11 respectively. That is, the most widespread in two populations is the genotype AG, the frequency of which in cattle populations is higher than the average level. Frequencies of A and G alleles are: in Black-and-White breed – 0,63 and 0,37; in Red-and-White breed – 0,51 and 0,49 respectively. It was revealed,

that in Red-and-White breed, a significant increase in the number of heterozygotes and a decrease in homozygotes is observed, which led to a significant violation of the state of genetic equilibrium according to Hardy-Weinberg, while Black-and-White breed has no deviations from the equilibrium state.

The study of genetic structure of the populations of Ukrainian Black-and-White and Red-and-White dairy breeds by 1008A>G mutation in the seventh exon of the interferon gamma-receptor 2 locus indicate a similar trend in the distribution of genotype and allele frequencies between experimental groups of animals. It was determined, that in both populations, the predominant genotype is AG with almost the same frequency – 0,51 (Black-and-White) and 0,53 (Red-and-White), the frequency of homozygotes AA is 0,388 and 0,47 respectively. In addition, the genotype GG was absent in Red-and-White breed, whereas its share in Black-and-White breed was quite small – 0,102. The most common allele in two experimental populations is allele A (0,64 – Black-and-White, 0,74 – Red-and-White). Only the Ukrainian Black-and-White breed is in the state of genetic equilibrium, Ukrainian Red-and-White breed, on the contrary, is characteristic a high deviation of this indicator.

According to the results of conducted comparative analysis of population-genetic parameters of two experimental populations of Ukrainian Black-and-White and Red-and-White dairy breeds on five genes (*TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1*, *IFNGR2*), it was determined that significant differences between the experimental groups of cows are not observed. The cattle populations of the observed breeds for all studied mutations are polymorphic. An exception is the toll-like receptor 4 gene, which is monomorphic. Ukrainian Black-and-White breed by the *SLC11A1* (7808A>T), *MBL1* and *IFNGR2* loci; and Red-and-White dairy breed by *TLR1*, *SLC11A1* (7808A>T) and *TNF $\alpha$*  loci are in the state of genetic equilibrium; at other loci, there is a deviation of the actual ratio of genotype frequencies from the expected one, that is, from the state of equilibrium, which indicates the effect of selection or gene drift.

Predominant genotypes in Ukrainian Black-and-White breed are: AG (0,64)

by mutation 1596G>A (*TLR1*), CC (0,66) – by 7400C>G (*SLC11A1*), AA (0,68) – by 7808A>T (*SLC11A1*); AG (0,66) – by mutation -824A>G (*TNF $\alpha$* ); AG (0,57) – by mutation 2651G>A (*MBL1*); AG (0,51) – by 1008A>G (*IFNGR2*). Alleles are characterized by the highest frequencies: G (0,56) by mutation 1596G>A (*TLR1*), C (0,83) by 7400C>G (*SLC11A1*), A (0,84) by 7808A>T (*SLC11A1*), A (0,64) – by 2651G>A (*MBL1*) and A (0,63) – by 1008A>G (*IFNGR2*), that also indicates the similarity of the experimental breeds. The average values of observed and expected heterozygosity, as well as the effective number of alleles for the studied groups of animals are almost indistinguishable, moreover, the parameter of observed heterozygosity exceeded the expected value. The values of  $F_{is}$  indicate a slightly higher level of outbreeding of Red-and-White dairy breed population compared to Black-and-White breed. In general, the obtained results indicate that there is the probable genetic drift against the background of the use of artificial selection in a few artificial populations of experimental breeds of cows for marker mutations 1596G>A in the *TLR1* gene; 7400C>G in the *SLC11A1* gene; 7808A>T in *SLC11A1*; -824A>G in *TNF $\alpha$* ; 2651G>A in *MBL1* and 1008A>G in *IFNGR2*.

The analysis of productivity traits of experimental cattle populations with different genotypes by *TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* and *IFNGR2* loci was conducted. As the result of the genotypes associations study by 1596G>A mutation in the *TLR1* gene with the milk yield, it was established that in Black-and-White breed the dominant trait values for the first lactation are associated with the heterozygous genotype AG, for the third – with the genotype AA, whereas in Red-and-White dairy breed, on the contrary, homozygous individuals with the genotype GG had the maximum trait values for the first and third lactations. The nature of identified connections indicates the breed-specificity of 1596G>A mutation as a marker of cattle milk productivity.

According to the results of the analysis of productive traits of cows of Ukrainian Black-and-White and Red-and-White dairy breeds depending on the genotype by the 2651G>A mutation in the *MBL1* locus, statistically significant differences between the genotypes and animal productivity indicators are not

detected.

Instead, by -824A>G mutation in the *TNF $\alpha$*  locus, according to the values of milk yield indicators for the third lactation (AA > GG, AG > GG,  $p < 0.05$ ) and protein content in milk for the first lactation (AG > GG,  $p < 0, 05$ ) statistically significant differences were established in Ukrainian Black-and-White breed, in Red-and-White breed – only for milk yield for the third lactation (AG > GG,  $p < 0.05$ ).

As for the two loci mentioned above, by 1008A>G mutation in the *IFNGR2* gene, there are no significant interbreed differences between the genotypes and analyzed parameters of milk productivity of both experimental breeds of cows. There are established statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) between groups of individuals with different genotypes for the second lactation by the parameter of milk yield in both experimental cattle populations. However, significant associations for the first and third lactations are not detected. According to the results of the analysis of significant influence of genotypes on economically valuable traits (fat and protein content) are also not revealed.

*SLC11A1* is characterized by a characteristic difference from the previous genes, as two mutations forming haplotypes – CC-AA, CG-AA and CG-AT out of nine potentially possible variants are found in this locus. According to the results of the study of associations of productive qualities of Ukrainian Red-and-White dairy breed with different haplotypes by the *SLC11A1* locus (7400C>G, 7808A>T mutations), animals with the CG-AA haplotype had higher values of standard milk yield compared to other haplotypes during all three lactations (the difference is probable). The greatest differences are observed with the CG-AT haplotype. According to the parameters of the content of milk protein and fat, probable differences between individuals with different haplotypes are not established.

Based on the data about the revealed experimental genes polymorphisms with certain cattle productivity indicators, the desired genotypes for the experimental groups of cows were determined. Promising in the direction of increasing milk productivity are *TNF $\alpha$ <sup>AA</sup>* and *IFNGR2<sup>GG</sup>* for Ukrainian Black-and-

White breed; *SLC11A1*<sup>CG</sup>*SLC11A1*<sup>AA</sup>, *TNF $\alpha$* <sup>AG</sup>, *IFNGR2*<sup>AG</sup> – for Ukrainian Red-and-White dairy breed.

Considering the analysis of productivity parameters of experimental populations of cows with different genotypes, as well as features of the genetic structure of the local breeds of cattle of Ukrainian Black-and-White and Red-and-White dairy breeds, methodological recommendations for the formation of cattle populations with promising genotypes based on certain marker mutations were developed, which are proposed to take into account in the development of specialized marker-assisted selection programs, the improvement of already existing breeding programs and conservation programs for Ukrainian cattle gene pool to improve productive traits of cows of Ukrainian selection.

**Key words:** allele, gene, genotype, population, polymorphism, amplification, restriction, cattle, quantitative traits loci, marker-assisted selection.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Стаття у науковому фаховому виданні, включеному до міжнародних наукометричних баз даних Web of Science Core Collection та/або Scopus

1. Kulibaba R., Liashenko Yu., **Ivashchenko O.** Polymorphism of TLR1, TLR4, and SLC11A1 genes in populations of different cattle breeds of Ukrainian selection. *Agricultural Science and Practice*. 2021. № 8 (3). P. 25–34. *(Здобувачем здійснено узагальнення результатів та підготовка частини тексту публікації).*

### Статті у наукових фахових виданнях України

2. **Іващенко О. Ю.**, Кулібаба Р.О. Параметри молочної продуктивності корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами за локусами *TLR1* та *CSN2*. *Таврійський науковий вісник. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2022. № 126. С. 114–121. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, аналіз результатів та написання статті).*

3. **Ivashchenko O.**, Kulibaba R. Productivity of cows of the Ukrainian red-spotted dairy breed with different genotypes according to the TLR1, SLC11A1 and CSN2 loci. *Ukrainian Black Sea Region Agrarian Science*. 2022. № 26 (2). P. 35–42. *(Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, проводив статистичну обробку та аналіз даних, узагальнення результатів та підготовку частини тексту публікації).*

4. **Іващенко О. Ю.**, Ляшенко Ю. В., Кулібаба Р. О. Аналіз молочної продуктивності корів порід української селекції з різними генотипами за локусом *IFNGR2*. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Тваринництво*. 2022. № 2 (49). С. 14–19. *(Здобувачем проведено збір*



*первинних даних, їх біометричну обробку та аналіз, узагальнення результатів, оформлення статті).*

### **Додатково відображають наукові результати дисертації**

5. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В., **Іващенко О. Ю.**, Альшамайлех Х. С. Поліморфізм локусів кількісних ознак у популяціях корів молочних порід української селекції: монографія. Київ: НУБіП України, 2022. – 268 с. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень, здійснював статистичну обробку та аналіз даних, узагальнення результатів та підготовку частини тексту публікації).*

### **Наукові праці апробаційного характеру**

6. **Іващенко О. Ю.**, Афанасенко В. Ю. Обґрунтування стандартів якості молока в Україні та ЄС. Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми: 73 Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, м. Київ, 3–4 квітня 2019 року: тези доповіді. К., 2019. С. 256–259. *(Здобувачем опрацьовано наукову літературу, проведено її аналіз та узагальнення, написано тези доповідей).*

7. **Іващенко О. Ю.**, Афанасенко В. Ю. Основні фактори впливу на прояв клінічного маститу в молочному скотарстві. Наукові і технологічні виклики тваринництва у ХХІ столітті: Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 90-річчю від дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора, академіка УААН і РАН Г. О. Богданова, м. Київ, 12–14 березня 2020 року: тези доповіді. К., 2020. С. 42–47. *(Здобувачем опрацьовано наукову літературу та проведено її аналіз і узагальнення, написано тези доповідей).*

8. **Іващенко О. Ю.**, Кулібаба Р. О. Бактеріальне забруднення як один

з основних факторів зниження якості молочної продукції в Україні. Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 90-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора О. Д. Бугрова: м. Харків, 16-17 вересня, 2020: тези доповіді, Х., 2020. С. 58–61. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел та їх узагальнення, написано тези доповідей).*

9. **Іващенко О. Ю.** Деякі питання щодо практичних підходів до профілактики маститу корів. Актуальні питання технологій тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали Всеукраїнської науково-практичної інтернет конференції, присвяченої 100-річчю факультету технологій продукції тваринництва та менеджменту: м. Харків, 2020: тези доповіді, РВВ ХДЗВА, 2020. С. 76–81.

10. **Іващенко О. Ю.,** Кулібаба Р. О. Перспективи використання генів родини TLR в маркер-асоційованій селекції у скотарстві. Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми: 75 Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, м. Київ, 25–26 березня 2021 року: тези доповіді. К., 2021. С. 126–128. *(Здобувачем здійснено узагальнення наукових літературних джерел та написано тези доповідей).*

11. **Іващенко О.** Аналіз взаємозв'язку показника кількості соматичних клітин молока корів з параметрами бактеріальної контамінації. Міжнародний симпозіум зі зменшення біологічної загрози (IBTRS) 2021 року: збірник тез. Україна, 2021. С. 189.

12. **Іващенко О. Ю.,** Кулібаба Р. О. Алельні варіанти гену SLC11A1 як маркери резистентності до інфекційних захворювань молочної худоби. Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 90-річчю від дня народження доктора економічних наук, професора, академіка УААН А. О. Омеляненка: м. Харків, 26-27 серпня,

2021: тези доповіді, Х., 2021. С. 54–56. *(Здобувачем проведено збір первинних даних, виконано експериментальні дослідження, узагальнення результатів, написано тези доповідей).*

13. **Іващенко О. Ю.**, Кулібаба Р. О. Використання методів біоінформаційного аналізу для оптимізації параметрів ампліфікації за локусами *TNF $\alpha$*  та *SLC11A1*. Сучасна наука: стан та перспективи розвитку тваринництва України в умовах Євроінтеграції: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції: м. Херсон, ХДАУ, 23 вересня 2021: тези доповіді, Х., 2021. С. 29–32. *(Здобувачем проведено біоінформаційний аналіз, узагальнення результатів, написано тези доповідей).*

14. **Іващенко О. Ю.**, Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В. Генетична структура популяції корів сірої української породи за локусами кількісних ознак. Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми: 76 Всеукраїнська науково-практична конференція, м. Київ, 18–19 травня 2022 року: тези доповіді. К., 2022. С. 116–118. *(Здобувачем виконано частину експериментальних досліджень, здійснено узагальнення літературних джерел та написано тези доповідей).*

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ .....	2
ANNOTATION .....	9
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ.....	23
ВСТУП .....	24
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	30
1.1 Маркер-асоційована селекція в розведенні великої рогатої худоби .....	30
1.2 Поліморфізм локусів кількісних ознак – основа маркер-асоційованої селекції .....	34
1.2.1 Поліморфізм генів родини Toll-подібних рецепторів ( <i>TLR</i> ), їх асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин .....	36
1.2.2 Поліморфізм гена <i>SLC11A1</i> , його асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин .....	40
1.2.3 Поліморфізм гена <i>TNF<math>\alpha</math></i> , його асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин .....	45
1.2.4 Поліморфізм гена <i>MBL1</i> , його асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин .....	50
1.2.5 Поліморфізм гена <i>IFNGR2</i> , його асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин .....	52
1.3 Перспективи використання маркер-асоційованої селекції в молочному скотарстві .....	56
1.4 Обґрунтування напряму власних досліджень .....	60
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	62
2.1 Місце проведення і матеріал досліджень .....	62
2.2 Перелік використаного обладнання .....	64

	21	
2.3 Методики та методи досліджень .....	65	
2.4 Біоінформаційні методи аналізу нуклеотидних послідовностей .....	69	
2.5 Аналіз генетико-популяційних показників дослідних порід корів .....	69	
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ		
ДОСЛІДЖЕНЬ.....		72
3.1 Аналіз ефективності генотипування за локусами кількісних ознак та оптимізація методів проведення ампліфікації за використання біоінформатики.....	73	
3.2 <i>VclI</i> -поліморфізм у першому екзоні гена <i>TLR1</i> .....	81	
3.3 Поліморфізм гена <i>TLR4</i> .....	86	
3.3.1 <i>MspI</i> -поліморфізм у третьому екзоні гена <i>TLR4</i> (8732G>A).....	86	
3.3.2 <i>RsaI</i> -поліморфізм у третьому екзоні гена <i>TLR4</i> (8834G>C) .....	89	
3.3.3 <i>VsiHKA1</i> -поліморфізм у третьому екзоні гена <i>TLR4</i> (2021C>T).....	91	
3.4 <i>PstI</i> -поліморфізм в одинадцятому екзоні гена <i>SLC11A1</i> .....	93	
3.5 <i>SacI</i> -поліморфізм промоторної ділянки гена <i>TNF<math>\alpha</math></i> .....	100	
3.6 <i>StyI</i> -поліморфізм у другому екзоні гена <i>MBL1</i> .....	105	
3.7 <i>VsiHKA1</i> -поліморфізм у сьомому екзоні гена <i>IFNGR2</i> .....	110	
3.8 Порівняльний аналіз генетичної структури української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід за локусами <i>TLR1</i> , <i>TLR4</i> , <i>SLC11A1</i> , <i>TNF<math>\alpha</math></i> , <i>MBL1</i> та <i>IFNGR2</i> .....	116	
3.9 Продуктивні якості корів української селекції з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами.....	125	
3.9.1 Продуктивні ознаки корів української чорно-рябої молочної породи із різними генотипами за локусами <i>TLR1</i> , <i>TNF<math>\alpha</math></i> , <i>MBL1</i> та <i>IFNGR2</i> .....	126	
3.9.2 Продуктивні ознаки корів української червоно-рябої молочної породи із різними генотипами за локусами <i>TLR1</i> , <i>SLC11A1</i> , <i>TNF<math>\alpha</math></i> , <i>MBL1</i> та <i>IFNGR2</i>	135	

3.10 Порівняльний аналіз параметрів продуктивності дослідних популяцій корів із різними генотипами за виявленими поліморфними локусами.....	146
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	151
ВИСНОВКИ.....	167
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ .....	169
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	170
ДОДАТКИ.....	200

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

- MAS – маркер-асоційована селекція, маркер-допоміжна селекція;
- TLR – Toll-поподібні рецептори;
- SLC11A1* – ген мембранного білка, що належить до родини іонних транспортерів;
- TNF $\alpha$*  – ген фактора некрозу пухлини  $\alpha$ ;
- MBL1* – ген манозозв'язувального лектину;
- IFNGR2* - ген інтерферону гамма-рецептора 2;
- PCR-RFLP – полімеразна ланцюгова реакція - поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів;
- PCR – полімеразна ланцюгова реакція;
- RFLP – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів;
- SNP – однонуклеотидний поліморфізм;
- SSR – короткі прості послідовності;
- MAP-інфекція – інфекція, збудником якої є *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*;
- SCS – кількість соматичних клітин;
- PAMP – патоген-асоційовані молекулярні патерни;
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
- ПЛР-ПДРФ – полімеразна ланцюгова реакція – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів;
- п.н. – пар нуклеотидів.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Останнім часом у практичній роботі, пов'язаній з сільським господарством, дедалі частіше застосовуються методичні підходи маркер-асоційованої селекції, що представляє собою використання ДНК-маркерів, тісно зчеплених з локусами, які детермінують господарсько корисні ознаки, що дає змогу здійснювати відбір тварин за генотипом, виключаючи фактори впливу довкілля. За даними вітчизняних та зарубіжних авторів використання молекулярно-генетичних маркерів розширило межі можливостей отримання результату у різних галузях тваринництва (скотарства, свинарства, птахівництва тощо) та сільськогосподарському виробництві, що дозволяє значно прискорювати процес селекції [1-8]. Крім того, ДНК-маркери стали дієвим способом для покращення господарсько цінних ознак тварин [9, 10].

З розвитком нових технологій та методів молекулярного маркування, генетичні маркери можуть застосовуватись на різних етапах селекційних програм, що дає можливість зробити істотний внесок у вивчення природи локусів кількісних ознак (QTL). Дослідження поліморфізму функціональних генів у різних видів сільськогосподарських тварин потрібно для вирішення питань оцінки генетичного різноманіття популяцій та аналізу асоціацій з господарсько цінними ознаками у межах конкретних порід і популяцій [11, 12]. Аналіз генетичної структури популяцій різних видів тварин, зокрема великої рогатої худоби дає можливість виявляти породоспецифічні характеристики генофондів [13], а також досліджувати механізми їх утворення та особливості дрейфу генів від предків до існуючої породи [14]. Одним із основних напрямів генетичного удосконалення тварин є використання ДНК-маркерів, завдяки яким можна проводити точну ідентифікацію генів особин, що несуть бажані фенотипові особливості та виявляти породоспецифічні алелі структурних генів [15]. Зараз відомо про велику кількість маркерних мутацій у різних генах-кандидатах великої



рогатої худоби, однак поряд з накопиченням інформації про структуру геному, постійно продовжується пошук нових, більш ефективних і зручних маркерів для проведення генетичного аналізу тварин. В той же час, в межах вітчизняних порід корів переважна більшість із них досі не вивчалась.

Поряд з вирішенням питань щодо продуктивних якостей тварин певної уваги потребує проблема оцінки адаптаційних параметрів. З цієї точки зору, у світовій практиці до перспективних генів-кандидатів належать локуси толл-подібного рецептору 1 (*TLR1*); толл-подібного рецептору 4 (*TLR4*); мембранного білка A1 (*SLC11A1*), фактора некрозу пухлини  $\alpha$  (*TNF $\alpha$* ), манозозв'язувального лектину 1 (*MBL1*) і гамма-рецептора інтерферону 2 (*IFNGR2*), у межах яких встановлено наявність низки мутацій, що асоційовані з господарсько корисними ознаками [16-20]. В популяціях ВРХ української селекції поліморфізм генів *TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2*, а також продуктивні показники особин з різними генотипами до цього часу не вивчено, що визначає актуальність і новизну теми дисертаційного дослідження та його науково-практичне значення.

За результатами численних досліджень доведено, що різні алельні варіанти вищезазначених генів безпосередньо асоційовані з адаптаційними якостями великої рогатої худоби, у першу чергу, з резистентністю до захворювань. Ці дані приводять до питання стосовно частотного розподілу алелей і генотипів в популяціях корів різних порід української селекції. Крім того, алельні варіанти зазначених генів можуть бути як нейтральними, так і асоційованими з резистентністю до захворювань різної етіології, тобто характеризуватися підвищеними адаптаційними властивостями і, в той же час, проявляти контрпродуктивні якості в розрізі господарсько корисних ознак. Тому, проводячи селекційну роботу, спрямовану на підвищення саме адаптаційних якостей ВРХ, необхідно приймати до уваги потенційний контрпродуктивний характер досліджуваних локусів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**  
Науково-дослідна робота виконувалась як складова частина НДР за темою

«Закономірності мікроеволюційних процесів у популяціях великої рогатої худоби вітчизняних порід за використання специфічних генетичних маркерів» (№ державної реєстрації 0121U108585, 2021-2025 рр.).

**Мета і завдання дослідження.** Мета дисертаційної роботи – дослідити генетичну структуру популяцій корів різних порід української селекції (українська чорно-ряба та українська червоно-ряба молочні породи) за локусами *TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2* та визначити параметри продуктивності особин з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами.

Для досягнення мети поставлено наступні завдання:

- провести аналіз ефективності запропонованих методів визначення поліморфізму локусів *TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2* за використання біоінформаційних підходів;
- визначити поліморфізм генів толл-подібних рецепторів 1 і 4, мембранного білка A1, фактора некрозу пухлини  $\alpha$ , манозозв'язувального лектину 1, гамма-рецептора інтерферону 2 в дослідних популяціях корів;
- провести порівняльний аналіз генетичної структури популяцій за дослідними локусами;
- визначити параметри молочної продуктивності корів з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами;
- розробити формули перспективних комплексних генотипів для популяцій корів досліджуваних порід.

*Об'єкт дослідження* – поліморфізм генів *TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2* та продуктивність корів порід українська чорно-ряба молочна і українська червоно-ряба молочна.

*Предмет дослідження* – генетико-популяційні параметри дослідних груп корів, частоти генотипів й алелів виявлених локусів популяцій корів української чорно-рябої та української червоно-рябої порід, параметри молочної продуктивності ВРХ.

*Методи дослідження: молекулярно-генетичні* – екстракція ДНК, проведення ампліфікації, рестрикції та електрофорезу дослідних фрагментів, *генетико-популяційні* – обчислення частот генотипів та алелів, показників фактичної та очікуваної гетерозиготності, індексу фіксації Райта, ефективної кількості алелів, оцінка відповідності розподілу частот генотипів стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом; *зоотехнічні* – визначення показників молочної продуктивності великої рогатої худоби (надій, вміст жиру та білка в молоці); *статистичні* – загальноприйняті параметричні (t-критерій, дисперсійний аналіз) і непараметричні (U-критерій Манна-Уїтні та Краскела-Уоліса) методи порівняння вибірок, дескриптивна статистика.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше визначено особливості генетичної структури та генетико-популяційних показників вітчизняних популяцій корів порід українська чорно-ряба молочна і українська червоно-ряба молочна за генами *TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2*.

Вперше визначено показники молочної продуктивності корів вітчизняної селекції української чорно-рябої та української червоно-рябої молочних порід з різними генотипами за маркерними мутаціями у локусах толл-подібного рецептора 1 (1596G>A), мембранного білка A1 (7400C>G і 7808A>T), фактора некрозу пухлини  $\alpha$  (-824A>G), манозозв'язувального лектину (2651G>A) та інтерферону гамма-рецептора 2 (1008A>G). Розроблено формули бажаних комплексних генотипів за виявленими поліморфними локусами для кожної з порід корів.

**Практичне значення одержаних результатів.** За результатами дисертаційної роботи визначено перспективні гени-кандидати для популяцій корів порід українська чорно-ряба молочна і українська червоно-ряба молочна: *SLC11A1* (7400C>G і 7808A>T в одинадцятому екзоні); *TNF $\alpha$*  (-824A>G у промоторному фрагменті гена) та *IFNGR2* (1008A>G в сьомому екзоні). Отримані експериментальні дані щодо особливостей генетичної структури корів української селекції та продуктивних ознак ВРХ з різними

генотипами за виявленими поліморфними локусами доцільно використовувати в селекційних програмах молочного скотарства та у програмах збереження вітчизняного генофонду корів.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем самостійно відібрано і проаналізовано наукові літературні джерела; опановано методичні підходи; проведено лабораторні дослідження та обробку вихідних даних; здійснено статистичний аналіз, описано та узагальнено отримані результати досліджень; сформульовано висновки і пропозиції виробництву; підготовлено наукові публікації до друку; оформлено рукопис дисертації. Спільно з науковим керівником визначені напрям, мета і завдання дисертаційного дослідження, розроблено методику та схему її виконання. Використання матеріалів спільних досліджень, в яких безпосередньо брав участь автор, погоджено зі співавторами. Отримані наукові результати, що виносяться на захист, є особистим досягненням автора.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені автором на: засіданнях кафедри біології тварин факультету тваринництва та водних біоресурсів і Науково-дослідного інституту технологій та якості продукції тваринництва і рибництва НУБіП України; 73-ій Всеукраїнській науково-практичній конференції (Київ, 2019); Міжнародній науково-практичній конференції «Наукові і технологічні виклики тваринництва у XXI столітті» (Київ, 2020); XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених (Харків, 2020); Всеукраїнській науково-практичній інтернет конференції «Актуальні питання технологій тваринництва та ветеринарної медицини» (Харків, 2020); 75-ій Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми» (Київ, 2021); XV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених (Харків, 2021); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасна наука: стан та перспективи розвитку тваринництва України в умовах Євроінтеграції» (Херсон, 2021); 76-ій

Всеукраїнській науково-практичній конференції (Київ, 2022).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць (з них 2 – одноосібні), серед яких 1 – у науковому фаховому виданні України, включеному до міжнародних наукометричних баз даних Web of Science Core Collection, 3 – у наукових фахових виданнях України, 1 – колективна монографія, 9 робіт апробаційного характеру у періодичних виданнях та збірниках конференцій.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається з анотацій; переліку умовних позначень і скорочень; вступу; огляду літератури; матеріалів і методів досліджень; результатів власних експериментальних досліджень; аналізу і узагальнення результатів досліджень; висновків; пропозицій виробництву; списку використаних джерел, додатків. Дисертаційну роботу викладено на 206 сторінках комп'ютерного тексту, що містить 42 рисунки та 26 таблиць. Список використаних джерел містить 220 джерел, у тому числі 179 латиницею.

## РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Маркер-асоційована селекція в розведенні великої рогатої худоби

Селекційно-племінна робота в скотарстві здійснюється впродовж досить тривалого часу з метою формування більш продуктивних порід тварин, що згодом використовуються для м'ясного і молочного виробництва. Саме завдяки розвитку цієї галузі з'являються нові методи з організації виробництва в сфері тваринництва та отримання більшого обсягу якісної м'ясної чи молочної продукції. В цілому проведення селекційної роботи являє собою чітку та послідовну облікову систему, в якій знаходиться детальна інформація по кожній тварині на підприємстві. Для успішного проведення селекційно-племінної роботи необхідні: правильний вибір породи, стабільне повноцінне годування тварин, добре організований зоотехнічний і племінний облік, щорічні бонітування, перспективний план племінної роботи зі стадом, аналіз генетичної структури популяцій та стад корів, індивідуальне типування особин за комплексом ознак [21]. Все вищенаведене можна поділити на дві функціональні частини – забезпечення умов утримання тварин та аналіз генетичних факторів (порода, генетико-популяційна характеристика, індивідуальне типування особин, аналіз асоціацій виявлених поліморфних локусів із показниками продуктивності тварин).

У даний час розвиток тваринництва складно уявити без використання методів оцінки продуктивних ознак сільськогосподарських тварин, які ґрунтуються на безпосередньому аналізі спадкової інформації. Сучасна біотехнологія сільськогосподарських виробництв, фактично, заснована на розвитку генної інженерії [22]. Дослідження поліморфізму різних цільових генів є необхідною умовою для впровадження перспективних напрямків у

вже існуючі ДНК-технології в селекції сільськогосподарських тварин [23].

Серед усіх інших видів сільськогосподарських тварин одним з найкраще вивчених об'єктів у молекулярно-генетичному аспекті є велика рогата худоба. Більшість відомих нині молекулярно-генетичних маркерів продуктивності виявлено саме у корів. Значна кількість цих маркерів пов'язана з параметрами молочної продуктивності, оскільки дана кількісна ознака детермінується багатьма генами. Ці гени (QTL) зв'язані у функціональні блоки завдяки особливостям фізіологічних функцій, які виконуються продуктами їх експресії (білками). Різні комплексні поєднання алельних варіантів функціональних генів варіативно впливатимуть на характеристики молочної продуктивності ВРХ [24].

Переважає більшість господарсько цінних ознак ВРХ є кількісними та детермінуються великою кількістю генів, які проявляють малий ефект (полігени) і здебільшого піддаються впливу факторів довкілля. З розвитком молекулярно-генетичних технологій розроблено маркерні системи, що дають можливість безпосередньо досліджувати генетико-популяційну структуру різних видів тварин. В такий спосіб стає можливим проводити відбір тварин безпосередньо за генотипом, тобто поряд з традиційними методами селекції застосовувати маркер-асоційовану селекцію або селекцію за допомогою маркерів (Marker-Assisted Selection, MAS), яка на сьогодні є найбільш ефективним інструментом у племінній роботі у скотарстві [25]. Суть даного напрямку досліджень – виявлення генів чи послідовностей ДНК, генетично тісно зчеплених з «головними» генами господарсько цінних ознак, в прямому маркуванні генів, що спричиняють основну роль у розвитку вроджених патологій чи стійкості до різних захворювань. Основним завданням селекціонерів в послідовній оцінці генотипу тварин є аналіз передачі спадковості від батьків потомству з урахуванням генетичних законів комбінування генів в ооцитах і сперміях та ймовірності процесів при формуванні зиготи [26, 27].

Необхідною передумовою будь-якого варіанту MAS є інструментарій

молекулярно-генетичних маркерів. В якості молекулярно-генетичного маркеру може бути будь-який фрагмент ДНК, що використовується для виявлення поліморфізму та у деяких випадках може перебувати у фактичному зв'язку з геном, який має відношення до аналізованої ознаки [28]. За використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів можна досліджувати особливості генетичної структури дослідних популяцій тварин в цілому та великої рогатої худоби зокрема. В скотарстві молекулярно-генетичні маркери застосовують для оцінки ступеня генетичного різноманіття окремих стад і порід, проведення лінійної диференціації і консолідації різних порід та популяцій, контролю і регуляції процесів породотворення, встановлення ступеня чистопородності тварин, що є особливо важливим при закладенні генеративного матеріалу від представників аборигенних і зникаючих порід [10].

ДНК-маркери характеризуються цілою низкою переваг порівняно з іншими типами генетичних маркерів: можливість використання для аналізу будь-яких типів тканин та органів на будь-якій стадії розвитку, множинність алелів, кодомінантність успадкування, відсутність плейотропного ефекту, можливість проведення ретроспектральних досліджень тощо. Для визначення поліморфізму ДНК використовують два основних методи: аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) із застосуванням блот-гібридизації та методи, в основі яких лежить полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [29].

Дослідження особливостей генетичної структури популяцій різних порід корів за допомогою молекулярно-генетичних маркерів проводяться в багатьох країнах на різноманітних об'єктах [30]. Мікросателітні маркери використовують з метою паспортизації порід і ліній сільськогосподарської худоби, а також для проведення її ідентифікації та філогенетичних досліджень (порівняльного аналізу) [31]. Однак, для вирішення завдань MAS в першу чергу застосовують маркери, пов'язані з поліморфізмом саме цільових генів, оскільки цей методичний підхід дає змогу використовувати



результати досліджень у різних селекційних програмах задля отримання більш продуктивних порід та експериментальних популяцій тварин [32, 33]. У цьому плані найпоширенішими маркерними системами у скотарстві є PCR-RFLP та Indel, ефективність використання яких у селекційному процесі визначається низкою факторів. Однією з ключових складових є правильний вибір об'єкта дослідження. У цьому випадку виправданою мішенню можна назвати функціональні гени, продукти яких можуть бути пов'язані з проявом господарсько корисних ознак ВРХ (параметри молочної продуктивності) [34]. Відносно даного напрямку проведено доволі багато робіт із залученням таких генів, як пролактин, гормон росту, казеїни молока, толл-подібні рецептори 1 і 4, *SLC11A1*, інтерферон гамма-рецептор 2 та інші [17, 35-36].

Значну увагу в генетиці молочного скотарства приділяють питанням поліморфізму генів та визначенню їх бажаних алельних варіантів, пов'язаних з продуктивними ознаками ВРХ [37, 38]. Згідно із загальноприйнятими методиками дослідницької роботи, після аналізу генетичної структури за обраним об'єктом необхідно переходити до встановлення асоціації між різними алельними варіантами поліморфних локусів і показниками продуктивності тварин, а також їх адаптивної здатності та стійкості до різних захворювань [17, 38]. Тому слід враховувати породну специфічність кожного маркера, що унеможлиблює проведення простого копіювання результатів, отриманих для однієї породи тварин, на інші породи, як це вже було продемонстровано вище на прикладі феномена «породної специфічності» маркерів.

Протягом останніх років опрацьовано теоретичні відомості та практичні підходи стосовно проведення маркер-асоційованої селекції локальних порід корів, отримано дані щодо ДНК-поліморфізму різних генів-кандидатів і генетичної мінливості українських популяцій ВРХ. Втім, дана задача не може бути остаточно розв'язана через великий об'єм нового матеріалу для досліджень. З огляду на це, цілком актуальним є питання проведення подальших досліджень за використання наявних методичних

підходів, що дасть змогу доповнювати та оновлювати вже наявні дані в генетиці великої рогатої худоби.

## **1.2 Поліморфізм локусів кількісних ознак – основа маркер-асоційованої селекції**

Одним з ключових досягнень молекулярної генетики, що дозволяє здійснювати ефективний відбір тварин за продуктивними якостями, є селекція із використанням молекулярних маркерів. Даний метод ґрунтується на аналізі тварин за використанням ДНК-маркерів, які, у першу чергу, асоційовані з господарсько корисними ознаками [39].

Ідентифікація генів, пов'язаних з локусами кількісних ознак сільськогосподарських тварин, стала можливою завдяки використанню сучасних методичних підходів молекулярної генетики, зокрема маркер-асоційованої селекції. Аналіз тварин за генотипом дозволяє визначити дійсний генетичний потенціал особин незалежно від фізіологічного стану, віку, породи чи статі тварини. За рахунок розвитку ДНК-технологій розроблено багато типів молекулярно-генетичних маркерів, які дозволяють вирішувати різні генетичні та селекційні задачі. Гени безпосередньо пов'язані з формуванням господарсько цінних ознак великої рогатої худоби, тому оцінка тварин за допомогою генетичних маркерів вкрай важлива для ознак, які фенотипово проявляються протягом всього життя (надій молока, вміст білка та жиру в молоці, приріст м'язової маси) [40]. Прогнозувати бажані ознаки сільськогосподарських тварин, а також проводити спрямовану селекцію можна саме завдяки використанню ДНК-маркерів.

Методи MAS наразі активно застосовуються у країнах з розвинутим тваринництвом: США, Німеччині, Франції, Італії, Бельгії, Голландії, Австрії, а багаторівнева система молекулярно-генетичної сертифікації тварин є, фактично, обов'язковою в селекційно-племінній роботі. Згідно з міжнародними вимогами, рекомендаціями ISAG/FAO, ICAR та закону «Про

племінну справу у тваринництві» з метою забезпечення контролю генетичної якості генетичних ресурсів при відтворенні, експорті, імпорті та підвищенні економічної ефективності галузі в Україні є необхідність у розробленні та впровадженні системи молекулярно-генетичної ідентифікації тварин, покращення їх генетичного потенціалу. Ідентифікація генів та мутацій, які визначають напрям і ступінь розвитку кількісної ознаки тварин у країнах з розвиненим тваринництвом забезпечує отримання значних прибутків завдяки швидкому досягненню генетичного прогресу, основними складовими якого є інтенсивність селекції, її точність та можливість прогнозування [10].

У вирішенні питання удосконалення вітчизняного генофонду порід великої рогатої худоби значну і щораз більшу роль відіграють молекулярно-генетичні методи досліджень, які суттєво змінюють підходи до раннього прогнозування продуктивних якостей тварин [41, 42]. Найбільш інформативними в цьому напрямку є ДНК-маркерні системи, засновані на аналізі поліморфізму структурних генів, що беруть участь у формуванні та функціонуванні господарсько корисних ознак. До одних із найпоширеніших об'єктів належать гени білків молока, які значно впливають на якість молочної продукції; гени, продукти яких є гормонами, що беруть участь в регуляції обміну речовин в організмі, до яких відноситься гормон росту (*bGH*), бета-лактоглобулін ( *$\beta$ LG*), тиреоглобулін (*TG5*), калпаїн (*CAPN*), капа-казеїн (*CSN3*) та ін [4, 43-45].

Так, ген *CSN3* (капа-казеїну) пов'язаний з вмістом білка в молоці та його технологічними властивостями, за цим геном можна визначити тварин із генотипами, які зумовлюють наявність у молоці білка із бажаними для сироваріння властивостями [44, 46].

Відбір корів за деякими генотипами  *$\beta$ LG*, *GH*, *TG5* не лише допомагає підвищити інтенсивність селекції у напрямку збільшення надоїв, але й дозволить збільшити його жирність. Зокрема, різні алельні варіанти гена  *$\beta$ LG* асоційовані з високим вмістом у молоці окремих фракцій казеїнових і сироваткових білків, вмістом жиру та сприятливим впливом на молочну

продуктивність [43]. За цим геном здійснюється контроль якості молочних продуктів та виявлення фальсифікації молока. Доведено його участь в протимікробній активності до збудників маститу [4].

Ген *TG5* кодує попередників тиреоїдних гормонів, які задіяні у формуванні жирових клітин та мармуровості м'яса. Ген *CAPN* бере участь в процесі протеолізу при дозріванні м'яса і сприяє вищій його ніжності, а також забезпечує виражену мармуровість м'язової тканини в представника м'ясної породи ВРХ [47].

Ген гормону росту (*bGH*) є важливим регулятором соматичного росту тварин і проявляє лактогенну та жиромобілізаційну дію [48]. Для алельних варіантів *GH* показано асоціативний зв'язок між вмістом білку і жиру в молоці у великої рогатої худоби. Більшість досліджень спрямована на вивчення поліморфізму алельних варіантів L і V, пов'язаних із вмістом саме білка і жиру в молоці, а також темпом приросту маси тіла [49].

Ген міостатину (*MSTN*) є одним з регуляторів розвитку скелетної мускулатури, який належить до родини трансформуючих факторів росту [50]. Міостатин – це синтезований у м'язах білок, який пригнічує ріст і диференціювання м'язової тканини [51].

Отже, завдяки розробці методу ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою ПЛР завдання виявлення молекулярно-генетичних маркерів було значно полегшено. Цілеспрямовані дослідження з вивчення генетичної структури генів, пов'язаних з продуктивними якостями, мають велике значення для селекційної роботи з метою покращення господарсько корисних ознак у різних порід великої рогатої худоби та збереженню її генетичного потенціалу.

### **1.2.1 Поліморфізм генів родини Toll-подібних рецепторів (*TLR*), їх асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин**

Toll-поподібні рецептори (TLR) є одними з основних компонентів

вродженої імунної системи та першою лінією захисту від патогенних мікроорганізмів. TLR розміщені на клітинній мембрані і розпізнають молекулярні структури мікроорганізмів, які мають назву PAMP (pathogen-associated molecular patterns – патоген-асоційовані молекулярні патерни) та ініціюють внутрішньоклітинні сигнальні каскади, які беруть участь у формуванні ланки адаптивної імунної системи [52]. Вважається, що різні комбінації TLR мають вирішальне значення для ефективної імунної відповіді, тому розуміння організації та експресії TLR є важливим для розуміння питання стійкості до різних захворювань.

Гени родини *TLR* ссавців кодують трансмембранні білки I типу родини рецепторів IL-1 (IL-1R), які мають N-кінцеві повтори багаті на лейцин (LRR-leucine-rich repeat), що беруть участь у розпізнаванні лігандів, трансмембранного домена та C-кінцевого внутрішньоклітинного домена Toll/IL-1 гомологічного рецептора (TIR/IL-1R) для передачі сигналів [53, 54]. У хребетних налічується велика кількість різних генів TLR; 10–15 генів у ссавців, кожен з яких розпізнає цілу низку лігандів певного середовища збудника [55, 56].

Продукти родини генів *TLR* експресуються антиген-презентуючими клітинами, такими як макрофаги, нейтрофіли, дендритні клітини, NK-клітини, тучні клітини, а також Т-, В-клітинами та деякими епітеліальними та ендотеліальними клітинами [57]. Так, TLR1 розпізнає бактеріальні ліпіди, такі як ліпотьхоева кислота (LTA), тоді як TLR4 – ліпополісахарид (LPS) грамнегативних бактерій, таких як *E. coli*, а також молекулярні структури, асоційовані з пошкодженнями (DAMP – danger-associated molecular patterns – молекулярні фрагменти, асоційовані з небезпекою), що виділяються під час запального процесу [58]. Взаємодія цих лігандів з компонентами родини TLR призводить до індукції синтезу ряду біологічно активних структур, прозапальних і протизапальних цитокінів, включаючи хемокін CXCL8 [59]. Клінічний перебіг маститу характеризується, при цьому, синтезом CXCL8, який швидко зростає [60], формуючи потужний хемотаксичний градієнт, що

сприяє переміщенню нейтрофілів до молочної залози, що, в свою чергу, є життєво важливим механізмом первинного захисту від інфекції.

Важлива роль генів родини *TLR* в реалізації адаптивного імунітету полягає також в їх здатності впливати на антимікробну відповідь в шкірі, слизових оболонках дихальних шляхів, шлунково-кишкового та уrogenітального трактів. Білки *TLR* розпізнають мікробні молекули, активують каскад запальних реакцій, регулюють транскрипційні, посттрансляційні механізми продукції дефенсинів ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), фосоліпази A<sub>2</sub>, лізоциму; активують фагоцити та посилюють поглинання ними мікроорганізмів; регулюють продукцію радикалів перекисного окиснення та оксиду азоту. Гени родини толл-подібних рецепторів асоційовані з продукцією інтерферонів ( $\alpha/\beta$ ) стромальними та гемопоетичними клітинами, крім того, вони відіграють визначальну роль в регуляції адаптивних захисних механізмів організму, оскільки їх продукти беруть участь в активації зрілих Т-клітин, забезпечують процесинг і презентацію антигенів мікробної природи, підвищують експресію спеціалізованих стимулюючих факторів (CD80, CD86); проліферації та дозріванні В-клітин, пригнічують регуляторні Т-клітини через продукцію IL-6 та інше [61].

Що стосується гена *TLR1* ссавців, то він входить до складу генів підродини *TLR*, яка включає до себе *TLR6* та *TLR10*. Продукти їх експресії можуть утворювати гетеродимери з *TLR2* для розширення набору відомих лігандів. У свою чергу, комплекс генів *TLR1/TLR2* опосередковує клітинну реакцію на природні триацильовані ліпопротеїнові структури [62, 63], які є складовими клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій [64]. Комплекс *TLR1/TLR2* розширює розпізнавання лігандів до діацильованих ліпопротеїдів, хоча у великої рогатої худоби комплекс *TLR1/TLR2* може додатково активуватися діацильованими ліпопротеїнами [65]. Для встановлення їх функції потрібно проводити додаткові дослідження, оскільки комплекс *TLR1/TLR2* може розширити розпізнавання *TLR1* агоністів через невідомий сигнальний механізм [66].

Завдяки філогенетичному аналізу встановлено, що гени *TLR1*, *TLR6* та *TLR10* мають спільне походження та розташовані у тандемі, утворюючи кластер, розміром 69 kb, *TLR6-TLR1-TLR10* на хромосомі 6 *Bos taurus* (bta6) [67]. В процесі картування локусів кількісних ознак QTL (Quantitative Trait Loci) у повному геномі ВРХ встановлено, що кластер генів *TLR6-TLR1-TLR10* розташований у щільній області QTL, яка має вирішальне значення для ряду ознак технічних параметрів молока та прояву клінічного маститу [68, 69]. При цьому, *TLR1* виявився перспективним геном-кандидатом для дослідження основних QTL для стійкості/чутливості тварин до захворювань, таких як мастит [70].

За результатами досліджень багатьох авторів доведено, що мутації в генах *TLR* спричинюють зниження здатності розпізнавання патогенів та активації ланки загальної вродженої імунної системи [71-73]. Зокрема, окремі мутації в генах *TLR1* і *TLR4* призводять до слабкої імунної відповіді на бактеріальні ліпопептиди [71], ліпополісахариди [74] та компоненти клітинної стінки [75]. Мутації гену *TLR4* збільшує ризик прояву клінічних ознак таких інфекцій, як туберкульоз [76], проказа [77], малярія [78] та хвороба Крона [79]. Так, в роботі Mucha (2008) [80] виявлено зв'язок між мутаціями генів *TLR* та підвищеною сприйнятливістю до МАР-інфекції (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*). Два таких поліморфізма в кодуючих ділянках гену *TLR4* (заміщення Asp299Asn та Gly389Ser) асоційовані з розвитком МАР-інфекції.

Russell зі співавторами [81], встановили зв'язок однонуклеотидних поліморфізмів (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) в гені *TLR1* великої рогатої худоби (*boTLR1*) з проявом клінічного маститу. Поліморфізм *TLR1* за низкою SNP аналізували у фризькому стаді голштинського типу. Автори спостерігали асоціативний зв'язок між різними SNP у локусі *TLR1*, зниженим рівнем прояву клінічного маститу та підвищеним вмістом білка і жиру в молоці. Крім того, тварини з генотипом GG (SNP -79T>G) характеризувались значно нижчою експресією *TLR1* та вмістом соматичних клітин у молоці

порівняно з генотипами TT або TG.

Таким чином, приймаючи до уваги все вищенаведене, можна зробити висновок, що продукти генів толл-подібного рецептора 1 і 4 залучені до регуляції основних ланок вродженої імунної системи, пов'язаних із формуванням сукупності аспектів адаптивної здатності різних видів тварин, в першу чергу ссавців, що й визначає гени *TLR1* та *TLR4* в якості кандидатів у маркери продуктивних та адаптивних ознак великої рогатої худоби.

### **1.2.2 Поліморфізм гена *SLC11A1*, його асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин**

Ген *SLC11A1* належить до родини іонних транспортерів (SLC – Solute Carrier Family), також відомий як NRAMP1 – пов'язаний з природною резистентністю білок макрофагів 1 (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1), який відіграє важливу роль у регуляції імунітету та асоційований з великою кількістю імунних реакцій проти цілої низки хвороботворних мікроорганізмів [82]. Дефект синтезу або функції гена *SLC11A1* може призводити до порушення транспортування іонів і, в зв'язку з цим, до підвищення чутливості до внутрішньоклітинних патогенів.

Ген *SLC11A1* кодує складний мембранний білок, який функціонує як носій двовалентних перехідних металів (заліза та марганцю) та бере участь у метаболізмі заліза. Також показаний асоціативний зв'язок зі стійкості до певних патогенів. Мутації цього гена асоційовані зі сприйнятливістю/резистентністю до таких інфекційних захворювань, як туберкульоз, проказа, ревматоїдний артрит та хвороба Крона [provided by RefSeq, Jul 2008]. Встановлено, що ген *SLC11A1* також пов'язаний з природною стійкістю проти бруцельозу у великої рогатої худоби та буйволів [80].

Ген *SLC11A1* розташований на хромосомі 2 і складається з 39 екзонів та 38 інтронів. NRAMP1 експресується виключно на мембрані пізніх ендосом і лізосом макрофагів та дендритних клітин [84], у гранулах поліморфно-



ядерних лейкоцитів [85] та у клітинах нейронів [86]. Білок VPX SLC11A1 складається з 548 амінокислот, що містить 12 ймовірних трансмембранних доменів, позаклітинний сайт глікозилування, чотири сайти фосфорилування та мотив зв'язування SH3 [87].

Відбір стійкої до захворювань великої рогатої худоби на основі генетичних маркерів, пов'язаних з маститом, не тільки дозволить створювати більш стійкі експериментальні популяції, але й дасть змогу детальніше досліджувати механізми, що сприяють різній стійкості до хвороб, що може призвести до впровадження нових терапевтичних стратегій проти запальних захворювань [88].

В роботі Bagheri (2015) проводили аналіз асоціацій між генотипами за локусом *SLC11A1* та проявом клінічного маститу у молочної худоби голштинської породи за допомогою методу селективного секвенування. За результатами досліджень виявлено нову мутацію в 11 екзоні гена *SLC11A1*, а також встановлений вірогідний зв'язок з проявом клінічного маститу ( $p < 0,05$ ). Загалом, можна вважати, що *SLC11A1* є цінним геном-кандидатом для поліпшення стійкості до маститу, а також продуктивних ознак у популяціях молочної худоби [89]. Це можна підтвердити дослідженням китайських вчених, де за допомогою методу PCR-SSCP був проведений аналіз варіацій 11 екзону гена *NRAMP1* у великої рогатої худоби голштинської породи ( $n = 344$ ) та проаналізовано асоціативний зв'язок між алельними варіантами *NRAMP1* з кількістю соматичних клітин (SCS – Somatic Cell Score) та з параметрами молочної продуктивності. Ними було виявлено три генотипи – AA, BB і AB. У дослідній популяції встановлено превалювання частоти алелю А, в той час як частоти алелів А та В становили 0,767 та 0,233 відповідно. Аналіз нуклеотидних послідовностей виявив дві поліморфні ділянки в положеннях 200 (C/G) та 254 (T/G), що призвело до заміни амінокислотних залишків у кодованому білку (Ala356Pro та Leu374Met). Середньоквадратичне середнє значення кількості соматичних клітин в молоці у голштинської худоби було вірогідно нижчим для генотипу AA, ніж для

генотипів АВ та ВВ ( $p < 0,05$ ). За методом найменших квадратів встановлено превалювання значень середніх показників надоїв для особин зі генотипами АА та АВ, ніж у особин із генотипом ВВ ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  відповідно). Крім того, особини із генотипом АА виявилися стійкими до маститу. Таким чином, виходячи зі всього вищенаведеного, ген *NRAMP1* можна віднести до перспективних генів-кандидатів резистентності до маститів для голштинської худоби [90].

Проте в роботі інших авторів навпаки не було виявлено жодних зв'язків між встановленими поліморфізмами з показником кількості соматичних клітин ( $P = 0,07$ ) та надоями ( $P > 0,05$ ) у популяції китайських голштинів. Знайдений SNP призвів до амінокислотної зміни Р356А у трансмембранному домену пептиду *SLC11A1*, який є найбільш консервативною послідовною областю [91]. Отримані результати можна інтерпретувати по-різному. По-перше, варіації гена *SLC11A1* можуть сприяти стійкості до маститу, але ефект невеликий, тобто для виявлення значних відмінностей може знадобитися набагато більший обсяг вибірки. Крім того, стійкість до маститу пов'язана з активністю мультигенної родини, яка складається з *TLR4*, *CD14* та *CXCR2*, причому активність кожного з компонентів системи може мати коригуючу дію [92]. Крім того, *SLC11A1* у великої рогатої худоби має й додатковий ефект – може пригнічувати процес внутрішньоклітинної реплікації збудника бруцельозу [93].

Відомо, що поліморфізми в мікросателітах в 3'нетранслюючій області (3'UTR) гена *SLC11A1* пов'язані з природною резистентністю до *Brucella abortus* та *Mycobacterium bovis*, які є збудниками бруцельозу і туберкульозу у корів. Hasenauer et. al. (2012) провели індивідуальний генетичний аналіз представників видів *Bos taurus* та *Bos indicus* за двома мікросателітами, присутніх у 3'UTR *SLC11A1*. Генотипування за допомогою капілярного електрофорезу показало наявність чотирьох алелів (157, 159, 161 та 163 п. н.) для першого мікросателіта (MS1) та шести алелів (175, 177, 179, 181, 183 та 185 п. н.) для другого (MS2). У *Bos taurus* виявився найбільш однорідний

гаплотип і генотипи для обох мікросателітів, тоді як у *Bos indicus* – найбільш гетерогенний гаплотип і генотипи [94]. Результати досліджень дають змогу продовжувати експерименти з метою подальшого визначення асоціативних зв'язків з параметрами резистентності/чутливості особин ВРХ до певних захворювань. На сьогодні резистентність/чутливість до внутрішньоклітинних бактеріальних збудників встановлено лише за одним мікросателітним алелем, який присутній в 3'UTR гена *SLC11A1*. Слід зауважити, що отримані результати є достатньо суперечливими [95-97]. Можливо, якби в аналізі були розглянуті інші елементи (комплексні генотипи та інше) та більший об'єм вибіркової сукупності, то можна було б встановити вірогідний зв'язок між фенотипом ВРХ (резистентним або чутливим до внутрішньоклітинних бактеріальних збудників) з певним генотипом. Незважаючи на наявні труднощі результати досліджень було підтверджено іншими авторами – виявлений асоціативний зв'язок поліморфізму в 3'UTR області гена *SLC11A1* з резистентністю до бруцельозу [98].

Kadarmideen зі співавторами (2011) досліджували асоціації між поліморфними варіантами *SLC11A1* з фенотипами хворих на туберкульоз корів чадської великої рогатої худоби. Встановлений статистично значущий вплив алелів цього гена ( $p < 0,001$ ) на ознаки резистентності/чутливості до туберкульозу. Певні алельні варіанти локусу *SLC11A1* суттєво пов'язані з меншою частотою прояву клінічних ознак ВТВ у дослідній популяції тварин [99]. Іншими вченими також досліджено асоціації між поліморфізмом *SLC11A1* та сприйнятливістю до туберкульозу, але вже на прикладі китайської голштинської великої рогатої худоби. Аналіз асоціації виявив вірогідні кореляційні зв'язки між поліморфними варіантами *SLC11A1* та резистентністю/чутливістю до туберкульозу, а за допомогою методу PCR-RFLP встановлено два генетичні маркери для цього локусу. За результатами аналізу нуклеотидної послідовності *SLC11A1* виявлено сім однонуклеотидних поліморфізмів (SNP). За рахунок регресійного аналізу з'ясовано, що *SLC11A1*-SNP1, *SLC11A1*-SNP3 та *SLC11A1*-SNP5 мають

вірогідний зв'язок з параметрами резистентності/чутливості до туберкульозу. Два генотипи за *SLC11A1-SNP3* виявились сприйнятливими до туберкульозу, тоді як один генотип за *SLC11A1-SNP1* та два генотипи за *SLC11A1-SNP5* – резистентні [17]. Аналіз нерівноваги за зчепленням показав, що дев'ять гаплотипів потенційно пов'язані зі стійкістю до туберкульозу.

За результатами роботи інших авторів також виявлено однонуклеотидні поліморфізми (SNP) в гені ВРХ *SLC11A1*, які пов'язані з чутливістю до туберкульозу [100]. Дослідження на тайванській голштино-фризькій породі ВРХ виявило SNP в 4 екзоні та 4 інтроні, які пов'язані з підвищеною сприйнятливістю до туберкульозу [100], тоді як у популяції китайської голштино-фризької породи асоціації з резистентністю/чутливістю до бТВ виявлені з SNP в 11 екзоні та 5 і 9 інтронах [17]. Додатково поліморфізми в 3'UTR областях гена *SLC11A1*, що пов'язані з варіативністю двох мікросателітів (MS1 та MS2), ідентифіковані у різних порід великої рогатої худоби [94, 101-102]. Дослідження британських вчених продемонструвало, що варіації гена *SLC11A1* великої рогатої худоби пов'язані з функціональною різницею в експресії *NRAMP1* у моноцит-похідних макрофагах, отриманих від корів. Оскільки цей ген регулює рівень заліза у фагосомах, це є доказом того, що він дійсно може впливати на чутливість до внутрішньоклітинних патогенів, зокрема *M. bovis*. Однак, бТВ є складною хворобою, на яку, ймовірно, впливають поліморфні варіанти багатьох генів, особливо тих, що пов'язані з регуляцією функцій імунної системи [103].

Крім того, досліджений поліморфізм у трьох генах-кандидатах *BoIFNG*, *TLR4* і *SLC11A1* та встановлено їх роль в якості потенційних факторів ризику зараження паратуберкульозом великої рогатої худоби. Однак, достовірний зв'язок між паратуберкульозною інфекцією ВРХ та запропонованими генами-кандидатами не встановлений [104]. У свою чергу, в роботі інших авторів встановлена генетична кореляція між однонуклеотидними поліморфізмами (SNP) у гені *SLC11A1* великої рогатої

худоби з чутливістю до зараження *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, який є основним збудником паратуберкульозу [105].

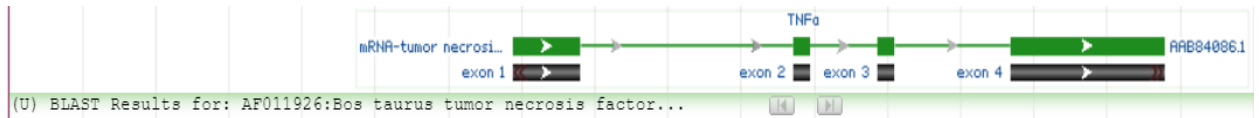
### **1.2.3 Поліморфізм гена *TNF $\alpha$* , його асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин**

Білок TNF $\alpha$  є одним з основних прозапальних цитокінів, що беруть участь в імунній відповіді. Поряд з іншими факторами, TNF- $\alpha$  стимулює проліферацію, диференціацію та активність багатьох клітин імунної системи: В-лімфоцитів, Т-лімфоцитів, натуральних кілерів та лімфокін-активованих кілерів (LAK – Lymphokine-Activated Killer) [106]. Він чинить хемотаксичну та активізуючу дію на моноцити, макрофаги та еозинофіли, тим самим збільшуючи їх цитотоксичність. TNF $\alpha$  також посилює фагоцитарні властивості нейтрофілів, прискорює їх вивільнення з кісткового мозку і стимулює їх до утворення активних форм кисню, що підвищує їх антибактеріальні та цитотоксичні властивості. Також TNF $\alpha$  індукує синтез та секрецію багатьох інших цитокінів [107]. TNF $\alpha$  експресується в багатьох типах клітин ссавців, але найчастіше макрофагами та моноцитами. Продукція TNF $\alpha$  у цих фагоцитарних клітинах стимулюється ліпополісахаридом (LPS), що знаходиться в клітинній стінці бактерії. У стимульованих LPS макрофагах експресія гена *TNF $\alpha$*  потроюється, а рівень мРНК збільшується приблизно в 100 разів, тоді як секреція самого білка може бути в 10 000 разів вищою [108].

Ген фактора некрозу пухлини  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha gene, *TNF $\alpha$* ) складається з чотирьох екзонів та трьох інтронів, розташований на 23 хромосомі (BTA23q22), містить у своєму складі 2,88 тис. п.н. (рис. 1.2.3).

Розмір матричної РНК становить 1713 п.н. У базі даних dbSNP є 28 однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена *TNF $\alpha$*  великої рогатої худоби, але статус валідації для більшості з них невідомий [109]. Проте для деяких мутацій встановлено, що однонуклеотидні поліморфізми (SNP) *TNF $\alpha$*  в

екзонних та промоторних областях мають сильний асоціативний зв'язок з терміном першої овуляції після пологів у високопродуктивних молочних корів [110].



**Рис. 1.2.3 Структура гена *TNFα* великої рогатої худоби.**

([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF011926.1?report=graph&rid=RYYKNXMT016\[AF011926.1\]&tracks=\[key:sequence\\_track,name:Sequence,display\\_name:Sequence,id:STD1,category:Sequence,annots:Sequence,ShowLabel:true\]\[key:gene\\_model\\_track,CDSProductFeats:false\]\[key:alignment\\_track,name:other%20alignments,annots:NG%20Alignments|Refseq%20Alignments|Gnomon%20Alignments|Unnamed,shown:false\]&v=0:4569&appname=ncbiblast&link\\_loc=fromHSP](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF011926.1?report=graph&rid=RYYKNXMT016[AF011926.1]&tracks=[key:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD1,category:Sequence,annots:Sequence,ShowLabel:true][key:gene_model_track,CDSProductFeats:false][key:alignment_track,name:other%20alignments,annots:NG%20Alignments|Refseq%20Alignments|Gnomon%20Alignments|Unnamed,shown:false]&v=0:4569&appname=ncbiblast&link_loc=fromHSP))

Ген розташований в області хромосоми, яка, як показано низкою авторів, містить локуси, пов'язані зі чутливістю до запалення вимені [111, 112]. Частоти алелів гена *TNFα* у різних порід *Bos taurus* коливається від 0 до 0,61, рівень гетерозиготності є достатньо високим (0,80) у популяціях місцевих порід і відносно низьким (0,22) у фризької породи [113]. *TNFα* кодує білок, розміром 333 амінокислотних залишки.

Згідно з базою даних ENSEMBL, *TNFα* має 1322 алельних варіанти, що, зважаючи на його значну фізіологічну роль, робить його актуальним об'єктом для досліджень на тлі завдань маркер-асоційованої селекції ВРХ.

*TNFα* бере участь не тільки в регуляції імунологічних, запальних або репаративних реакцій, але і в контролі синтезу простагландинів – ліпідних медіаторів, які впливають на ендотелій матки при народженні [114]. *TNFα* продукується ендометрієм ВРХ, його джерелами є як імунні клітини, так і епітеліальні клітини, клітини залозистого епітелію та ендотеліальні клітини, що відіграє певну роль у регуляції репродуктивних функцій протягом естрального циклу [115]. Як відомо, активність лейкоцитів у корів після отелення знижена, спостерігається загальне пригнічення імунітету, що стає причиною маститів і ендометритів [116]. *TNFα* стимулює альтерацію та

адгезію лейкоцитів до ендотеліальних клітин судин [117]. Крім того,  $TNF\alpha$  бере участь в процесах морфогенезу та розвитку плода, а також відіграє важливу роль у формуванні молочної залози [118].

Відомо, що генетичний поліморфізм в промоторній області гена може впливати на здатність зв'язування ядерних факторів та на регуляцію експресії на рівні транскрипції. Konnai et al. (2006) продемонстровано, що SNP в положенні -824A>G гена  $TNF\alpha$  (промоторна область) може відігравати важливу роль у патогенезі ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби (EBL), що призводить до порушення проліферації та диференціювання В-лімфоцитів [119]. Зазначені автори також спостерігали відмінності в значеннях частот генотипів між стадами великої рогатої худоби, заражених вірусом лейкемії корів (BLV – Bovine Leukemia Virus) та неінфікованих. Гетерозиготні особини за локусом  $TNF-\alpha$  (-824A/G) частіше зустрічаються у групі BLV-негативних, ніж у BLV-позитивних корів, але ці відмінності є статистично незначущими. Значні коливання частот генотипів виявлені між особами на ранній (алеїкемічний лейкоз, AL) та запущеній (лімфосаркома, LS) стадіях EBL. В роботах Wojaróć-Nosowicz (2015) також підтверджено ці дані – за результатами досліджень показано, що поліморфізм гена  $TNF\alpha$  (-824 A>G) та експресія білка m $TNF\alpha$  відіграють важливу роль у патогенезі ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби [120, 121]. Генетична рівновага в цих стадах зберігалася, але виявлено тенденцію до збільшення частоти гомозигот G/G. Генетична структура здорового стада значно відрізнялася від генетичної структури лейкозного стада.

Іншими авторами показаний зв'язок між поліморфними варіантами гена  $TNF\alpha$  та проявом клінічного маститу у молочної худоби, проте ці результати важко застосувати в маркерній селекції, спрямованій на зменшення спадкової сприйнятливості до маститу через достатньо обмежений об'єм вибірки [122]. З іншого боку, результати досліджень дають уявлення про складні механізми імунітету до інфекцій. Важливим виявляється те, що ефект  $TNF\alpha$  змінювався залежно від віку. Алелі, які були

пов'язані з високим імунітетом до маститу у молодих особин, виявились менш сприятливими у більш старих.

За результатами роботи індійських вчених продемонстровано, що в групах чутливих до маститу корів, генотипи AA мають вищу експресію мРНК *TNF $\alpha$* , ніж AB та BB. Припускають, що *TNF $\alpha$*  асоційований зі змінами складу білків молока у корів хворих на мастит [123]. Тобто більш високий рівень мРНК *TNF $\alpha$*  може виявитися вигідним в системі захисту молочної залози від інфекцій [124]. Тому генотипи AB і BB потенційно можуть бути використаними як маркери-кандидати для відбору стійкості до маститу у молочної худоби.

За використання оцінки впливу статі телят та мутації -824A/G в промоторній ділянці гена *TNF $\alpha$*  на параметри молочної продуктивності корів чорно-рябої породи протягом декількох лактацій, а також визначення частот алелей у варіантах -824A/G в різних породах ВРХ, встановлено певні закономірності [18]. Частота алелів G поступово зменшувалась протягом періодів лактації у чорно-строкатої породи через вищу швидкість вибракування корів з генотипом G/G ( $p < 0,001$ ). Було показано низький рівень надоїв та молочного жиру в гетерозигот A/G порівняно з гомозиготами A/A та G/G, тобто так званий ефект недостатньої домінантності. Інші автори також описували подібне недомінування деяких репродуктивних ознак великої рогатої худоби [125]. Причина цього явища незрозуміла, але можна припустити, що зменшення вироблення молока у гетерозигот призводить до вищої відносної придатності (перевага гетерозигот), можливо, збільшуючи показники виживання в суворих умовах. Надої та молочний жир були значно вищими у разі народження бичка, ніж телиці ( $p < 0,03$ ) [18]. Подібним чином різке падіння виробництва молока після народження телиці збільшує ймовірність вибракування корів з генотипом G/G у тваринництві. Тобто, можна зробити висновок, що поліморфізм гена *TNF $\alpha$*  (-824A/G) асоційований із репродуктивними показниками корів протягом декількох періодів лактації залежно від статі



потомства.

Отримані результати інших авторів також свідчать про те, що поліморфізм гена *TNF $\alpha$*  суттєво впливає на імунну функцію та репродуктивні показники у корів [126, 127]. Так, у досліджуваній популяції молочних корів для локусу *TNF $\alpha$*  японські вчені виявили різні генетичні варіанти: A/A, A/G, G/G у промоторній частині гена. Інтервал між отеленням та першою овуляцією був більш коротким у корів з гетерозиготним генотипом A/G та гомозиготним генотипом G/G порівняно з тваринами з гомозиготним генотипом A/A. Поліморфізм промоторної області гена *TNF $\alpha$*  у корів не впливав на швидкість апоптозу у поліморфних ядерних лейкоцитів, однак швидкість трансміграції була значно вищою у тварин з генотипами A/A та A/G порівняно з тваринами з гомозиготним генотипом G/G [126]. Інші автори у досліджуваній популяції виявили виняткову частоту гетерозиготного генотипу, розподіл генетичних варіантів був наступним: AA – 22,4%; AG – 63,8%; GG – 13,8%. За результатами досліджень показаний позитивний вплив генотипу GG корів голштинського типу на репродуктивну функцію, тоді як репродуктивні показники були відносно низькими у гетерозиготних тварин. Репродуктивна функція була висока у корів з генотипом GG: інтервал між отеленням і плідним осіменінням складав 259 днів, індекс осіменіння 2,63, доля тварин, запліднених після 91 дня, становила мінімально 47,36 % у осіб гомозиготного генотипу GG [127].

На прикладі червоної степової породи генетична структура популяції за геном фактора некрозу пухлини- $\alpha$  характеризується співвідношенням генотипів 56, 38 і 6% для G/G, G/A та A/A відповідно. Так само як і в попередніх дослідженнях, тварини з генотипом G/G відрізнялися більш раннім віком першого ефективного осіменіння порівняно з генотипом G/A, різниця становить 2 місяці ( $p < 0,05$ ). Тривалість тільності у тварин з генотипом G/G довша, ніж у гетерозигот G/A на 6,6 дн. ( $p < 0,05$ ) [128].

Ще одні результати показали, що у дослідній популяції великої рогатої худоби в групі з високим вірусним навантаженням з боку вірусу лейкозу ВРХ

(HPL – High Proviral Load) три можливі генотипи мали нормальний розподіл, а в групі з низьким вірусним навантаженням LPL (Low Proviral Load) існував сильний зв'язок між провірусним навантаженням і низькою частотою генотипу G/G в положенні -824 [129].

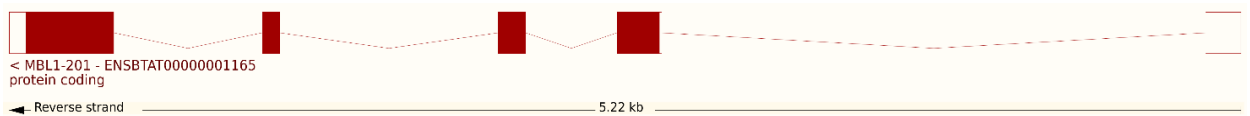
#### **1.2.4 Поліморфізм гена *MBL1*, його асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин**

Манозозв'язувальний лектин (MBL – Mannose-Binding Lectin) належить до родини білків колектинів, приймає участь у зв'язуванні широкого спектру мікроорганізмів і запускає лектиновий шлях активації системи комплементу вродженого імунітету. Дефіцит MBL пов'язаний з підвищеним ризиком розвитку різних інфекцій і може виникнути внаслідок великої кількості факторів [130, 131]. Більшість ссавців мають дві форми MBL – MBL-A та MBL-C, що кодуються двома різними генами, *MBL1* та *MBL2*, відповідно. Дефіцит MBL відносно поширений у людей, мишей, свиней, великої рогатої худоби та інших ссавців, і є все більше доказів того, що він відіграє важливу роль у патогенезі багатьох захворювань [132–135].

Манозозв'язувальний лектин (MBL) є одним з найважливіших рецепторів розпізнавання патогену (патерну) вродженої імунної системи [131, 136]. Він зв'язується з низькою вуглеводів, включаючи N-ацетил-D глюкозамін, маннозу, N-ацетилманозамін, фруктозу та глюкозу. Це дозволяє білку взаємодіяти з широким спектром мікроорганізмів, за рахунок зв'язування з різними компонентами клітинних стінок. MBL при зв'язуванні з вуглеводами бактеріальних клітинних стінок, здатний активувати систему комплементу антиген-антитіло та лише C1-субкомпоненту комплементу. Антимікробні функції MBL, включаючи опсонізацію, нейтралізацію та активацію комплементу, залежать від правильної олігомерної збірки та кластерної орієнтації багатьох доменів розпізнавання вуглеводів, які розпізнають повторювані РАРР на бактеріальних поверхнях [137]. Домен

розпізнавання MBL селективно обирає мішені мікроорганізмів для нейтралізації шляхом зв'язування з залишками манози та N-ацетилглюкозаміну на поверхні клітини та подальшої активації MBL-асоційованих серинових протеаз (MASPs) [138]. Оскільки бактерії є найпоширенішими причинами маститу у великої рогатої худоби, аналіз поліморфних варіантів *MBL1* у ВРХ може сприяти виявленню генетичних ознак, пов'язаних із факторами резистентності/стійкості до маститу.

Ген *MBL1* розташований на хромосомі 28 [139].



**Рис. 1.2.4 Структура гена манозозв'язувального лектину великої рогатої худоби. ENSBTAG00000026972**

([https://www.ensembl.org/Bos\\_taurus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000054761;r=28:35636035-35641256;t=ENSBTAT0000001165](https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000054761;r=28:35636035-35641256;t=ENSBTAT0000001165))

Він складається з п'яти екзонів, кодує білок розміром 248 амінокислотних залишки. Область промотора, розташована вище сайту ініціації, грає важливу роль у регуляції експресії генів. Поліморфізм в промоторній області може модифікувати сайти зв'язування факторів транскрипції, впливаючи тим самим на рівень експресії гена [130]. За різними мутаціями в промоторній ділянці гена встановлені алельні варіанти, що асоційовані з показником кількості соматичних клітин в молоці [140]. Ген манозозв'язувального лектину (*MBL*) приймає участь у розвитку стійкості до низки бактеріальних інфекцій організму, та, потенційно, може бути розглянутим в якості гена-кандидата в молекулярні маркери резистентності/чутливості до маститів. Однак, на даний час мало досліджень, які стосуються однонуклеотидного поліморфізму (SNP) ВРХ та його асоціативного зв'язку із стійкістю до маститу, що й визначає актуальність проведення досліджень у цьому напрямку [141].

В роботі Yuan (2012) проведено кореляційний аналіз між поліморфними варіантами гена *MBL1* (мутація с.2534G >A) та кількістю соматичних клітин у молоці, виявлений вірогідний зв'язок [141]. Значення КСК в молоці в корів з генотипом GG було значно нижчим, ніж у особин із генотипами GA та AA. За результатами досліджень доведено, що особини з генотипом GG, які характеризувалися найнижчою концентрацією соматичних клітин були стійкими до маститу, тоді як особини з генотипом AA та з найвищим їх вмістом соматичних клітин були сприйнятливим до захворювання. В іншому дослідженні не виявлено кореляції між g.855G> A та g.2686T>C із кількістю соматичних клітин в молоці, у той час як для мутації g.2651G>A вірогідний зв'язок знайдений, що свідчить про можливу роль цього SNP у прояву резистентності до маститу [140]. Виходячи з наведених даних можна припустити, що комплексні генотипи GGC/AAC, які корелюють із найнижчим значенням показнику вмісту соматичних клітин у молоці, AAT/AAT з найвищим вмістом білка та AGC/AGC з найвищими показниками надоїв за стандартну лактацію є максимально сприятливими комбінаціями для ознак молочної продуктивності та стійкості до маститу. Тому комплексні генотипи GGC/AAC, AAT/AAT та AGC/AGC за локусом *MBL1* можуть бути використані як можливі кандидати для маркерної селекції у програмі молочного скотарства [140].

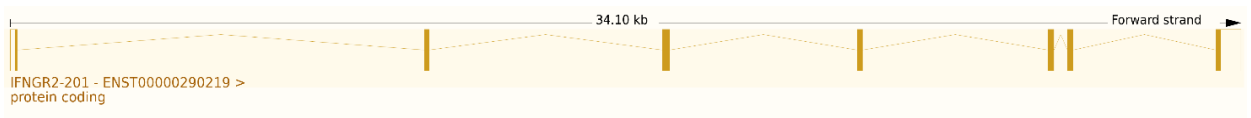
### **1.2.5 Поліморфізм гена *IFNGR2*, його асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин**

Інтерферони входять до складу багатогенної родини індукованих цитокінів. IFNG відіграє одну з основних ролей в імунній відповіді на вірусну інфекцію шляхом посилення активності макрофагів і стимуляції адаптивного клітинно-опосередкованого імунітету [142]. Гамма-інтерферон ( $\gamma$ -IFN) є одним з найважливіших цитокінів у протитуберкульозному захисті [143, 144]. Відомо, що при формуванні адаптивного імунітету  $\gamma$ -IFN

потрібний для активації Т-клітин [145], що сприяє їх дозріванню, підвищує експресію рецепторів до ІЛ-12, ІЛ-18 і генів I та II класів головного комплексу гістосумісності (ГКГС), а також він здатний стимулювати функціонування цитотоксичних Т-клітин.  $\gamma$ -IFN є одним з головних регуляторів інтенсивності апоптозу імунокомпетентних клітин, нейтрофільних гранулоцитів та макрофагів (Мф), приймає участь у регуляції балансу цитокінів у ході імунної відповіді на антиген, активує натуральні кілери (НК) та макрофаги, що підвищує їх здатність до знешкодження бактеріальних клітин (наприклад – мікобактерій туберкульозу) [146, 147].

Ген гамма-рецептора 1 інтерферону (*IFNGR1*), локалізований на ВТА9 кодує IFN- $\gamma$ R1, який представляє ліганд-зв'язуючий ланцюг (альфа) гетеродимерного рецептора гамма-інтерферону, що знаходиться на макрофагах, тоді як *IFNGR2*, локалізований на ВТА1, кодує IFN- $\gamma$ R2 та є компонентом гетеродимерного рецептора, що безпосередньо не зв'язується з лігандом [148].

Згідно з базою даних ensembl.org (ENSBTAT00000066996.1) ген гамма-рецептора 2 інтерферону (*IFNGR2*) містить у своєму складі 7 екзонів і 6 інтронів, загальна довжина ~ 34 тис. п.н., розміщується у 1 хромосомі. Кодує білок довжиною ~ 337 а.з.



**Рис. 1.2.5 Структура гена гамма-рецептора інтерферону 2 великої рогатої худоби. ENSG00000159128**

([https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000159128;r=21:33403413-33479348;t=ENST00000290219](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000159128;r=21:33403413-33479348;t=ENST00000290219))

Синтез IFN- $\gamma$  здійснюється багатьма типами клітин, котрі беруть участь в імунному захисті, але головними продуцентами є активовані Т-хелпери (CD4<sup>+</sup>Th1-клітини), натуральні кілери (НК-клітини) та цитотоксичні Т-

лімфоцити ( $CD8^+$  -Т-Лф), а також мононуклеарні та дендритні клітини [149].

IFN- $\gamma$  характеризується противірусною, імуномодулюючою, антифібротичною та протипухлинною активністю, при цьому переважають його імунотропні властивості, а саме здатність активувати клітинну ланку вродженого та набутого імунітету. Цей цитокін, змінюючи активність понад 30 різних генів імунорезистентності, має широкий спектр імуномодулюючих впливів.

Інтерферон гамма, індукований під час захворювання на мастит, є канонічним цитокіном Th1, секретованим  $CD4^+$  і  $CD8^+$  Т-хелперними лімфоцитами, який сприяє клітинно-опосередкованому імунітету шляхом збільшення фагоцитарної та антигенної здатності макрофагів [150].

Поліморфізм локусу *IFNGR2* у популяціях корів різних порід та напрямів продуктивності досить мало вивчено. Мутації у генах *IFNGR1* та *IFNGR2* можуть призвести до крайньої сприйнятливості до мікобактеріальних інфекцій і впливати на перебіг і прогнозування захворювання [151]. В роботі Rosenzweig [152] показано, що існує зв'язок між мікобактеріальними інфекціями та мутаціями генів IFN- $\gamma$ Rs. Виявлено, що мутації зустрічаються переважно в IFN- $\gamma$ R1, ніж у IFN- $\gamma$ R2. Повна відсутність експресії IFN- $\gamma$ R1 на поверхні клітини призводить до рецесивного дефекту IFN- $\gamma$ R1 або повної втрати зв'язування IFN- $\gamma$ . Авторами продемонстровано, що алель IFN- $\gamma$  (+874A/T) може моделювати сприйнятливість до туберкульозу (ТБ) [153]. Мутації в гені, що кодує IFN- $\gamma$ R1, спричиняють надмірну чутливість до мікобактеріальної інфекції, що може призводити до виражених клінічних проявів захворювання [154].

Дослідження, проведені Bhaladhare зі співавторами [148], спрямовані на вивчення асоціативного зв'язку одного SNP в гені *IFNGR1* (rs109049057) і двох SNP в гені *IFNGR2* (rs109579937 і rs110689128) із параметрами резистентності/чутливості до туберкульозної інфекції у великої рогатої худоби. За результатами досліджень встановлено, що SNP rs109049057 достовірно ( $p < 0,01$ ) пов'язаний із чутливістю до туберкульозу великої

рогатої худоби в контрольній популяції. SNP є несинонімічним, що додатково свідчить про його функціональну роль в імунній відповіді проти туберкульозу ВРХ.

Однак, даних про значущий зв'язок поліморфізму *IFNGR1* і *IFNGR2* з резистентністю/чутливістю до туберкульозу (bTB) у великої рогатої худоби недостатньо, хоча повідомлялося, що мутації в різних функціональних ділянках генів (SNP rs2834213 та rs1059293) асоційовані з туберкульозом у людей [155].

Крім того, Glatzer зі співавторами [156] ідентифікував SNP AC000158:g.1390292G>A в 3 інтроні гена *IFNGR2*, що асоційований з комолістю у голштинів, проте в іншій популяції цієї породи зв'язок виявився відсутнім. Наразі продовжуються дослідження асоціацій алельних варіантів гену *IFNGR2* з господарсько корисними ознаками великої рогатої худоби різних порід та напрямів продуктивності [157].

У свою чергу, проводяться дослідження особливостей функціонування *IFNG*, біологічні функції якого безпосередньо пов'язані з активністю його рецепторів. Так, наприклад, Nahas зі співавторами [158], в своєму дослідженні продемонстрували підвищений рівень експресії *IFNG* при різних спалахах ящуру. Аналогічно, Van Wyk et al. [159] повідомили про підвищену експресію *IFNG* у тварин під час гострої вірусної діареї великої рогатої худоби. Також Kang et al. [160] розглянули прямі противірусні механізми дії *IFNG* і довели, що він пригнічує проникнення вірусу під час його вторгнення в цитоплазму з ендосоми. Крім того, *IFNG* здатний ефективно пригнічувати гостру інфекцію ВК вірусу незалежно від штаму вірусу [161].

За використання методу PCR-RFLP, Gori зі співавторами встановили [162], що SNP rs110853455 в *IFNG* вірогідно ( $p < 0,05$ ) пов'язані зі стійкістю до MAP-інфекції. Для цього поліморфізму виявлено, що генотип AG більш пов'язаний зі чутливістю до інфекції MAP, ніж генотип AA та GG. Результати цього дослідження свідчать про можливість використання SNPs rs110853455 як потенційного маркера для скринінгу великої рогатої худоби,

стійкої до паратуберкульозу.

В дослідженні Prakash [163], як і в роботі Pant [20], у тварин, уражених бруцельозом, не виявлено асоціацій SNP в *IFNG* (-639 T/C), *IFNG* (+432G/A) і *IFNGR1* (+132G/T) зі статусом MAP інфекції у молочної худоби. Результати отримані Prakash також підкреслюють важливість цитокінів та їх рецепторів у забезпеченні захисту від бруцельозу та вимагають подальшої функціональної характеристики цих асоціацій. За результатами проведених досліджень виявлені незначущі асоціації між SNP генів цитокінів (*IFNG* -639 T/C; *IFNG* +432 G/A; *IFNGR1* +132 G/T; *IFNGR1* +523 A/G), кількістю соматичних клітин та стійкістю лактації [164].

Беручи до уваги все вищевикладене, продукти генів *IFNGR1* і *IFNGR2* залучені до регуляції багатьох імунологічних та фізіологічних процесів у тварин, що й визначає гени гамма-рецепторів інтерферону як перспективні гени-кандидати для потреб маркер-асоційованої селекції у скотарстві.

### **1.3 Перспективи використання маркер-асоційованої селекції в молочному скотарстві**

Головна роль молекулярно-генетичних маркерів у селекційному процесі полягає в наданні інформації про генетичну ситуацію в популяції та поглибленні розуміння щодо генотипів племінних тварин. Особливо корисним є застосування ДНК-маркерів з метою дослідження процесів мікроеволюції, зважаючи на адаптаційну роль маркованого спадкового матеріалу плідників. Дослідження українських вчених вказують на перспективність використання маркерів у селекції для покращення продуктивних якостей та адаптивних можливостей сільськогосподарських тварин [165-169]. Генетико-популяційні дослідження в програмах селекції молочного скотарства спрямовані на вирішення завдань комплексної оцінки генотипу в системі генетичного моніторингу для всебічного розуміння генетичного матеріалу та картування геному, яке може дати генетична



інформація, обумовлена певними генами чи генними комплексами [170, 171].

В молочному скотарстві доволі часто досліджують асоціативні зв'язки за локусами, що з більшою ймовірністю можуть бути пов'язані з параметрами молочної продуктивності, зокрема, з якісними показниками молока, такими як бета-лактоглобулін (*βLG*), гормон росту (*GH*), бета-казеїн (*CSN2*), капа-казеїн (*CSN3*), лептин (*LEP*) та ін [172, 173]. Для вирішення цих завдань користуються наступними методами – пошук генетичних маркерів та генів-кандидатів ознак продуктивності, генетичне картування [174]. Велика кількість досліджень у різних країнах на прикладі різних порід великої рогатої худоби дозволила виділити основні гени, які впливають як на якісні, так і на кількісні параметри молока. Поліморфізм генів, пов'язаних з ознаками молочної продуктивності, зараз включений до програми ДНК-діагностики корів у багатьох країнах з прогресивним веденням тваринництва [175-177]. Наприклад, дані ДНК-діагностики гена капа-казеїну (*CSN3*) за алелем В активно використовуються у програмах розведення великої рогатої худоби у Німеччині та США, що дозволяє на промисловому рівні отримувати молоко з високим вмістом білка [25, 178].

З метою проведення ефективної селекційної роботи при використанні MAS, застосовують дані щодо поліморфізму різних структурних генів або фрагментів геному в зв'язку з продуктивними ознаками. Наведений підхід широко поширений як у тваринництві, так і в скотарстві [179]. Результати досліджень можна використовувати в селекційних програмах для отримання нащадків з бажаними генотипами, яким властиві оптимальні значення показників (молочний надій, вміст жиру та білка в молоці тощо), що цікаві для селекціонерів, а також заданими комплексними генотипами за сукупністю поліморфних локусів.

Вихідною та однією з основних умов, якій має відповідати ДНК-маркер для можливості його використання в маркер-асоційованій селекції, є поліморфність, а також функціональна активність маркерного фрагмента гена. Зважаючи на вищесказане, до найбільш перспективних мішеней

належать різні гени, які пов'язані з регуляцією базових фізіологічних функцій організму, що безпосередньо проявляється у фенотипі (господарсько корисні ознаки).

Відомо, що нові генетико-молекулярні інструменти дозволяють ідентифікувати гени, які беруть участь у формуванні різноманітних ознак, включаючи адаптивні ознаки та поліморфізм, що призводить до функціональних варіантів генів (QTN – нуклеотиди кількісних ознак – Quantitative Trait Nucleotides). Проте, у науковців досі немає достатніх знань для того, щоб на підставі функціональної молекулярної різноманітності робити вибір стосовно пріоритетності збереження, тому для цього потрібні додаткові оцінки. Фенотипові методи дозволяють здійснювати грубу оцінку середніх значень за функціональними варіантами генів у досліджуваних особин чи популяцій.

В цілому, можна виділити три основні пункти щодо використання маркер-асоційованої селекції в молочному скотарстві, оскільки інформація з приводу генетичного різноманіття є досить важливою для оптимізації стратегій збереження та використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин [180].

1. Генетико-молекулярні методи є корисними для проведення досліджень щодо походження і доместикації сільськогосподарських видів тварин та їх подальшої міграції, а також для отримання інформації про еволюційні взаємозв'язки (філогенетика) та встановлення географічних областей обміну генетичною інформацією між популяціями з різним генетичним походженням.

2. Ефективне число тварин у популяції оцінюють за показником ефективного чисельності популяції ( $N_e$ ), який тісно пов'язаний з рівнем інбридингу та генетичним дрейфом у популяції, а отже є важливим показником оцінки ступеня небезпеки для популяції. Традиційні підходи щодо отримання надійної оцінки  $N_e$  для племінних популяцій базуються на родоводі або на переписі. Тому молекулярні методи можуть представляти

перспективну альтернативу.

3. Збереження порід з унікальними ознаками, що забезпечують високу продуктивність тварин є ключовим пріоритетом в управлінні генетичним різноманіттям особин. Найбільше значення має ВРХ, яка здатна давати продукцію за критичних умов і характеризується високою стійкістю до інфекційних захворювань. Тож неабиякий інтерес у дослідників викликає ідентифікація генів, що контролюють складні ознаки. Для виявлення таких генів використовують комплексні сучасні підходи.

Перспективи використання маркер-асоційованої селекції дають можливість досліджувати спадковий матеріал безпосередньо на рівні ДНК та характеризуються відсутністю недоліків класичних методів селекції лише за фенотипом [2, 181]. Нині в контексті світової практики MAS відноситься до розряду загальноприйнятих інструментів роботи в молочному скотарстві та в тваринництві загалом. Використання сучасних методів, що ґрунтуються на досягненнях молекулярної генетики в Україні, починає досить активно послуговуватися в селекційній роботі з різними видами сільськогосподарських тварин, зокрема великою рогатою худобою [182, 183]. Водночас проводяться дослідження не тільки поліморфізму локусів кількісних ознак (QTL), але й мікросателітної мінливості [184, 185].

Підсумовуючи вищенаведене, моніторинг сучасного стану селекційної роботи в молочному скотарстві та перспективи розвитку цієї галузі свідчать про обов'язкове використання сучасних молекулярно-генетичних методів досліджень у загальному контексті роботи [3, 181, 186]. Крім того, у дослідженнях потрібно користуватися широким спектром різних типів ДНК-маркерів для вивчення великої рогатої худоби, а також проводити аналіз її генетико-популяційних параметрів, що, як наслідок, дозволить створити міцний фундамент для проведення подальшої ефективної селекційної роботи.

## 1.4 Обґрунтування напряму власних досліджень

Одним з найскладніших етапів у селекції тварин була і залишається оцінка племінної цінності тварини. З розвитком методів аналізу ДНК збільшилася кількість генетичних маркерів, потенційна кількість яких дозволяє розширити хромосомну карту для локалізації на хромосомі генів і нуклеотидних послідовностей, що мають суттєве селективне значення. Вивчення генетичної структури популяції корів різних порід є важливою умовою для підтримання її стійкості та господарської цінності. Серед безлічі генів, що впливають на рівень продуктивності корів та їх адаптаційні можливості відносяться *TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF- $\alpha$* , *MBL1*, *IFNGR2* та інші. Породи української селекції в аспекті генетичного удосконалення згідно з сучасними умовами галузі мало вивчені, що є актуальним завданням для збереження вихідного вітчизняного генофонду великої рогатої худоби поряд з проведенням селекційної роботи з метою покращення продуктивних та адаптивних якостей тварин.

Значний внесок у селекційний процес робить вивчення генотипів племінних тварин, що дозволяє ідентифікувати гени, прямо або опосередковано пов'язані з господарсько-корисними ознаками і схильністю до захворювань корів. Тому необхідно розробляти методики, що забезпечують аналіз поліморфізму генів, які беруть участь у формуванні продуктивності тварин. Маркер-асоційована селекція являє собою великий інтерес як одна з розробок ДНК-технологій. Потенційні плюси маркер-асоційованої селекції включають: точність прогнозованих показників (успадкованості,  $h^2$ ), яка збільшується, коли інформація по ДНК-маркерам пов'язується з даними щодо продуктивності особини. Гени-кандидати можуть або безпосередньо впливати на продуктивні ознаки, абослугувати в якості маркерів зчеплення з іншими генами, які впливають на ознаки.

Ідентифікація аномалій, зумовлених генетикою та відбраковування тварин-носіїв, а також переважне використання тварин з визначеними

алелями генів господарсько корисних ознак є пріоритетом на сучасному етапі розвитку тваринницької галузі. З огляду на актуальність таких дослідів в науковій спільноті, виробництві та ринку існує практична необхідність у розробці, тестуванні та застосуванні розширеної комплексної генетичної оцінки великої рогатої худоби, взявши за основу методики молекулярної генетики. Таким чином, підвищення продуктивності є основним завданням племінної роботи у скотарстві. Одним із підходів для вирішення цього завдання є застосування ДНК-маркерів для відбору особин, що несуть бажані алелі та генотипи досліджених нами генів адаптивних та продуктивних ознак.

Таким чином, підвищення продуктивності та резистентності тварин до інфекційних захворювань є важливим завданням племінної роботи у скотарстві. Такими підходами для вирішення цього завдання є застосування ДНК-маркерів для відбору особин, що несуть бажані алелі та генотипи досліджених нами генів господарсько корисних ознак, що доповнить їх молекулярно-генетичну характеристику. А також дозволить створити основу для подальшої реалізації маркер-асоційованої селекції. Описані вище питання і зумовили вибір напряму досліджень.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Місце проведення і матеріал досліджень

Експериментальну частину досліджень проведено у період з 2020 по 2023 р. Роботу виконували на базі лабораторії молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН України та навчально-науковій лабораторії молекулярно-генетичних досліджень кафедри біології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Згідно зі схемою для проведення науково-господарського дослідження відібрали 100 голів дійних корів української чорно-рябої молочної породи та 100 голів української червоно-рябої молочної породи.

Піддослідні тварини знаходились в однакових технологічних умовах за прив'язного способу утримання з доїнням в молокопровід, з цілорічною однотипною годівлею на основі стандартних раціонів в умовах ДП «ДГ «Гонтарівка» Інституту тваринництва НААН України (Харківська область, Вовчанський район).

Годівля корів здійснювалася за використання загальнозмішаного раціону (TMR – total mixed ration). Основу раціону корів становила кормосуміш із силосу кукурудзяного, сінажу люцерни та сіна вико-вівсяного, що був збалансований за основними поживними речовинами, кількість яких коригували відповідно до фізіологічного стану та рівня середньодобового надою. Основна інформація щодо характеристики раціону для корів дослідних порід наведена в додатку Б.

Згідно з даними бонітування молочної худоби, стада української чорно-рябої та української червоно-рябої молочних порід відносяться до чотирьох генетичних груп (лінії Рефлекшн Северінг, Айвенго, Чіфа, Валіанта). Популяції української чорно-рябої молочної породи мають статус племінного

заводу, в той час як група тварин української червоно-рябої молочної утримувалися з перспективою створення племінного репродуктора.

Для проведення генетико-популяційних досліджень використовували наступні об'єкти: ген толл-подібного рецептору 1 (1596G>A), ген толл-подібного рецептору 4 (8732G>A; 8834G>C; 2021C>T); ген мембранного білка A1 (7400C>G, 7808A>T), ген фактора некрозу пухлини  $\alpha$  (-824A>G), ген манозозв'язувального лектину 1 (2651G>A) і ген гамма-рецептора інтерферону 2 (1008A>G).

Загальна схема досліджень представлена на рис. 2.1.



**Рис. 2.1** Загальна схема досліджень

На першому етапі досліджень проводили оптимізацію методів генотипування особин ВРХ за локусами кількісних ознак з використанням PCR-RFLP маркерів (Полімеразна Ланцюгова Реакція – Поліморфізм Довжин Рестрикційних Фрагментів). Також проводили біоінформаційні дослідження за обраними ДНК-маркерами з метою визначення відповідності параметрів ампліфікації теоретичним розрахункам (специфічність гібридизації, розмір фланкованого фрагменту, розмір ампліконів, створення рестрикційних мап).

На другому етапі з використанням оптимізованих методик досліджували поліморфізм локусів толл-подібних рецепторів 1 і 4 (*TLR1*, *TLR4*); мембранного білка А1 (*SLC11A1*), фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (*TNF $\alpha$* ), манозозв'язувального лектину 1 (*MBL1*) і гамма-рецептора інтерферону 2 (*IFNGR2*) в дослідних популяціях ВРХ.

На третьому етапі досліджень проводили аналіз наявної генетичної структури дослідних популяцій тварин. Також проводили порівняльний аналіз особливостей генетико-популяційних характеристик двох різних популяцій корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід за виявленими поліморфними локусами.

На четвертому етапі проводили дослідження з аналізу зв'язку різних алельних варіантів виявлених поліморфних локусів з показниками продуктивності корів обох порід.

На заключному етапі на основі отриманих даних розробляли формули бажаних генотипів для кожної з дослідних порід корів для пропозиції їх використання в подальшій селекційній роботі з дослідними популяціями.

## **2.2 Перелік використаного обладнання**

Для виконання досліджень використовували наступне обладнання:

1. Програмовані термоциклери AMPLY 4 Biosom та MiniAmp (Thermo Fisher Scientific).
2. Твердотільний термостат ТЕРМО-48 (Biokom).



3. Мікроцентрифуги: Combi-spin FVL-2400N (Biosan), MiniSpin (Eppendorf), мікроцентрифугу типу вортекс.
4. Блок живлення для електрофорезу «Cleaver Scientific».
5. Камера для вертикального електрофорезу Cleaver Scientific max Omni (розмір гелю 20 × 20).
6. УФ-трансілюмінатор Clear View «Cleaver Scientific».
7. Набір автоматичних піпет-дозаторів змінного об'єму (0,5 – 10, 2 – 20, 20 – 200, 100 – 1000 мкл) Labmate (HTL, Польща).
8. Холодильна камера «Snaige».
9. Цифрова дзеркальна фотокамера DSRL Sony α330.

### 2.3 Методики та методи досліджень

**Відбір біологічного матеріалу для проведення ДНК-типуювання.** В якості джерела ДНК використовували біологічний матеріал – волосяні фолікули від кожної особини. Біологічний матеріал від кожної особини окремо пакували та маркували.

**Виділення ДНК.** Виділення ДНК з дослідних зразків проводили за використання комерційного набору реагентів «ДНК-сорб-В» (AmpliSense Biotechnologies), згідно з інструкціями фірми виробника.

Ефективність виділення ДНК визначали шляхом електрофорезу у 0,7 % агарозному гелі. Проби візуалізували за використання бромистого етидію в ультрафіолетовому спектрі.

**Проведення ампліфікації, параметри полімеразної ланцюгової реакції.** ПЛР проводили за використання програмованих термоциклерів. Для визначення генетичної структури дослідних популяцій корів визначали наступні мутації в цільових генах:

Ген *TLR1*:

- ВсII-поліморфізм у першому екзоні (1596G>A).

Ген *TLR4*:

- MspI-поліморфізм в третьому екзоні (8732G>A);
- RsaI-поліморфізм в третьому екзоні (8834G>C);
- BsiHKA1-поліморфізм в третьому екзоні (2021C>T).

Ген *SLC11A1*:

- PstI-поліморфізм в одинадцятому екзоні (7400C>G; 7808A>T).

Ген *TNF $\alpha$* :

- SacI-поліморфізм у промоторному фрагменті (-824A>G).

Ген *MBL1*:

- StyI-поліморфізм у другому екзоні (2651G>A).

Ген *IFNGR2*:

- BsiHKA1-поліморфізм у сьомому екзоні (1008A>G).

Для ампліфікації таргетних фрагментів обраних генів застосовували відповідні олігонуклеотиди (праймери) (табл. 2.3.1).

Ампліфікацію виділених фрагментів геному здійснювали за відповідними програмами для кожного локусу: 1 цикл - денатурація 94 °C 5 хв; 35 циклів - денатурація 94 °C 45 с, відпал 45 с (64 °C – для *TLR1*; 59 °C – для *TLR4*; 60 °C – для *SLC11A1*; 53 °C – для *MBL1*; 55 °C – для *TNF $\alpha$* ), елонгація 72 °C 45 с; 1 цикл – фінальна елонгація 72 °C 10 хв. Для локусу *IFNGR2*: 1 цикл: 94 °C – 3 хв.; 5 циклів 94 °C – 30 с, 61 °C – 30 с, 72 °C – 40 с; 30 циклів: 94 °C – 15 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 40 с; 1 цикл: 72 °C – 5 хв. Об'єм реакційної суміші становив 20 мкл, концентрація праймерів – 0,2 мкМ у кожному випадку.

**Проведення рестрикції ампліфікованих фрагментів.** Обробку ампліфікованих фрагментів здійснювали відповідними ендонуклеазами рестрикції згідно зі стандартними протоколами фірми виробника (Thermo Scientific та New England Biolabs). Перелік та характеристику використаних ендонуклеаз рестрикції наведено у табл. 2.3.2.

**Проведення електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації/рестрикції.** Продукти ампліфікації/рестрикції розділяли в агарозних гелях з різною концентрацією 1,5–3,0 %. Фарбування гелів

здійснювали за використання бромистого етидію (0,5 мкг/мл). Розміри ампліфікованих/рестрикційних фрагментів визначали за використання маркерів молекулярних мас – М-10, М-12, М-20, М-50, М-100 (Ізоген).

Таблиця 2.3.1

### Нуклеотидні послідовності олігонуклеотидів

Локус	Нуклеотидна послідовність	Розмір амплікону (bp)	Ендо-нуклеаза рестрикції	Посилання
<i>TLR1</i> (1596G>A)	ttagcagcctttccatact; cagatccaggtagatacagag	354	BclII	Arslan K. et. al., 2011
<i>TLR4</i> (8732G>A; 8834G>C)	gcctaaaccacctctccac; agaagggtttagacttct	682	MspI RsaI	Elmaghraby M.M. et. al., 2018
<i>TLR4</i> (2021C>T)	aacaggtagcccagacagcattt; gcacgcctctccaagttc	579	BsiHKA1	Beecher C. et. al., 2010
<i>SLC11A1</i> (7400C>G; 7808A>T)	tgtgcttcacatctccttcta; agcacattgagcaggtcggt	936	PstI	Liu K. et. al., 2017
<i>TNF<math>\alpha</math></i> (-824A>G)	gagaaatgggacaacctcca; ccaggaactcgctgaaactc	249	SacI	Bojarojć-Nosowicz B. et. al., 2015
<i>MBL1</i> (2651G>A)	ggtggcaaattgttgcta; gtcttctgagcatcctcca	162	StyI	Wang C. et. al., 2011
<i>IFNGR2</i> (1008A>G)	atcttagatgccctggac; cgactgaacgactttcac	306	BsiHKA1	Prakash O. et. al., 2014

Генотипування особин проводили за використання аналізу розподілу рестрикційних фрагментів на електрофореграмах.

*TLR1* – розмір ампліфікованого фрагменту складає 354 п.н. Алель А (BclII+) представлений фрагментами розміром 261, 72 та 21 п.н.; G (BclII-) –

Таблиця 2.3.2

## Характеристика ендонуклеаз рестрикції

№п/п	Ендонуклеаза рестрикції	Сайт рестрикції
1.	<i>BclI</i>	CCN>NNNN↓NNGG
2.	<i>MspI</i>	C↓CGG
3.	<i>PstI</i>	CTGCA↓G
4.	<i>RsaI</i>	GT↓AC
5.	<i>SacI</i>	GAGCT↓C
6.	<i>StyI</i>	C↓CWWGG
7.	<i>BsiHKA1</i>	GWGCW↓C

*TLR4* – у випадку *MspI*-поліморфізму розмір ампліфікованого фрагменту складає 682 п.н. Алель А представлений фрагментом розміром 682 п.н.; В – 490, 110 і 82 п.н. Для *RsaI*-поліморфізму розмір ампліфікованого фрагменту складає 664 п.н. Алель А представлений фрагментом розміром 664 п.н.; G – 348, 212 і 104 п.н. У разі *BsiHKA1*-поліморфізму, розмір ампліфікованого фрагменту складає 579 п.н. Алель С представлений фрагментами розміром 485 та 94 п.н.; Т – 579 п.н.

*SLC11A1* – генотипи GG і TT представлені на електрофореграмі фрагментами розміром 633 і 303 п.н.; CC і AA – 227 і 709 п.н.; CG і AT – 227, 709, 633 і 303 п.н.; CC і TT – 227, 406 і 303 п.н.; CG і TT – 227, 406, 709 і 303 п.н.; CC і AT – 227, 406, 303, 227 і 709 п.н.

*TNF $\alpha$*  – розмір ампліфікованого фрагменту складає 639 п.н. Алель А представлений одним фрагментом довжиною 639 п.н., G – 222 та 417 п.н.

*MBL1* – розмір ампліфікованого фрагменту складає 162 п.н. Алель А представлений фрагментами розміром 141 і 21 п.н., G – 162 п.н.

*IFNGR2* – розмір ампліфікованого фрагменту складає 306 п.н. Алель А представлений фрагментом розміром 306 п.н.; G – 200, 106 п.н.

## 2.4 Біоінформаційні методи аналізу нуклеотидних послідовностей

Під час оптимізації протоколів ампліфікації для генотипування за окремими маркерними мутаціями та у процесі розробки способу одночасного визначення генотипів досліджуваних корів за мутаціями 1596G>A в гені *TLR1*; 8732G>A, 8834G>C та 2021C>T в гені *TLR4*; 7400C>G, 7808A>T в гені *SLC11A1*; -824A>G в *TNF $\alpha$* ; 2651G>A в *MBL1* та 1008A>G в *IFNGR2* проводили аналіз нуклеотидних послідовностей, зокрема підбір праймерів, побудову рестрикційних карт для моделювання патернів рестрикції, вирівнювання нуклеотидних послідовностей, використовуючи онлайн-утиліту BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [187].

## 2.5 Аналіз генетико-популяційних показників дослідних порід корів

Генетико-популяційні параметри дослідних порід аналізували шляхом оцінки частот генотипів і алелів, ступенів фактичної та очікуваної гетерозиготності, величин індексу фіксації Райта, ефективного числа алелів, відповідності розподілу генотипів стану рівноваги за Харді-Вайнбергом [188-190].

Частоти зустрічальності генотипів ( $P_{AA}$ ) за кожним з поліморфних локусів визначали за формулою 2.1:

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

де  $n_{AA}$  – кількість особин з генотипом AA;

$N$  – загальний об'єм вибірки.

Частоти алелів ( $p_A$ ,  $p_B$ ) розраховували за формулами максимальної

правдоподібності 2.2 і 2.3:

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

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

де  $n_{AA}$ ,  $n_{AB}$ ,  $n_{BB}$  – кількість особин з генотипами AA, AB, BB, відповідно;

$2N$  – загальне число алелів у вибірці для диплоїдних організмів [190].

Фактичну гетерозиготність ( $H_o$ ) за окремими мутаціями розраховували за формулою 2.4:

$$H_o = \frac{n_{AB}}{N}, \quad (2.4)$$

де  $n_{AB}$  – число гетерозигот у вибірці;

$N$  – загальне число особин у вибірці.

Очікувану гетерозиготність ( $H_e$ ) за окремими мутаціями визначали за формулою 2.5:

$$H_e = 2p_A p_B, \quad (2.5)$$

де  $p_A$ ,  $p_B$  – частоти алелів А і В.

Індекс фіксації Райта ( $F_{is}$ ) розраховували за формулою 2.6:

$$F_{is} = \frac{H_e - H_o}{H_e}, \quad (2.6)$$

де  $H_e$  – очікувана гетерозиготність;

$H_o$  – фактична гетерозиготність.

Ефективне число алелів ( $n_e$ ) розраховували за формулою 2.7:

$$n_e = \frac{1}{p_A^2 + p_B^2}, \quad (2.7)$$

де  $p_A$ ,  $p_B$  – частоти алелів А і В в межах однієї мутації.

Відповідність розподілу частот генотипів стану генетичної рівноваги відносно рівняння Харді-Вайнберга оцінювали з використанням критерію  $\chi^2$ , за алгоритмом, наведеним Меркур'євою [189, 190]. Розрахунок фактичної величини  $\chi^2$  здійснювали за формулою 2.8:

$$\chi^2 = \sum \frac{(H-O)^2}{O}, \quad (2.8)$$

де  $H$  – фактичне число особин із певним генотипом;

$O$  – очікуване число особин із певним генотипом.

Достовірність відмінностей частот генотипів та алелів між популяціями оцінювали за допомогою  $t$ -критерію Стюдента з використанням  $\phi$ -перетворення Фішера та поправки Йейтса [191].

Зв'язок різних генотипів тварин з показниками продуктивності аналізували з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) та критерію множинних порівнянь Тьюкі-Крамера в якості інструменту post-hoc тестування. Розрахунки проводили у середовищі програми Microsoft Excel з використанням Real Statistics Resource Pack (<https://real-statistics.com/free-download/real-statistics-resource-pack/>).

Перевірку розподілу на нормальність проводили за критерієм Шапіро-Уїлка. У випадку, якщо розподіл вірогідно відрізнявся від нормального, використовували непараметричний  $U$ -критерій Манна-Уїтні та Краскела-Уоліса [192].

Для аналізу параметрів молочної продуктивності тварин визначали наступні показники: надій (кг), жирномолочність (%), вміст білка в молоці (%). При цьому порівнювали виключно тварин за трьома лактаціями.

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

### РОЗДІЛ 3

## РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

За допомогою використання методів біоінформатики із залученням online інструментарію відкритих наукових ресурсів (NCBI) проведено аналіз параметрів фланкування таргетних фрагментів цільових досліджуваних локусів, локалізовано поліморфні сайти для відповідних ендонуклеаз рестрикції та створено рестрикційні мапи. Крім того, визначено ефективність гібридизації праймерів на матриці ДНК (PickPrimers) та встановлено розмір ампліфікованих фрагментів.

Серед локусів кількісних ознак, вплив яких на продуктивні ознаки перспективно досліджувати для вирішення питань MAS в молочному скотарстві України, ми розглянемо в своїй роботі наступні гени: Toll-подібного рецептору 1 (*TLR1*), Toll-подібного рецептору 4 (*TLR4*), мембранного білка A1 (*SLC11A1*), фактора некрозу пухлини  $\alpha$ , манозозв'язувального лектину 1 (*MBL1*) та гамма-рецептора інтерферону 2 (*IFNGR2*) в популяціях корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід.

Для більшості досліджуваних об'єктів генотипування особин дослідних популяцій тварин проведено за використання методу PCR-RFLP. Для цього підбрано праймери, що фланкують потрібну ділянку гена, за використання відповідних джерел проаналізовано та змодельовано ймовірні патерни рестрикції, що будуть утворюватися під час рестрикційного аналізу визначеного фрагменту. Для запобігання хибній інтерпретації результатів через можливу присутність артефактів ПЛР, ретельно оптимізовано протоколи ПЛР для ампліфікації дослідних фрагментів геному.



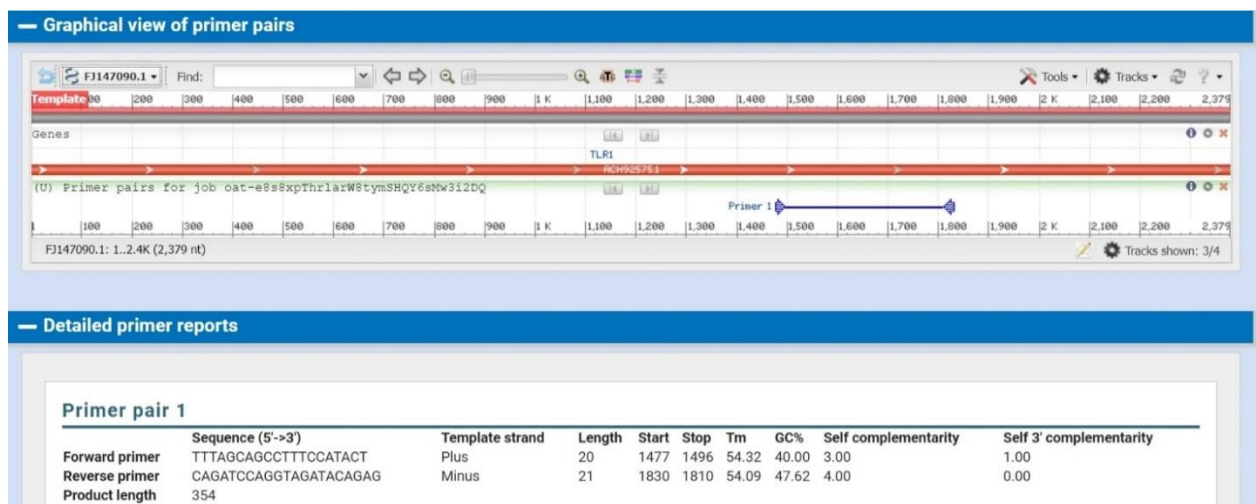
### **3.1 Аналіз ефективності генотипування за локусами кількісних ознак та оптимізація методів проведення ампліфікації за використання біоінформатики**

Ефективність використання різних праймерних систем для ампліфікації дослідних фрагментів залежить від деяких факторів. По-перше, різниця між рестрикційними фрагментами повинна бути не менш ніж 20 п.н., оскільки це найменше значення у практичному сенсі, яке може бути диференційовано за використання агарозних гелів. У свою чергу, для ефективного генотипування використання саме агарозних гелів – безумовна вимога. По-друге, праймери повинні фланкувати фрагмент певного розміру, який дасть змогу отримувати патерни рестрикційних фрагментів, що достатньо відрізняються від візуальної детекції. Тобто розміри рестрикційних фрагментів не мають бути меншими, ніж 50 п.н., що в протилежному випадку може призвести до неможливості їх диференціювання в агарозних гелях. По-третє, бажано, щоб температура відпалу прямого та зворотнього праймерів була максимально близькою за своїм значенням, що значно посилить ефективність ампліфікації таргетного фрагменту. Тільки за умов відповідності загальним вимогам можливо ефективно використовувати праймерну систему з метою генотипування особин.

Аналіз алельного різноманіття локусу *TLR1* проводили з визначення ВсII-поліморфізму першого екзону гена. Для ампліфікації екзонної частини *TLR1* використовували праймери TTTAGCAGCCTTTCCATACT та CAGATCCAGGTAGATACAGAG [193]. Для визначення розміру відповідного фланкованого фрагменту та специфічності гібридизації праймерів на ДНК-мішені проведено обробку даних у GenBank, використовуючи програму «BLAST online» за стандартних параметрів, що є вільним програмним ресурсом Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). За результатами аналізу виявлений

фрагмент використовували в якості стандартного патерну. Для гена *TLR1* виявлена послідовність, яка повністю (100 %) відповідає нуклеотидній структурі праймера – *Bos taurus* toll-like receptor 1 longform, FJ147090.1.

За використання опції PickPrimers визначено розмір фланкованої ділянки та, за рахунок пошуку конкретних нуклеотидних послідовностей, – сайт для *BclI*, завдяки чому складено патерни рестрикції, що відповідають певним алелям А і G. Крім того, із використанням емпіричної формули встановлено температурні ліміти відпалу для проведення ампліфікації дослідного фрагменту ДНК, які становили 64 °С. Детальні результати аналізу ефективності застосування обраних праймерів для локусу *TLR1* відображено на рис. 3.1.



**Рис. 3.1** Результати online підбору праймерів (Pick Primers) для фланкування першого екзону гена *TLR1* згідно з базою даних NCBI

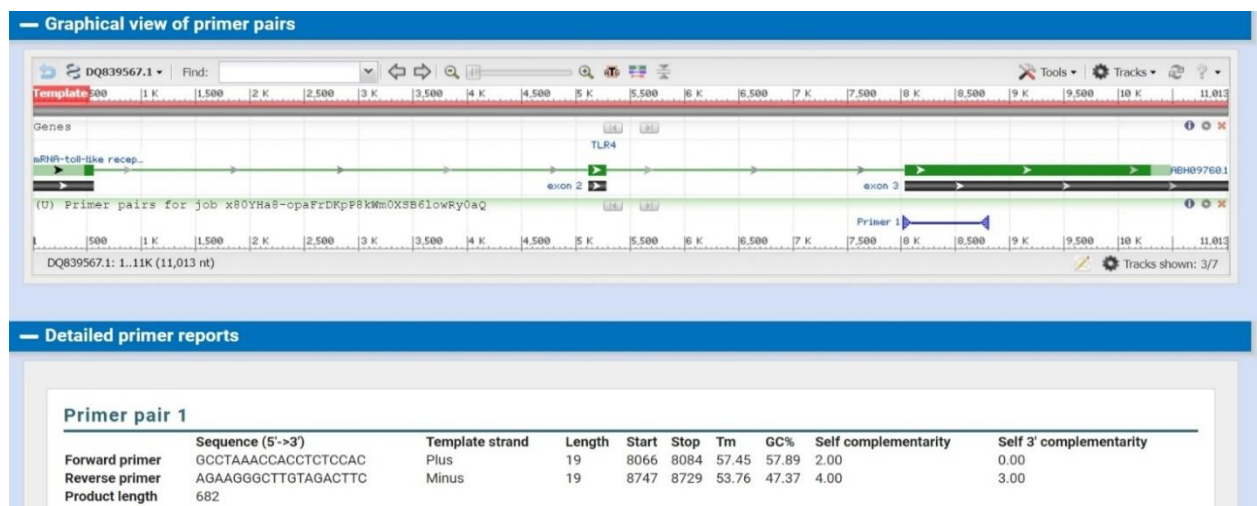
Розмір ампліфікованого фрагмента складає 354 п.н. Алель А містить у своєму складі два сайти рестрикції для *BclI*, алель G – один. Установлені патерни рестрикції повністю збігаються з очікуваними.

Аналіз отриманої електрофореграми продуктів ампліфікації першого екзону гена *TLR1* повністю підтверджує теоретичні розрахунки – розмір амплікона співпадає з очікуваним.

Аналіз розподілу алелів локусу *TLR4* здійснювали для визначення

MspI-, RsaI- та BsiHKA I-поліморфізму в третьому екзоні. Для ампліфікації дослідного фрагменту *TLR4* (MspI-, RsaI-поліморфізм) використовували праймери GCCTAAACCACCTCTCCAC та AGAAGGGCTTGTAGACTTCT [194].

На рис. 3.2 наведено результати аналізу ефективності застосування обраних праймерів для фланкування третього екзону гена *TLR4*.



**Рис. 3.2** Результати online підбору праймерів (Pick Primers) для фланкування третього екзону гена *TLR4* згідно з базою даних NCBI

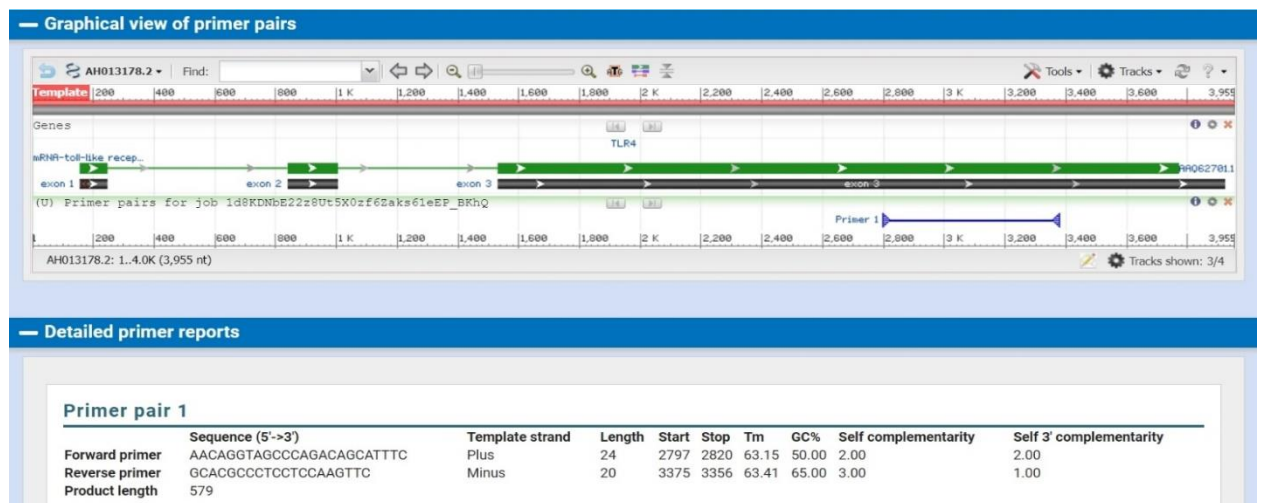
Розмір ампліфікованого фрагменту склав 682 п.н.

У свою чергу, для дослідження BsiHKA I-поліморфізму гена *TLR4* використовували праймери AACAGGTAGCCCAGACAGCATTTTC та GCACGCCCTCCTCCAAGTTC [195]. За результатами біоінформаційного аналізу розмір амплікону становив 579 п.н. За результатами аналізу дані фрагменти використовували як стандартні патерни рестрикції.

У випадку *TLR4* виявлено послідовності, які повністю (100 %) відповідають нуклеотидній структурі відповідних праймерів – Bos taurus toll-like receptor 4 (TLR4) gene, complete cds, DQ839567.1 (MspI-, RsaI-поліморфізм) та Bos taurus chromosome 8 toll-like receptor 4 (TLR4) gene, complete cds, AN013178.2 (BsiHKA I-поліморфізм).

На рис. 3.3 наведено результати аналізу ефективності застосування

обраних праймерів для ампліфікації фрагменту третього екзону гена *TLR4*.



**Рис. 3.3** Результати online підбору праймерів (Pick Primers) для фланкування фрагменту третього екзону гена *TLR4* (BsiHKAІ-поліморфізм)

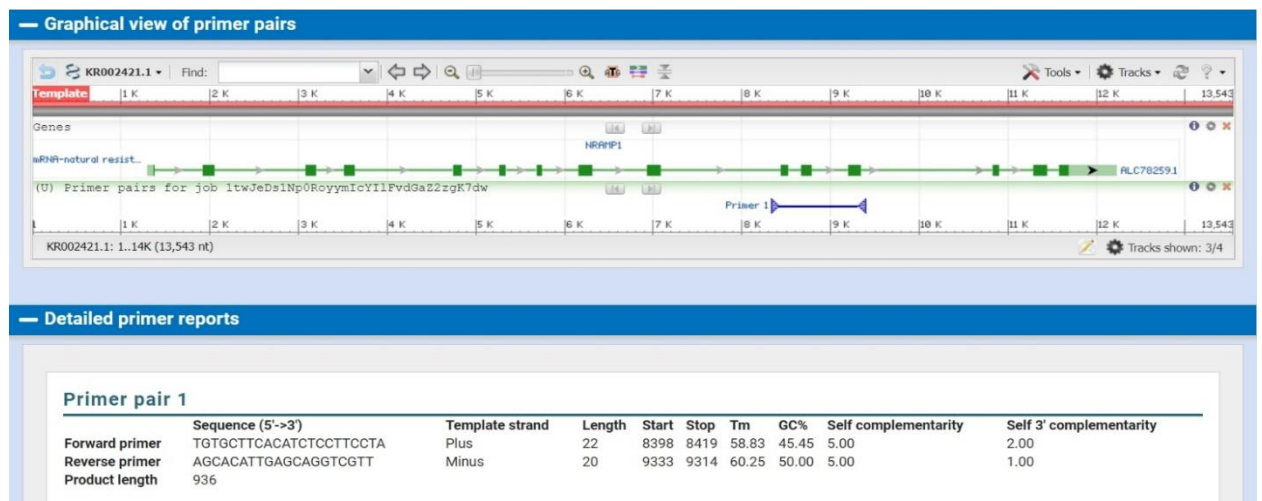
За результатами виявлення таргетної послідовності проводили аналіз специфічності гібридизації наведених праймерів із застосуванням PickPrimers, а також встановлювали в ній точне положення амплікону. В середині послідовності проведено пошук шаблону рестрикційного сайту для ендонуклеаз рестрикції *MspI*, *RsaI* та *BsiHKAІ*, що дало можливість виявити патерни рестрикції та відповідні алелі для кожної з них. Так, для *MspI* алель А не має у своєму складі сайтів рестрикції, алель В налічує два сайти. У випадку з *RsaI* така ж ситуація – в алеля А відсутні сайти рестрикції, в той час як в алеля G – в наявності два. У свою чергу, для ендонуклеази *BsiHKAІ* алель С містить один сайт, в алеля Т він відсутній. Визначений граничний температурний інтервал за використання емпіричної формули для максимально ефективною гібридизації праймерів на ДНК-мішені складає 59 °С. Результати електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації дослідних фрагментів гену *TLR4* повністю відповідають очікуваним.

Алельне різноманіття локусу *SLC11A1* визначали за *PstI*-поліморфізмом в 11 екзоні гена. Для проведення ампліфікації дослідного

фрагменту *SLC11A1* використовували праймери TGTGCTTCACATCTCCTTCCTA та AGCACATTGAGCAGGTCGTT [17].

Детальна інформація про результати гібридизації праймерів для ампліфікації фрагменту локусу *SLC11A1* вказана на рис. 3.4. На основі проведеної обробки даних у GenBank, з допомогою програми «BLAST online» для *SLC11A1* виявлений повний збіг (100 %) з послідовністю *Bos taurus* natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene, complete cds, KR002421.1 (характеризує повну послідовність гена *SLC11A1*). Вказану послідовність із застосуванням онлайн-інструменту PickPrimers проаналізували для визначення розміру фрагмента гена, фланкованого праймерами, а також для встановлення точного положення амплікону у послідовності. За використання функції PickPrimers встановлено утворення амплікону, розміром 936 п.н., що повністю відповідає передбачуваному.

На рис. 3.4 наведено результати аналізу ефективності застосування обраних праймерів для ампліфікації 11 екзону гена *SLC11A1*.



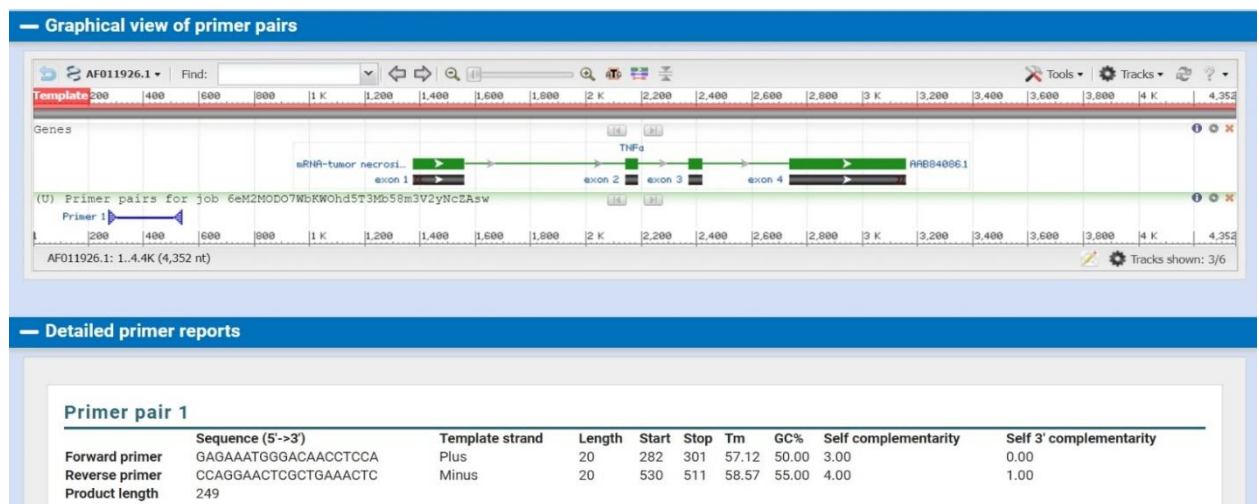
**Рис. 3.4** Результати online підбору праймерів (Pick Primers) для фланкування 11 екзону гена *SLC11A1*

В нуклеотидній послідовності амплікону проведено пошук шаблону рестрикційного сайту для PstI, що дало змогу виявити патерни рестрикції та відповідні алелі. За проведеним генотипуванням досліджуваних тварин

виявлено дві мутації у фрагменті, що аналізується (SNP5 7400C>G і SNP6 7808A>T) за даними Liu K. et. al. [17]. Вони мають два SNP в дослідному фрагменті (SNP5 і SNP6), де SNP5 представлений варіантами C і G, SNP6 – A і T. У даному випадку складний генотип є різновидом гаплотипу.

Крім того, визначено граничний температурний інтервал, що відповідає максимально ефективній гібридизації праймерів на ДНК-мішені, базуючись на нуклеотидному складові використаних праймерів для *SLC11A1* із застосуванням емпіричної формули. Температура відпалу праймерів становила 60 °С.

Розподіл алелів локусу *TNF $\alpha$*  визначали за SacI-поліморфізмом в промоторній області. Для ампліфікації дослідного фрагменту гена *TNF $\alpha$*  використовували праймери GAGAAATGGGACAACCTCCA та CCAGGAACTCGCTGAAACTC [121]. Розширена інформація про праймери для ампліфікації дослідного фрагменту локусу *TNF $\alpha$*  наведена на рис. 3.5.



**Рис. 3.5** Результати online підбору праймерів (Pick Primers) для фланкування промоторного фрагменту гена *TNF $\alpha$*

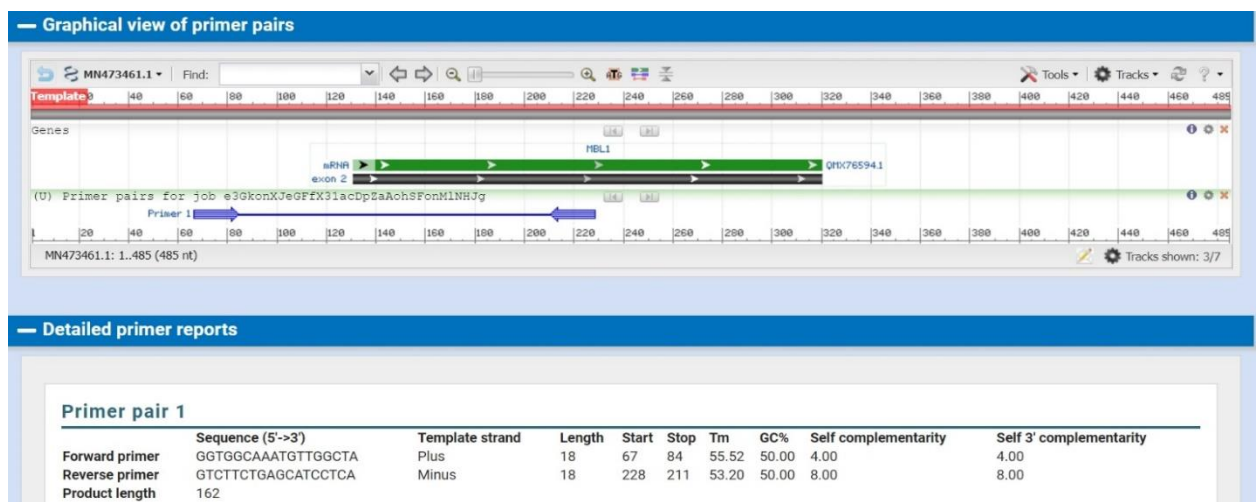
За допомогою обробки даних у GenBank визначено розмір відповідного фланкованого фрагменту та специфічність гібридизації праймерів. За результатами аналізу виявлений фрагмент використовували в якості стандартного патерну. У випадку гена *TNF $\alpha$*  виявлено послідовність, яка



повністю (100 %) відповідає нуклеотидній структурі праймера – *Bos taurus* tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) gene, complete cds, AF011926.1. За використання опції PickPrimers встановлено розмір амплікону, що дорівнює 249 п.н. За рахунок пошуку конкретних нуклеотидних послідовностей знайдено сайт для SacI, завдяки чому складено патерни рестрикції, що відповідають визначеним алелям. Зокрема, для алеля А налічується один сайт рестрикції, для алеля G він відсутній.

Також із використанням емпіричної формули встановлено температурний ліміт відпалу для наступної ампліфікації дослідного фрагменту ДНК, який становив 62 °С.

Аналіз алельного різноманіття локусу манозозв'язувального лектину (*MBL1*) проводили з визначення StyI-поліморфізму другого екзону гена (мутація g.2651G>A). Для ампліфікації екзонної частини *MBL1* використовували праймери GGTGGCAAATGTTGGCTA та GTCTTCTGAGCATCCTCA [140]. Детальні відомості про пари праймерів для ампліфікації фрагмента локусу *MBL1* представлені на рис. 3.6.

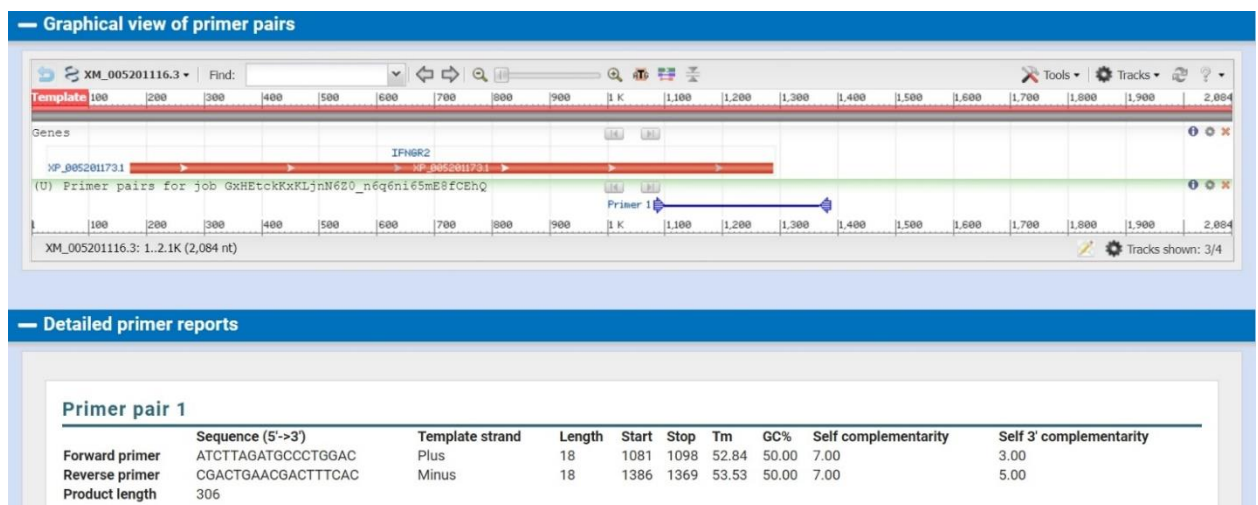


**Рис. 3.6** Результати online підбору праймерів (Pick Primers) для фланкування другого екзону гена *MBL1*

Температура відпалу праймерів становила 53 °С. Розмір ампліфікованого фрагмента – 162 п.н. За результатами аналізу виявлений

фрагмент використовували як стандартний патерн. Що стосується гена *MBL1*, для нього виявлена послідовність, яка повністю (100 %) відповідає нуклеотидній структурі праймера – *Bos taurus* breed Holstein-Friesian *MBL1* (*MBL1*) gene, *MBL1*-Aallele, exon 2, and *MBL1* (*MBL1*) gene, *MBL1*-Aallele, partialcds, MN473461.1.

Алельне різноманіття локусу *IFNGR2* визначали за BsiHKA1-поліморфізмом у сьомому екзоні гена, викликаного транзицією A/G, що призводить до несинонімічного SNP та заміни глутаміну на гістамін(мутація+1008A/G) у відповідному білку. Для проведення ампліфікації дослідного фрагменту *IFNGR2* використовували праймери ATCTTAGATGCCCTGGAC і CGACTGAACGACTTTCAC [163]. Повна інформація про пари праймерів локусу *IFNGR2* зображена на рис. 3.7.



**Рис. 3.7** Результати online підбору праймерів (Pick Primers) для фланкування сьомого екзону гена *IFNGR2*

Температура відпалу праймерів становила 57 °C. Для гена *IFNGR2* виявлено послідовність, яка повністю (100 %) відповідає нуклеотидній структурі праймера – *Bos taurus* interferon gamma receptor 2 (*IFNGR2*), transcript variant X1, XM\_005201116.3. За допомогою функції PickPrimers встановлено розмір амплікону, що дорівнює 306 п.н. За рахунок пошуку



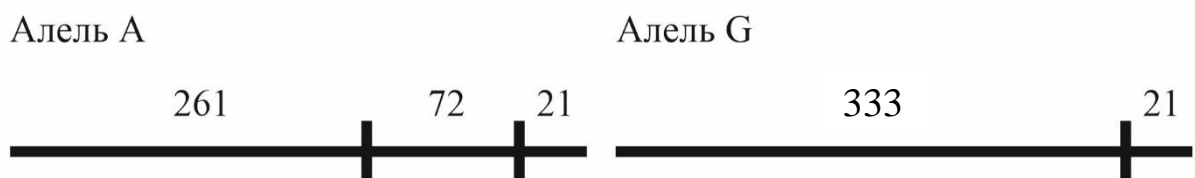
конкретних нуклеотидних послідовностей, знайдено поліморфний сайт для  $Bsi\text{HKA}I$ , завдяки чому складено патерни рестрикції, що відповідають певним алелям.

Ґрунтуючись на результатах попередньої біоінформаційної обробки вихідних даних проведено ампліфікацію досліджуваних генів у лабораторних умовах. Показано відповідність отриманих результатів теоретично очікуваним розрахункам (розмір ампліфікаційних та рестрикційних фрагментів), що дозволяє у подальшому ефективно проводити дослідження особливостей генетичної структури популяцій корів вітчизняної селекції за всіма дослідними локусами (*TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF- $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2*).

### 3.2 $Bcl\text{I}$ -поліморфізм у першому екзоні гена *TLR1*

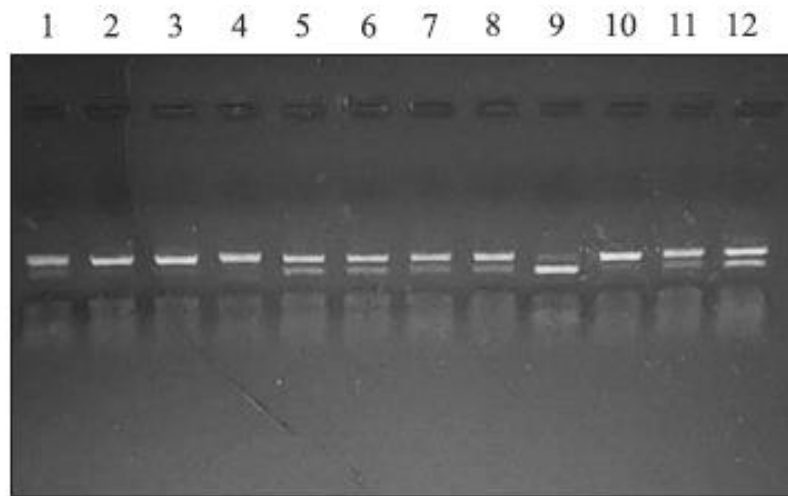
За результатами досліджень визначено поліморфізм гена *TLR1* за маркерною мутацією  $1596G>A$  у першому екзоні в дослідних популяціях української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід корів.

$Bcl\text{I}$ -поліморфізм у першому екзоні гена *TLR1* призводить до виникнення двох алельних варіантів – А ( $Bcl\text{I}+$ ) та G ( $Bcl\text{I}-$ ). Слід відмітити, що кожний з алелів містить у своєму складі також і мономорфний сайт рестрикції для  $Bcl\text{I}$ , що, у свою чергу, дещо полегшує процедуру генотипування. Патерни рестрикції та відповідні алелі наведено на рис. 3.8.



**Рис. 3.8** Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу *TLR1*. Розмір фрагментів наведено в п. н.

На рисунку 3.9 наведено електрофореграму продуктів рестрикції фрагменту першого екзону гена *TLR1*.



**Рис. 3.9** Електрофореграма продуктів рестрикції дослідного фрагменту гена *TLR1* (мутація 1596G>A). 1–4, 10 – генотип GG, 5–8, 11, 12 – генотип AG, 9 – генотип AA.

Генотипи тварин визначали за специфічними патернами рестрикції. Згідно з даними GenBank (FJ147090.1) та з наявними літературними джерелами, в межах амплікону існує один поліморфний сайт рестрикції для рестриктази *BclI*, що визначає існування алельних варіантів А (два сайти рестрикції) та G (один сайт рестрикції) у кожній з досліджених порід. Електрофореграми, отримані у результаті ампліфікації та рестрикції дослідних зразків, повністю співпадають з очікуваними патернами рестрикції. А саме, генотип AA (*BclI*+/*BclI*+) на електрофореграмах представлений фрагментами розміром 261, 72 та 21 п.н.; гетерозиготи AG – комбінацією фрагментів 333, 261, 72 і 21 п.н.; генотип GG (*BclI*-/*BclI*-) фрагментами розміром 333 і 21 п.н.

За результатами генотипування за геном *TLR1* в особин дослідних популяцій української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід виявлено три можливі генотипи (AA, GG та AG), що свідчить про поліморфність даного локусу. Усі отримані продукти рестрикції повністю

відповідали очікуваним результатам, що дозволило успішно генотипувати особин у кожній дослідній популяції. При цьому частоти генотипів української чорно-рябої породи становили: AA – 0,12; AG – 0,64; GG – 0,24. Частоти алелів A і G склали 0,44 і 0,56 відповідно. Результати генотипування особин дали можливість провести подальшу оцінку генетичної структури дослідних популяцій корів за локусом *TLR1*.

Аналіз відповідності розподілу особин за різними генотипами *TLR1* у дослідній популяції корів стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

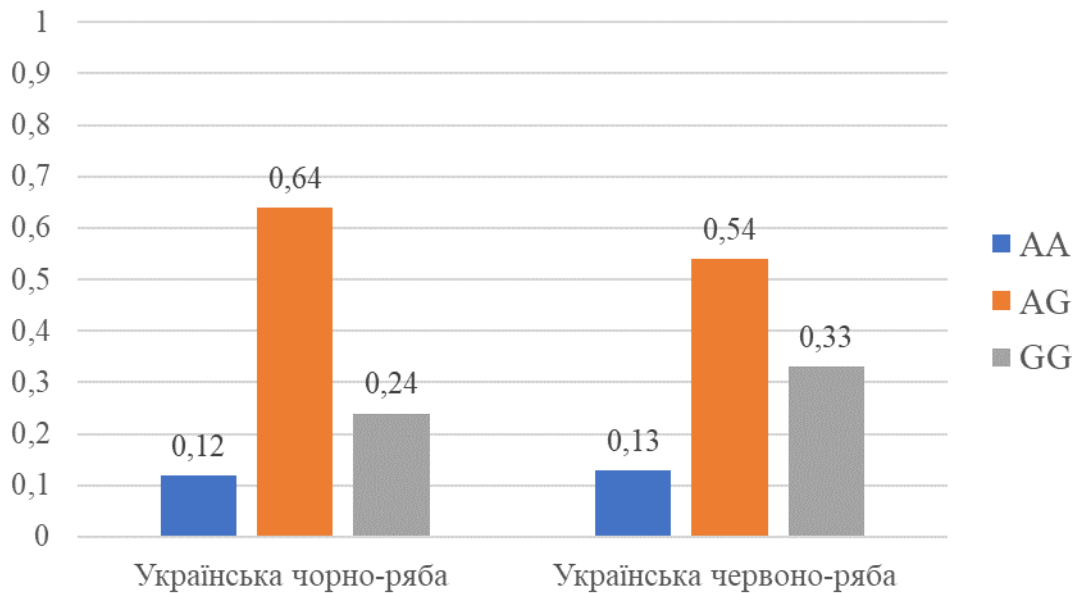
**Відповідність розподілу частот генотипів за локусом *TLR1* (1596G>A) стану генетичної рівноваги у дослідних популяціях корів**

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$
<b>AA</b>	12	19,36	2,80	8,93	13	16	0,562	1,56
<b>AG</b>	64	49,28	4,397		54	48	0,75	
<b>GG</b>	24	31,36	1,727		33	36	0,25	

Згідно з отриманими даними щодо критерію  $\chi^2$  з'ясовано, що за мутацією 1596G>A у гені *TLR1* в популяції української чорно-рябої молочної породи має місце відхилення фактичного співвідношення частот генотипів від очікуваного, тобто від стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, що вказує на виражену дію відбору або на дрейф генів.

За результатами генотипування дослідних порід корів (n = 100 українська чорно-ряба молочна та червоно-ряба молочна) проведено порівняльний аналіз фактичного розподілу генотипів у досліджуваних популяцій. Розподіл частот генотипів у дослідних популяціях представлено

на рисунку 3.10.



**Рис. 3.10** Порівняльний аналіз частот генотипів за мутацією 1596G>A локусу *TLRI* в різних дослідних популяціях корів

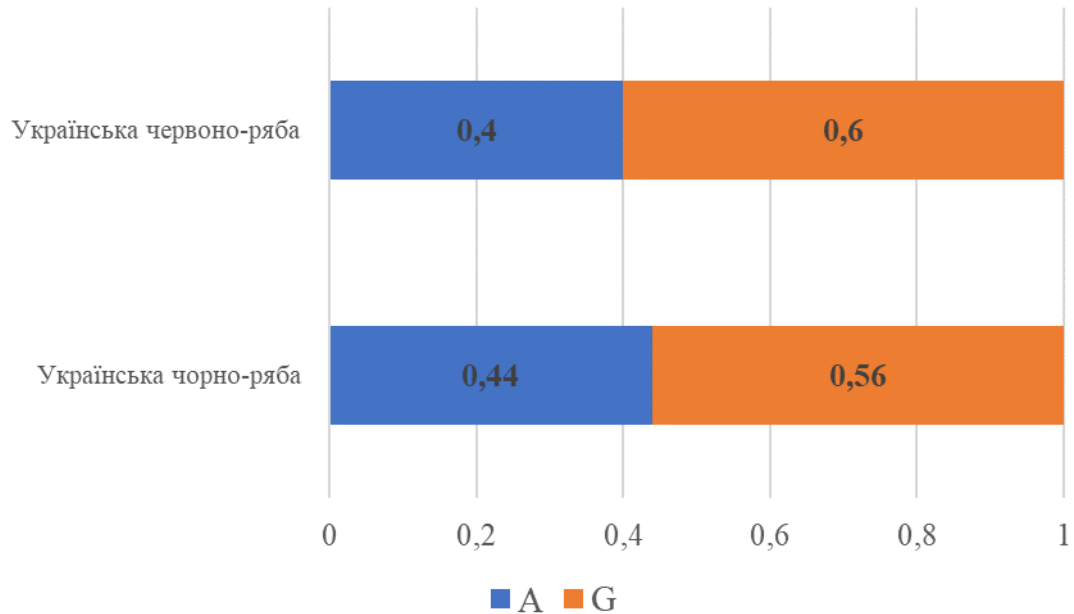
Порівняльний аналіз частот алелів за мутацією 1596G>A гена *TLRI* у дослідних популяціях корів порід української чорно-рябої молочної та червоно-рябої молочної показано на рисунку 3.11.

За результатами отриманих даних за значенням частот алелів переважаючим в двох дослідних популяціях виявився алель G.

Таким чином, у популяції дослідних порід локус толл-подібного рецептора 1 є поліморфним. За цим поліморфізмом українська червоно-ряба молочна, на відміну від чорно-рябої, демонструє відхилення від стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом.

Спільною рисою для досліджуваних порід є переважання частоти алеля G, яке досягало максимального значення в популяції української червоно-рябої породи. Окрім того, виявлено мутантний алель A гена *TLRI* (1596G>A, V>I) у гомозиготному та гетерозиготному станах у 76 % особин чорно-рябої та у 67 % особин червоно-рябої молочних порід. Особини із гомозиготними генотипами за алелем A становили лише 12–13 %. Що стосується алеля G, показники гомозиготності були більш ніж вдвічі вищими для всіх

досліджуваних порід.



**Рис. 3.11** Порівняльний аналіз частот алелів за мутацією 1596G>A локусу *TLR1* в дослідних популяціях корів

Загальні генетико-популяційні характеристики дослідних груп корів наведено у таблиці 3.2.

*Таблиця 3.2*

**Основні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за локусом локусом *TLR1* (1596G>A)**

Порода корів	$S_a$	$n_e$	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$
Українська чорно-ряба молочна	0,51	1,96	0,64	0,49	-0,31
Українська червоно-ряба молочна	0,52	1,92	0,54	0,48	-0,13

В досліджуваних порід корів рівні фактичної гетерозиготності перевищують значення очікуваної гетерозиготності. В цьому випадку

від'ємне значення коефіцієнта  $F_{is}$  свідчить про явний ексцес гетерозигот, який, в свою чергу, може свідчити про виражений аутбридинг в популяції української чорно-рябої молочної породи. У свою чергу, в українській червоно-рябої молочної ексцес гетерозигот виражений не так сильно, що узгоджується з фактом рівноважного стану цієї популяції.

Таким чином, досліджена нами групи тварин характеризуються високим рівнем генетичного поліморфізму та достатньо високим рівнем гетерозиготності. У двох проаналізованих порід гетерозиготність, що спостерігалася, більш ніж на 10 % перевищувала очікувану.

Показник ефективного числа алелів ( $n_e$ ), який демонструє ступінь поліморфності локусу, також наведений у таблиці 3.2. Слід відмітити, що в дослідних популяціях корів спостерігаються дуже високі, практично максимальні для двохалельних систем, значення цього показнику. Таким чином, приймаючи до уваги особливості розподілу частот алелів та генотипів у дослідних популяціях тварин, можна зробити висновок, що локус *TLR1* є перспективною мішенню для проведення подальших досліджень через присутність у досліджуваних породах корів української селекції достатньої кількості особин із різними генотипами.

### 3.3 Поліморфізм гена *TLR4*

Використання рестрикційного аналізу дозволило проаналізувати варіабельність гена *TLR4*, що входить до родини толл-подібних рецепторів, за трьома мутаціями в третьому екзоні – *MspI*-поліморфізм (8732G>A), *RsaI*-поліморфізм (8834G>C) та *BsiHKA1*-поліморфізм (2021C>T). Розглянемо кожний із окремих поліморфізмів послідовно.

#### 3.3.1 *MspI*-поліморфізм у третьому екзоні гена *TLR4* (8732G>A)

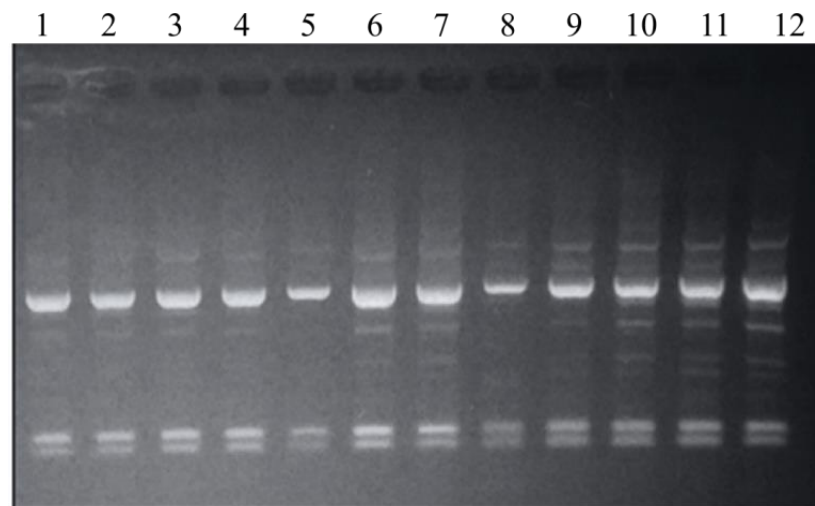
*MspI*-поліморфізм у третьому екзоні гена *TLR4* призводить до

виникнення двох алельних варіантів – А (*MspI*-) та В (*MspI*+). Патерни рестрикції та відповідні алелі наведено на рис. 3.12.



**Рис. 3.12** Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу *TLR4* (*MspI*-поліморфізм). Розмір фрагментів наведено в п.н.

На рисунку 3.13 наведено електрофореграму продуктів рестрикції фрагменту третього екзону гена *TLR4*.



**Рис. 3.13** Електрофореграма продуктів рестрикції досліджуваного фрагменту гена *TLR4* (мутація 8732G>A). 1–12 – генотип ВВ.

На електрофореграмі наявні лише варіанти генотипів з трьох фрагментів розміром 490, 110 і 82 п.н., що за вищенаведеною схемою патернів рестрикції відповідає генотипу ВВ.

За результатами проведених досліджень в усіх дослідних популяціях корів виявлено тільки особин з генотипом ВВ, тварини із генотипами АА та АВ відсутні.

Таким чином, ситуація, що спостерігається, свідчить про мономорфний характер гена толл-подібного рецептора 4 за MspI-поліморфізмом у третьому екзоні, що суттєво відрізняє його від попереднього локусу з родини *TLR*.

Генетична структура дослідних популяцій за MspI-поліморфізмом локусу *TLR4* наведено в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

**Генетична структура дослідних популяцій корів за локусом *TLR4*  
(8732G>A)**

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$
<b>АА</b>	0	-	-	-	0	-	-	-
<b>АВ</b>	0	-	-		0	-	-	
<b>ВВ</b>	100	-	-		100	-	-	

Мономорфний характер локусу *TLR4* значною мірою відрізняє популяції корів української селекції від іноземних локальних популяцій, в яких цей локус виявився поліморфним. Зокрема, в популяціях китайської голштинської та симентальської частоти алелів А та В становлять 0.5467 і 0.4533 та 0.5208 і 0.4792 відповідно [196]. До того ж, показано зв'язок генотипу АА з меншою кількістю соматичних клітин, ніж у алеля В ( $p < 0,05$ ) та з нижчою ймовірністю ураження молочних залоз бактеріальним збудником. Отримані дані дають змогу зробити висновок про притаманність алелю А саме для нативних порід Китаю, проте для підтвердження цього припущення потрібно провести додаткові дослідження на інших породах ВРХ.

Слід зазначити, що мономорфність локусу *TLR4* за мутацією 8732G>А призводить до неможливості його використання у програмах MAS з дослідними породами ВРХ.



### 3.3.2 RsaI-поліморфізм у третьому екзоні гена *TLR4* (8834G>C)

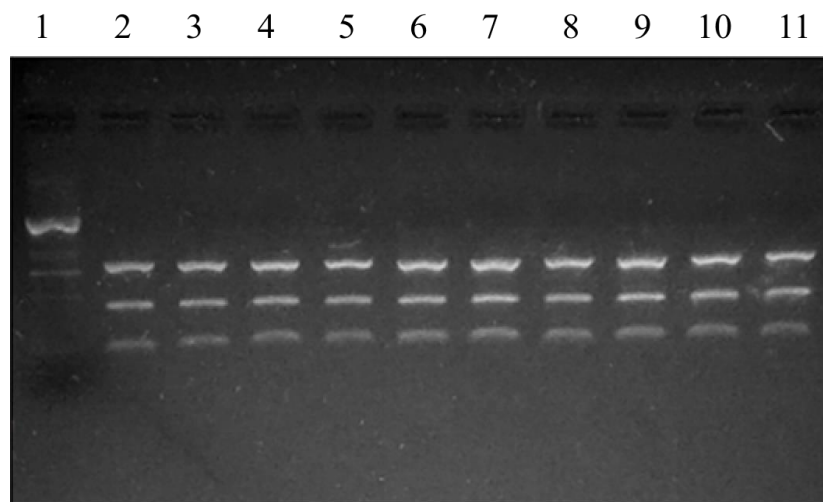
RsaI-поліморфізм у третьому екзоні гена *TLR4* призводить до виникнення двох алелів – А (RsaI-) та G (RsaI+). Генотипи тварин за маркерною мутацією представлені специфічними патернами рестрикції (рис. 3.14).



**Рис. 3.14** Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу *TLR4* (RsaI-поліморфізм). Розмір фрагментів наведено в п.н.

За результатами проведених досліджень встановлено, що в обох дослідних популяціях корів порід української селекції в наявності тільки особини з генотипом GG.

На рис. 3.15 представлено електрофореграму продуктів рестрикції локусу *TLR4* за мутацією 8834G>C (RsaI-поліморфізм).



**Рис. 3.15** Електрофореграма продуктів рестрикції третього екзону гена *TLR4* (мутація 8834G>C). 1 – амплікон, 2–11 – генотип GG.

На наведеній електрофореграмі генотип GG представлений трьома варіантами 348, 212 і 104 п.н. Відповідно, алель А характеризується наявністю фрагментів 348, 212 і 104 п.н., що повністю відповідає очікуваним патернам, які представлені на рис. 3.14. Отже, як і у випадку з MspI-поліморфізмом, отримані дані вказують на мономорфний характер цього локусу в дослідних популяціях.

Генетичну структуру дослідних популяцій корів представлено у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

**Генетична структура дослідних популяцій корів за локусом *TLR4*  
(8834G>C)**

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$
<b>AA</b>	0	-	-	-	0	-	-	-
<b>AG</b>	0	-	-		0	-	-	
<b>GG</b>	100	-	-		100	-	-	

Мономорфний характер даного локусу різко відрізняє популяції корів української селекції від інших, в яких толл-подібний рецептор 4 за RsaI-поліморфізмом у третьому екзоні є поліморфним, проте частоти алелів А та G в яких (згідно з результатами досліджень іноземних вчених) значно варіюють. Так, обидва SNP (rs8193046 і rs8193060) в гені *TLR4* виявились поліморфними в популяціях Сахівал, Тарпаркар та голштино-фризької породи і були значною мірою пов'язані з проявом клінічних ознак паратуберкульозу у різних групах тварин [197].

Слід зауважити, що мономорфність локусу *TLR4* за мутацією 8834G>C унеможливорює його використання у програмах MAS з дослідними породами ВРХ.

### 3.3.3 BsiHKAІ-поліморфізм у третьому екзоні гена *TLR4* (2021С>Т)

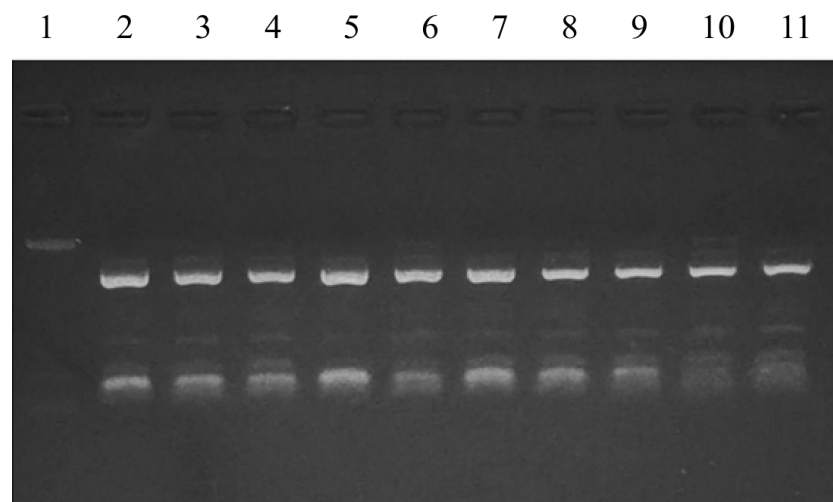
Алельні варіанти гена толл-подібного рецептора 4 виникають внаслідок точкової мутації (SNP) у третьому екзоні в сайті рестрикції для BsiHKAІ, з утворенням двох алелів – С (BsiHKAІ+) і Т (BsiHKAІ-). Генотипи тварин за маркерною мутацією представлені специфічними патернами рестрикції (рис. 3.16).



**Рис. 3.16** Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу *TLR4* (BsiHKAІ-поліморфізм). Розмір фрагментів наведено в п.н.

За результатами проведених досліджень встановлено, що в обох дослідних популяціях корів порід української селекції в наявності тільки особини з генотипом СС.

Електрофореграму продуктів рестрикції локусу *TLR4* за мутацією 8834G>С (RsaI-поліморфізм) наведено на рис. 3.17.



**Рис. 3.17** Електрофореграма продуктів рестрикції досліджуваного фрагменту гена *TLR4* (мутація 2021С>Т). 1 – амплікон, 2–11 – генотип СС.

На наведеній електрофореграмі наявний лише варіант, який складається з двох фрагментів 485 та 94 п.н., що відповідає патерну рестрикції для алеля С у гомозиготному стані.

За результатами досліджень в усіх дослідних породах великої рогатої худоби виявлено тварин виключно з генотипом СС.

Таким чином, картина, що спостерігається, вказує на мономорфний характер гена *TLR4* за BsiHKA1-поліморфізмом у третьому екзоні, що характерно для всіх мутацій в досліджуваному локусі толл-подібного рецептору 4 в популяціях корів молочного напрямку продуктивності української селекції.

Популяції корів української селекції істотно відрізняються від іноземних популяцій ВРХ мономорфним характером локусу толл-подібного рецептору 4, що показано на прикладі української чорно-рябої та червоно-рябої молочної. Зокрема, в популяції корів голштинської породи на півдні Китаю виявлено однонуклеотидний поліморфізм rs8193069 (Т→С) у гені *TLR4*. При цьому аналіз асоціації з продуктивними ознаками, гематологічними та біохімічними параметрами продемонстрував, що особини з генотипом СС мали значно нижчу кількість соматичних клітин (SCC), нижчий відсоток жиру, але вищі значення надою за 305 днів лактації ( $p < 0,01$ ) [198]

Генетичну структуру дослідних популяцій корів представлено в табл. 3.5.

Як правило, локус вважають поліморфним, якщо частота найрозповсюдженішого алеля у дослідній групі не більша, ніж 0,95–0,99 і, відповідно, для двохалельної системи частота другого алеля повинна не перевищувати 0,01–0,05 [199]. Дослідна популяція чисельністю 50 особин дозволяє виявлення алелів з частотою 0,01 і вище (1 гетерозигота з 50 особин), що є достатнім для підтвердження мономорфності чи поліморфності локусу на момент дослідження, однак, як і будь-яка вибіркова оцінка, має деяку похибку. Тому в цьому випадку мономорфність локусу, виявлена за

результатами аналізу в обмеженій групі корів, не обов'язково свідчить про повну відсутність алеля А (MspI- та RsaI-поліморфізм) та алеля Т (BsiHKAІ-поліморфізм) загалом в породі, але, фактично, повністю характеризує конкретну популяцію тварин. При цьому, поза межами дослідної вибірки в популяції можуть бути наявні тварини з іншими генотипами, але їх частка лежить у межах статистичної помилки та не має значення у контексті питань селекційної роботи.

Таблиця 3.5

**Генетична структура дослідних популяцій корів за локусом *TLR4*  
(2021C>T)**

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$
АА	0	-	-	-	0	-	-	-
АС	0	-	-		0	-	-	
СС	100	-	-		100	-	-	

З урахуванням того, що згідно з результатами досліджень доведено, що ген *TLR4* за кожною досліджуваною мутацією (8732G>А, 8834G>С, 2021C>Т) є мономорфним, це унеможливило подальше його використання в селекційних програмах з дослідними популяціями різних порід корів української селекції.

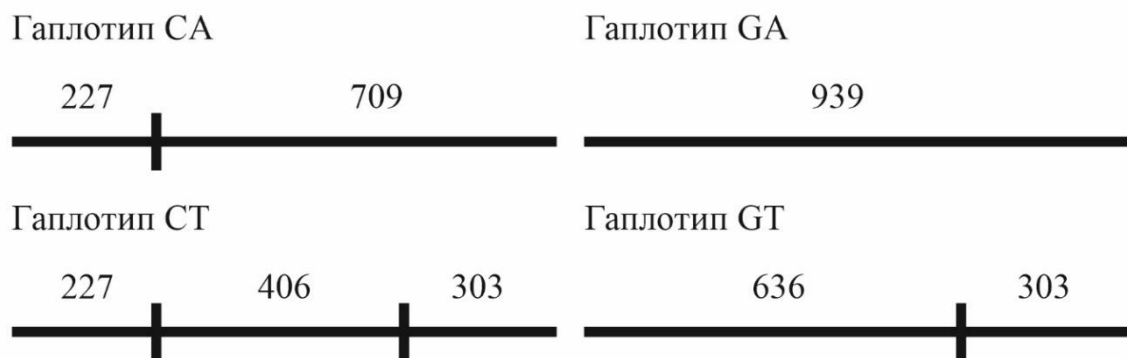
### 3.4 PstI-поліморфізм в одинадцятому екзоні гена *SLC11A1*

Поліморфізм гена *SLC11A1* у популяціях української чорно-рябої та червоно-рябої молочної порід досліджували за двома мутаціями – 7400C>G та 7808A>Т в одинадцятому екзоні, кожна з яких представляє собою PstI-поліморфізм.

Генотипи особин визначали за специфічними патернами рестрикції. Так, в досліджуваному фрагменті виявлено два однонуклеотидних поліморфізми (SNP5 і SNP6), серед яких SNP5 представлений алельними варіантами С і G, SNP6 – варіантами А і Т у всіх дослідних популяціях корів. На відміну від інших випадків, які були розглянуті вище, для PstI-поліморфізму у локусі *SLC11A1* обидва SNP аналізуються одночасно, при цьому стандартним генотипам відповідають патерни гаплотипів.

За результатами проведених досліджень встановлений поліморфізм локусу *SLC11A1* за двома дослідними мутаціями, виявлено особин із різними генотипами для кожної з популяцій.

Загальна схема патернів рестрикції зображена на рис. 3.18.



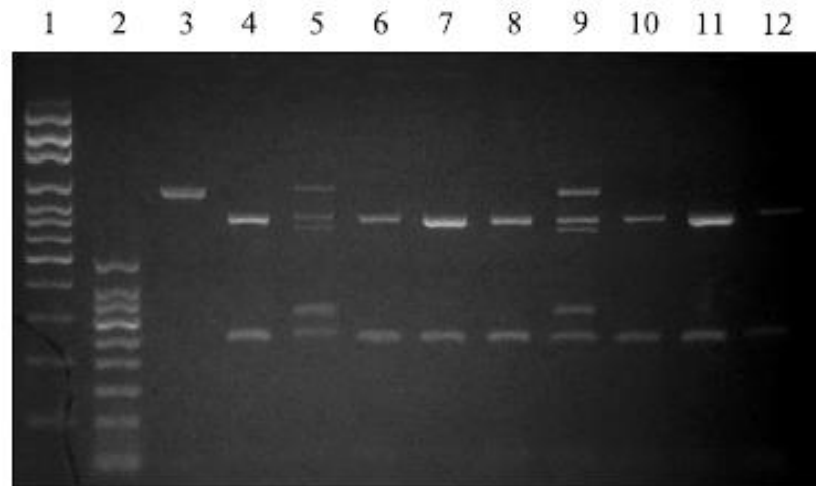
**Рис. 3.18** Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу *SLC11A1* (7400C>G) та (7808A>T). Розмір фрагментів наведено в п.н.

Наявність за PstI-поліморфізмом в 11 екзоні гена *SLC11A1* різних алельних варіантів доводить, що цей локус є поліморфним у всіх досліджуваних популяціях: в обох породах корів виявлені особини з різними генотипами за відповідними мутаціями (7400C>G і 7808A>T).

На рисунку 3.19 представлена електрофореграма продуктів рестрикції одинадцятого экзона гена *SLC11A1* при генотипуванні за мутаціями 7400C>G і 7808A>T.

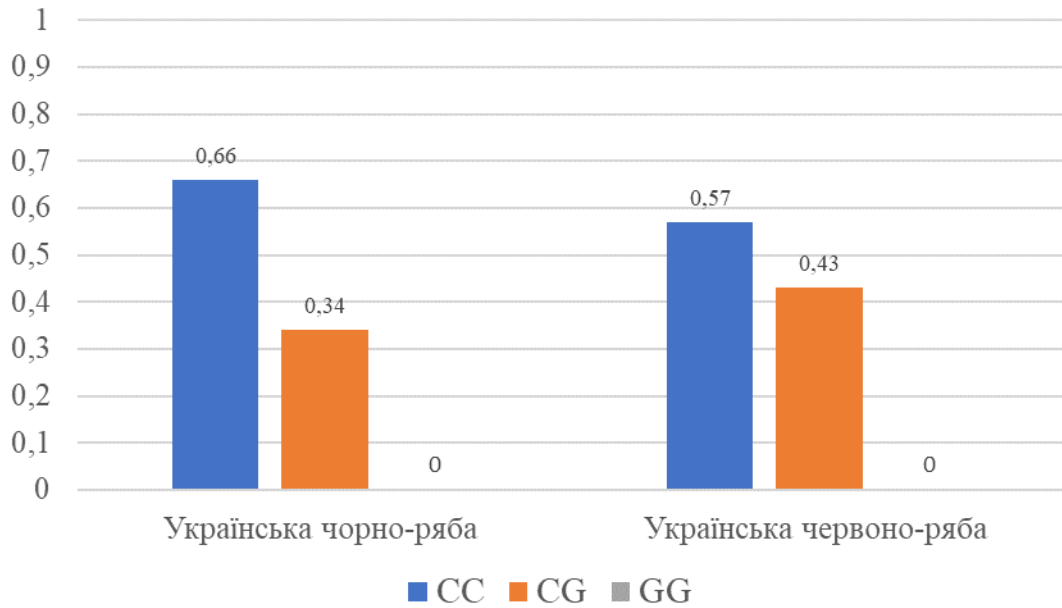
При цьому, у деяких випадках, може спостерігатися недостатня активність ендонуклеази рестрикції, однак, з урахуванням наявності

додаткового мономорфного сайту для PstI у кожному алелі, це практично не створює серйозних труднощів для генотипування особин. Неповна активність ендонуклеази PstI може призвести до утворення альтернативного фрагмента в патерні рестрикції, який за розміром дорівнює амплікону.



**Рис. 3.19** Електрофореграма продуктів рестрикції дослідного фрагменту гена *SLC11A1* (SNP5 і SNP6). 1 – 100 п.н. Ladder ДНК-маркер; 2 – 50 п.н. Ladder ДНК-маркер; 3 – амплікон; 4, 6–8, 10–12 – генотипи CC і AA; 5, 9 – CG і AT.

Одночасно для двох мутацій (раніше визначених за рахунок секвенування та описаних у статті Liu K. et al., 2017) проведено генотипування дослідних популяцій, в результаті якого визначено, що в межах досліджуваних груп тварин зустрічається більшість з усіх можливих варіантів генотипів за обома маркерними мутаціями. Фактично складні генотипи (CC-AA, CG-TT, CG-AT, CG-AA) належать до гаплотипів, що може призвести до спостережуваного співвідношення частот алелів. У всіх дослідних популяціях переважав комплексний генотип CC-AA. Проте, в той же час за мутацією 7400C>G (SNP5) виявлено лише два з трьох генотипів (CC і CG). Особин з гомозиготним генотипом GG не ідентифіковано, що свідчить про існування алеля G тільки в гетерозиготному стані (рис. 3.20).



**Рис. 3.20** Частоти генотипів за мутацією 7400C>G (SNP5) у локусі *SLC11A1* в дослідних популяціях корів

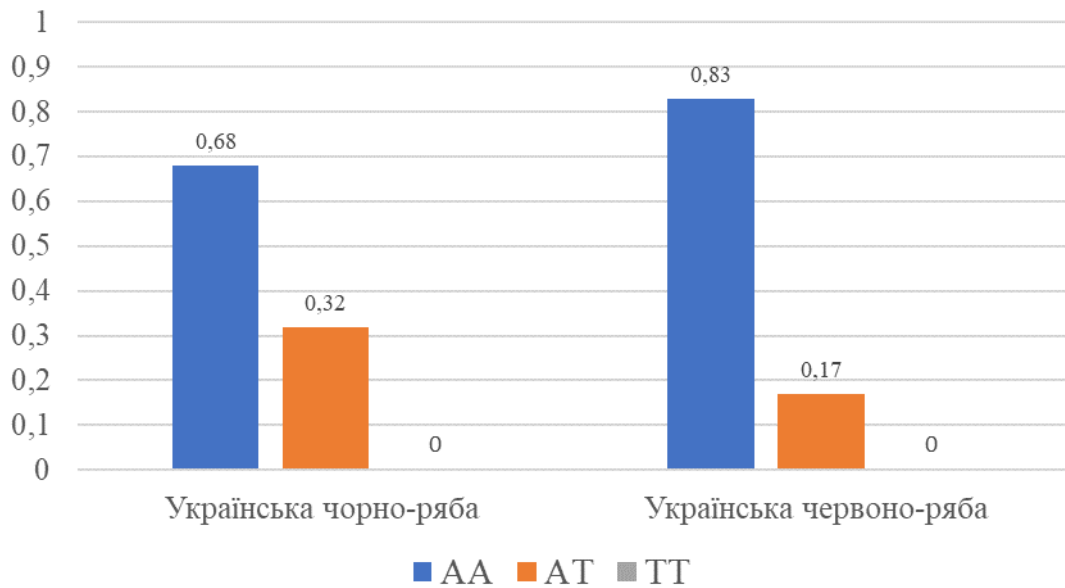
Загалом розподіл частот генотипів за обома маркерними мутаціями характеризується подібною картиною. Так, показано превалювання гомозиготного генотипу CC за мутацією 7400C>G (SNP5), і генотипу AA – у випадку мутації 7808A>T (SNP6). Що стосується чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід частка гомозигот становила 66 та 57% відповідно (SNP5), в той час як за SNP6 популяція червоно-рябої молочної породи майже цілком складається з особин з генотипом AA (83%) (рис. 3.21).

Частоти алелів за мутаціями 7400C>G і 7808A>T гена *SLC11A1* у дослідних популяціях корів наведено на рисунку 3.22 та 3.23 відповідно.

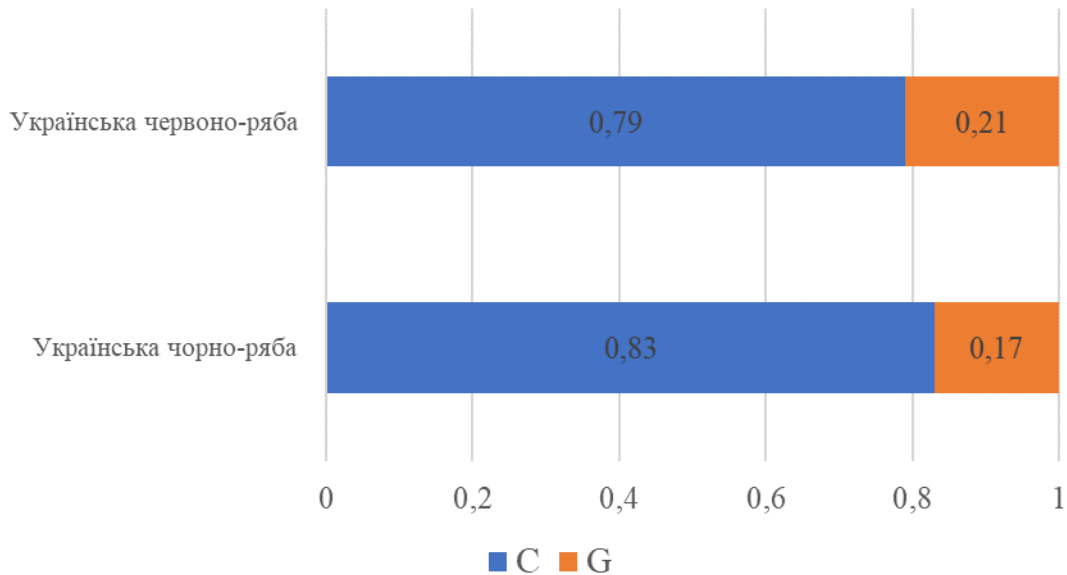
За розподілом частот алелів за мутаціями 7400C>G і 7808A>T гена *SLC11A1* в дослідних популяціях корів спостерігаються практично однакові результати. Загалом у всіх породах виявлено домінування частот алеля C (SNP5) і алеля A (SNP6). Причому їх частоти досить високі та знаходяться майже на одному рівні, а у випадку української червоно-рябої породи за мутацією 7808A>T цей показник наближається до повної фіксації (0,92). Стосовно мутації 7400C>G найвищий показник, навпаки, має українська



чорно-ряба порода (0,83).



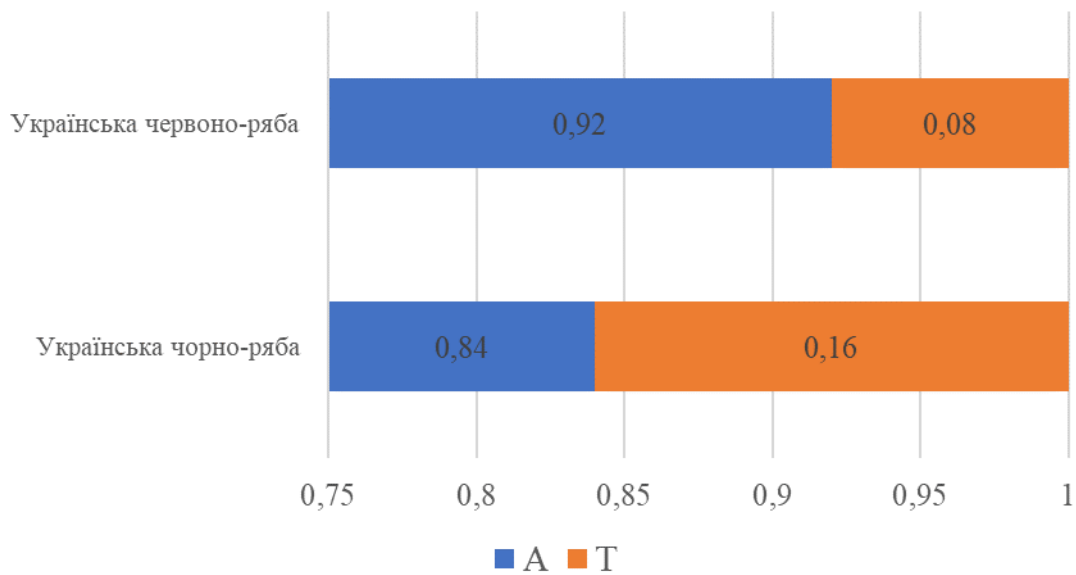
**Рис. 3.21.** Частоти генотипів за мутацією 7808A>T (SNP6) у локусі *SLC11A1* в дослідних популяціях корів



**Рис. 3.22** Частоти алелів за мутацією 7400C>G (SNP5) у локусі *SLC11A1* в дослідних популяціях

Таким чином, для всіх популяцій відносно обох маркерних мутацій спостерігається виражена перевага за частотою одного з двох алелів у

популяції.



**Рис. 3.23 Частоти алелів за мутацією 7808A>Т (SNP6) у локусі *SLC11A1* в дослідних популяціях**

Для розрахунку фактичних значень генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом отримані комплексні генотипи за геном *SLC11A1* окремо для SNP5 та SNP6.

Генетична структура дослідних популяцій корів за SNP5 (7400C>G) представлена в таблиці 3.6.

*Таблиця 3.6*

**Генетична структура дослідних популяцій за геном *SLC11A1* SNP5 (7400C>G)**

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$
<b>CC</b>	66	68,89	0,12	4,19	57	62,41	0,47	7,79
<b>CG</b>	34	28,22	1,18		43	33,18	2,91	
<b>GG</b>	0	2,89	2,89		0	4,41	4,41	

Генетична структура дослідних популяцій корів за SNP6 (7808A>Т)

представлена в таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

**Генетична структура дослідних популяцій за геном *SLC11A1* SNP6 (7808A>T)**

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$
АА	68	70,56	0,09	3,63	83	84,64	0,03	1,02
АТ	32	26,88	0,98		17	14,72	0,35	
ТТ	0	2,56	2,56		0	0,64	0,64	

У цілому відхилення від генетичної рівноваги виявлено лише у випадку мутації 7400C>G (SNP5) для української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід. Фактичні значення критерію  $\chi^2$  в цих популяціях (4,19 та 7,79) суттєво переважають критичні значення. Що стосується другої мутації 7808A>T (SNP6), то досліджувані популяції перебувають у стані генетичної рівноваги, що опосередковано свідчить про відсутність у цих групах виражених активних формоутворюючих процесів.

Інформацію щодо основних генетико-популяційних показників за обраними маркерними мутаціями в гені *SLC11A1* для дослідних популяцій ВРХ наведено у таблиці 3.8.

Проведені дослідження показали, що дослідні популяції великої рогатої худоби суттєво відрізняються за параметрами генетичної мінливості. Як слідує з даних, що наведені в таблиці, рівні фактичної гетерозиготності нижчі за середні значення та лише в окремих випадках практично дорівнюють очікуванім. Найбільша відмінність характерна для української червоно-рябої молочної породи, де значення  $H_o$  виявилось на 10% більшим за очікувану гетерозиготність. В цілому, в усіх досліджуваних популяціях для обох

маркерних мутацій встановлений надлишок гетерозиготних особин у досить широкому діапазоні (від 13 до 39 %), що призвело до відхилень від генетичного рівноважного стану, про що свідчать значення індексів фіксації Райта (від'ємні показники), що вказують на наявний аутбридинг.

Таблиця 3.8

**Основні генетико-популяційні параметри дослідних популяцій великої рогатої худоби за маркерними мутаціями в локусі *SLC11A1***

Порода	SNP5 (7400C>G)				SNP6 (7808A>T)			
	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$	$n_e$	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$	$n_e$
Українська чорно-ряба молочна	0,34	0,28	-0,21	1,39	0,32	0,27	-0,19	1,37
Українська червоно-ряба молочна	0,43	0,33	-0,30	1,49	0,17	0,15	-0,13	1,18

Що стосується показника ефективного числа алелів для досліджених маркерних мутацій, в популяції української червоно-рябої молочної породи у випадку SNP5 його значення найвище, при цьому поліморфність дещо наближається до середнього рівня, що свідчить про знижений загальний рівень поліморфізму. Для іншої породи значення  $n_e$  незначне для двохалельної системи, що може бути викликано зчепленням, пов'язаним зі «зв'язуванням» двох SNP в одному локусі.

### 3.5 *SacI*-поліморфізм промоторної ділянки гена *TNF $\alpha$*

Поліморфізм гена фактора некрозу пухлин альфа (*TNF $\alpha$* ) визначено за маркерною мутацією -824A>G у промоторному фрагменті в дослідних популяціях української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід корів.

Алельні варіанти гена *TNF $\alpha$*  виникають внаслідок точкової мутації

(SNP) у промоторному фрагменті в сайті рестрикції для SacI, з утворенням двох алелів – А (SacI+) і G (SacI-). Генотипи тварин за маркерною мутацією представлені специфічними патернами рестрикції (рис. 3.24).

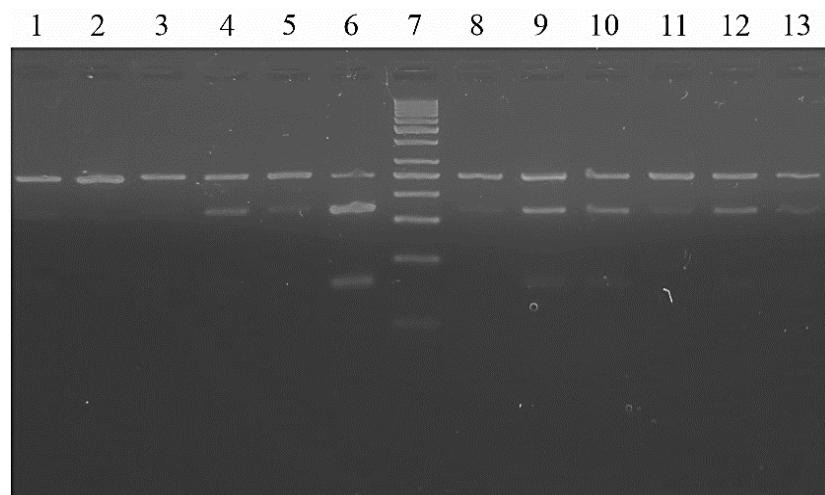


**Рис. 3.24** Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу *TNF- $\alpha$*  (SacI-поліморфізм). Розмір фрагментів наведено в п.н.

За результатами проведених досліджень визначено різні алельні варіанти гена *TNF $\alpha$*  в обох дослідних популяціях корів.

Генотипи особин визначали за типовими патернами рестрикції. Електрофоретичні профілі, отримані у результаті ампліфікації-рестрикції дослідних зразків, точно співпадають з теоретичними патернами рестрикції.

На рисунку 3.25 представлено електрофореграму продуктів рестрикції промоторного фрагмента гена *TNF $\alpha$* .



**Рис. 3.25** Електрофореграма продуктів рестрикції промоторного фрагменту гена *TNF $\alpha$*  (-824A>G). 7 – маркер молекулярних мас GeneRuler 50 bp; 1–3, 5, 8, 11 – генотип GG; 4, 6, 9, 10, 12 – AG.

Зокрема, генотип AA представлений двома фрагментами довжиною 168 п.н. та 81 п.н., генотип GG – фрагментом 249 п.н., гетерозиготи AG – комбінацією фрагментів 249, 168 і 81 п.н.

За результатами генотипування за геном фактора некрозу пухлини альфа в обох дослідних популяціях корів виявлено особин зі всіма можливими генотипами (AA, AG, GG), що свідчить про поліморфність даного локусу.

Частоти генотипів у досліджених порід характеризуються істотними відмінностями. Так, частоти гомозиготних генотипів української чорно-рябої породи виявились на досить низькому рівні та з однаковими значенням (0,8), в той час як в української червоно-рябої частота генотипу GG була в 3,5 рази вищою порівняно з генотипом AA. При цьому з найвищою частотою в обох породах зустрічається гетерозиготний генотип AG.

Аналіз відповідності розподілу особин за різними генотипами *TNF $\alpha$*  у дослідних популяціях корів стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом наведено в таблиці 3.9.

Таблиця 3.9

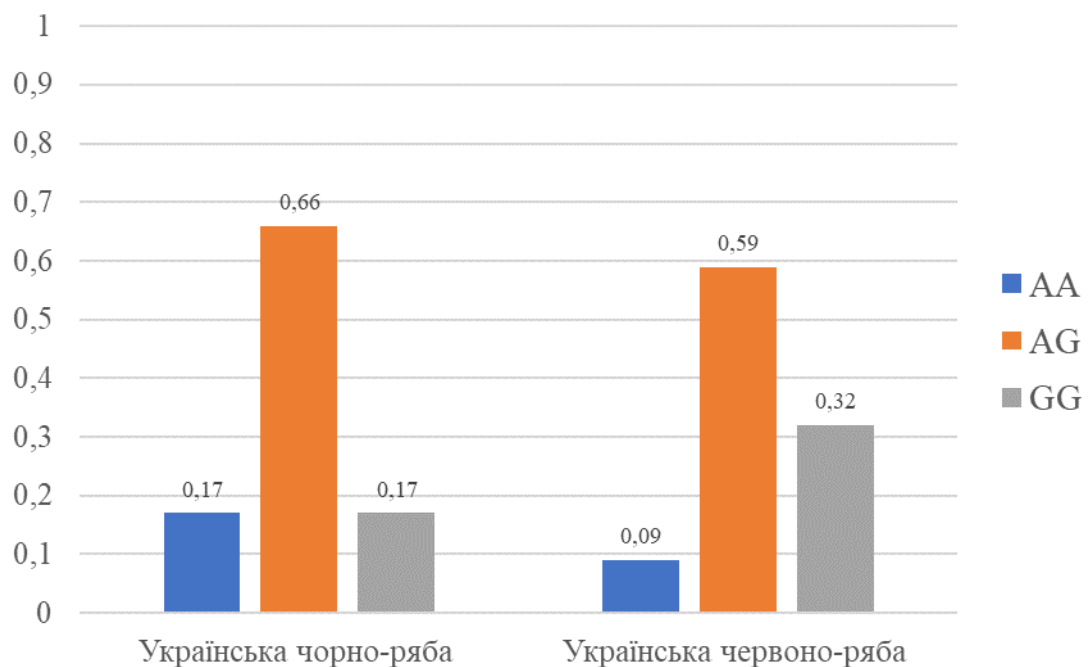
**Відповідність розподілу частот генотипів за локусом *TNF $\alpha$*  (-824A>G) стану генетичної рівноваги у дослідних популяціях корів**

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$
<b>AA</b>	8	12	1,33	5,32	5	8,21	1,26	3,28
<b>AG</b>	32	24	2,56		32	25,70	1,54	
<b>GG</b>	8	12	1,33		17	20,09	0,48	

Відповідно до результатів щодо критерію  $\chi^2$  встановлено, що за мутацією -824A>G у гені фактора некрозу пухлини альфа в популяції української чорно-рябої молочної породи має місце відхилення фактичного

співвідношення частот генотипів від очікуваного ( $\chi^2 = 5,32$ ), тобто від стану рівноваги, що вказує на наявність відбору або дрейфу генів. В той же час, українська червоно-ряба порода перебуває у стані генетичної рівноваги ( $\chi^2 = 3,28$ ).

За результатами генотипування дослідних порід корів проведено порівняльний аналіз фактичного розподілу генотипів у досліджуваних груп тварин. Розподіл частот генотипів у дослідних популяціях представлено на рисунку 3.26.

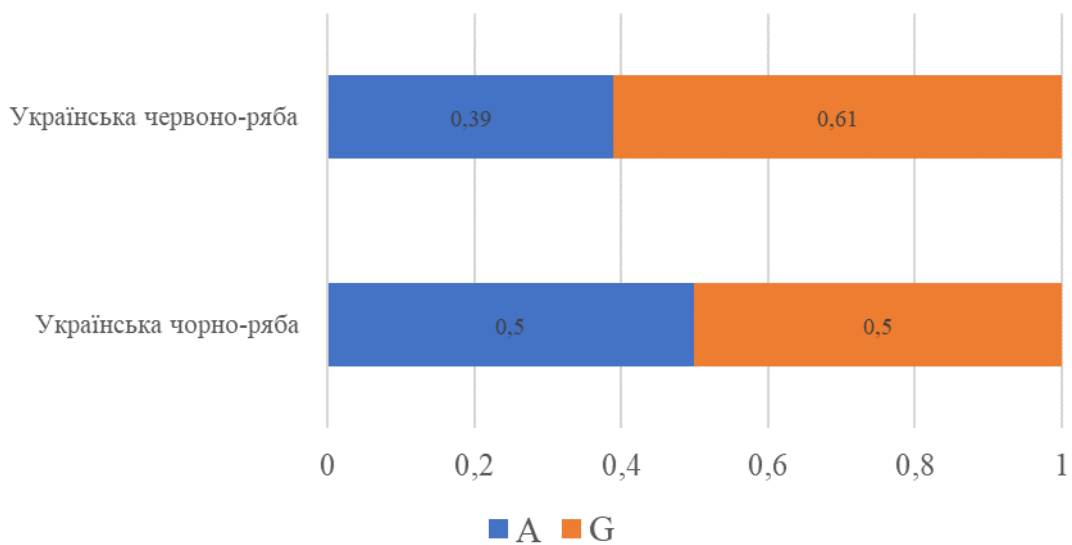


**Рис. 3.26 Частоти генотипів за мутацією -824A>G локусу *TNFα* в дослідних популяціях корів**

Порівняльний аналіз частот алелів гена *TNFα* за мутацією -824A>G у дослідних популяціях корів наведено на рисунку 3.27.

За розподілом частот алелів за мутацією -824A>G гена фактора некрозу пухлин альфа в дослідних популяціях також спостерігаються виражені відмінності. Зокрема, якщо в популяції корів породи українська червоно-ряба молочна переважає алель G (частота якого складає 0,61), то в популяції корів породи українська чорно-ряба – таке переважання відсутнє і частоти алелів

характеризуються фактично паритетними значеннями (0,5/0,5). Крім того, виявлено мутантний алель А гена *TNF- $\alpha$*  у гомозиготному та гетерозиготному станах у 83 % особин чорно-рябої та у 68 % червоно-рябої молочних порід. Особини із гомозиготними генотипами за алелем А становили 17 %, а в популяції української червоно-рябої породи їх кількість виявилась практично вдвічі меншою. Відмінності між популяціями за частотами алелів достовірні (на рівні  $p < 0,01$ ).



**Рис. 3.27 Частоти алелів за мутацією -824A>G локусу *TNF $\alpha$*  в дослідних популяціях**

У таблиці 3.10 наведено загальні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за дослідним локусом.

Згідно з отриманими результатами з'ясовано, що в дослідних породах корів рівні фактичної гетерозиготності суттєво перевищують значення очікуваної. В даному випадку від'ємне значення коефіцієнта  $F_{is}$  свідчить про виражений ексцес гетерозигот в популяціях як української чорно-рябої молочної породи, так і української червоно-рябої, що може вказувати на аутбридинг. У випадку української червоно-рябої породи коефіцієнт  $F_{is}$  має менше значення, що корелює зі станом генетичної рівноваги за Харді-



Вайнбергом, в якому знаходиться дослідна популяція корів.

Таблиця 3.10

**Основні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за локусом *TNF $\alpha$***

Порода корів	С <sub>a</sub>	n <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>is</sub>
Українська чорно-ряба молочна	0,5	2	0,66	0,5	-0,32
Українська червоно-ряба молочна	0,52	1,92	0,59	0,48	-0,23

Таким чином, досліджені нами групи тварин характеризується високим рівнем генетичного поліморфізму та високим рівнем гетерозиготності. У двох проаналізованих порід гетерозиготність, що спостерігалася, більш ніж на 10 % перевищувала очікувану.

Що стосується показника ефективного числа алелів (n<sub>e</sub>), найвищий рівень поліморфності, що відповідає максимальному значенню показника для двохалельної системи за дослідним локусом, характерний для популяції української чорно-рябої породи, тоді як в української червоно-рябої породи цей параметр теж знаходиться на досить високому рівні (1,92). Тому в аспекті зручності та доречності включення маркерних мутацій у процес маркер-асоційованої селекції, мутацію -824A>G можна розглядати як перспективну для обох популяцій, що дозволяє проводити подальшу роботу з визначення генотипів та здійснювати спрямований відбір тварин.

### **3.6 StyI-поліморфізм у другому екзоні гена *MBL1***

Поліморфізм гена манозозв'язувального лектину (*MBL1*) у дослідних груп тварин досліджували за мутацією 2651G>A у другому екзоні, яка представляє собою StyI-поліморфізм.

Алельні варіанти гена *MBL1* виникають внаслідок точкової мутації (SNP) у другому екзоні в сайті рестрикції для *StyI*, з утворенням двох алелів – А (*StyI*+) і G (*StyI*-). Генотипи тварин за маркерною мутацією представлені специфічними патернами рестрикції (рис. 3.28).



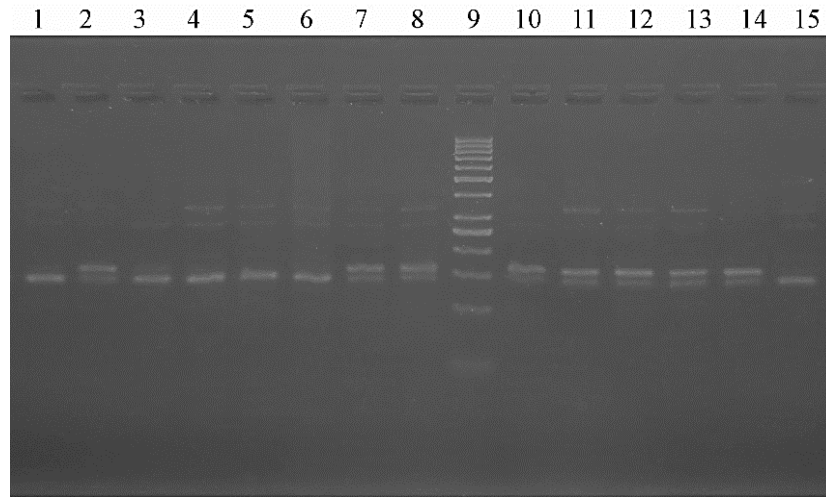
**Рис. 3.28** Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу *MBL1* (*StyI*-поліморфізм). Розмір фрагментів наведено в п.н.

Встановлені патерни рестрикції повністю співпадають з очікуваними генотипами особин за даною мутацією. Згідно з даними GenBank (MN473461.1), в діапазоні амплікону для рестриктази *StyI* є один поліморфний сайт рестрикції, що й визначає наявність алелів А (один сайт рестрикції) та G (сайт рестрикції відсутній). Так, за мутацією 2651G>А генотипу AA відповідають фрагменти розміром 141 і 21 п.н., генотипу GG – фрагмент 162 п.н., гетерозиготам AG – 162, 141 і 21 п.н. Таким чином, алель G характеризується наявністю фрагменту 162 п.н., алель А – фрагментами 141 і 21 п.н.

На рисунку 3.29 наведено електрофореграму продуктів рестрикції промоторного фрагмента гена *MBL1* (2651G>А).

За результатами досліджень встановлений поліморфізм за локусом *MBL1* в обох дослідних популяціях тварин. За мутацією 2651G>А виявлено всі можливі варіанти генотипів (AA, AG та GG) в кожній з дослідних популяцій корів.

Аналіз відповідності розподілу особин з різними генотипами *MBL1* у дослідних популяціях корів стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом наведено в таблиці 3.11.



**Рис. 3.29** Електрофореграма продуктів рестрикції дослідного фрагменту гена *MBL1* (2651G>A). 9 – маркер молекулярних мас GeneRuler 50 bp; 1, 3–6, 15 – генотип AA; 2, 7, 8, 10–14 – генотипи AC.

Таблиця 3.11

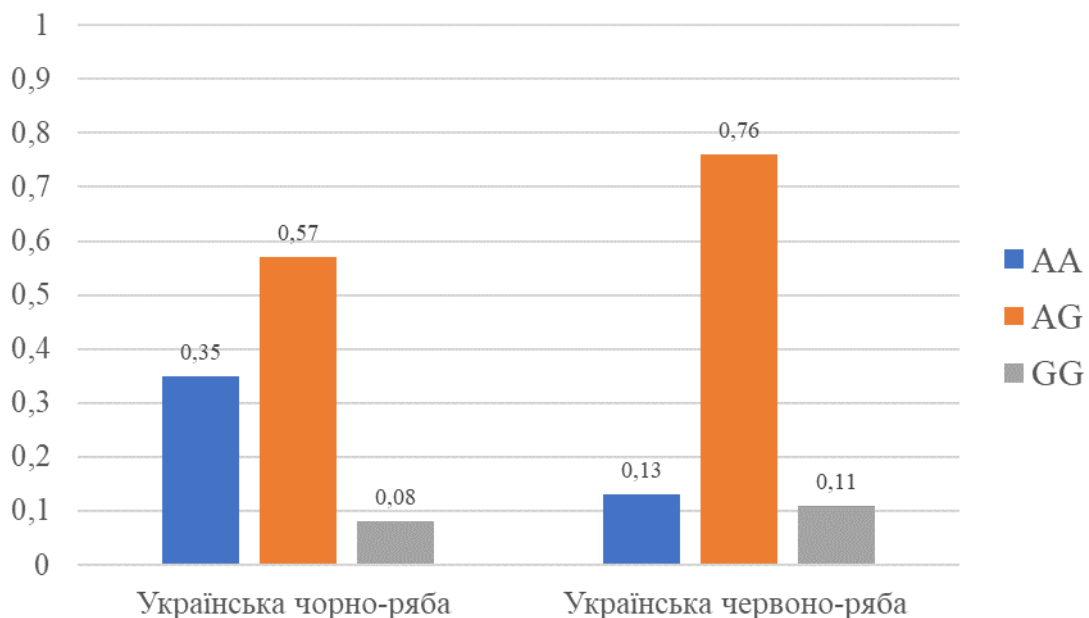
**Відповідність розподілу частот генотипів за локусом *MBL1* (2651G>A) стану генетичної рівноваги у дослідних популяціях корів**

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$
<b>AA</b>	17	19,45	0,31	2,57	7	14,05	3,54	14,55
<b>AG</b>	28	22,84	1,17		41	26,99	7,27	
<b>GG</b>	4	6,71	1,09		6	12,96	3,74	

Згідно з отриманими результатами в популяції української червоно-рябої породи, порівняно з чорно-рябою, спостерігається значне збільшення кількості гетерозигот та зменшення кількості гомозигот, що призвело до суттєвого порушення стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом ( $\chi^2 = 14,55$ ), тоді як для чорно-рябої відхилень від рівноважного стану не визначено ( $\chi^2 = 2,57$ ). Відмінності між породами за частотою однойменних алелів достовірні за високого рівня значущості ( $p < 0,05$ ). Дана ситуація,

можливо, зумовлена відсутністю панміксії в дослідних популяціях корів, яка є основою підтримання HWE (тобто наявністю дії відбору або дрейфу генів). Незважаючи на відсутність спрямованої селекції за досліджуваним локусом, використовувані в господарствах схеми селекційно-плеємінної роботи з обмеженою кількістю плідників, сумісно з феноменом дрейфу генів, істотно впливають на розподіл частот алелів і генотипів у невеликих за кількістю популяціях.

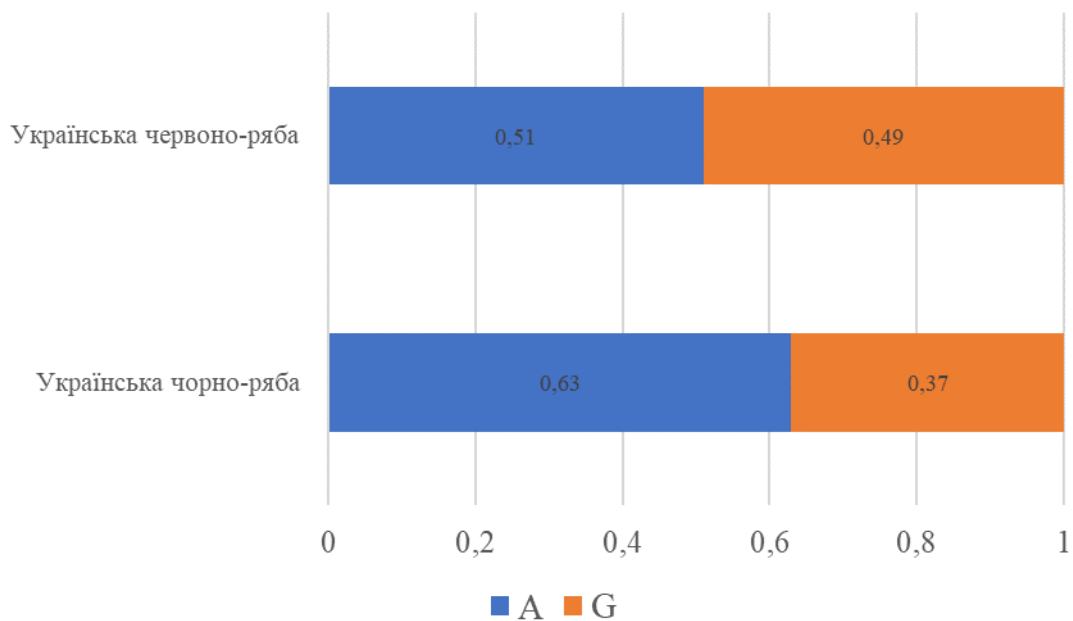
Як видно з наведеної нижче діаграми, кількість гетерозиготних особин у популяції корів червоно-рябої породи сягає близько 75%, тоді як у чорно-рябої породи – дещо вище половини вибірки (рис. 3.30). Таким чином, в обох популяціях переважає гетерозиготний генотип AG (0,57 та 0,76), генотип AA зустрічається з частотою 0,35 і 0,13 в чорно-рябої та червоно-рябої породи відповідно, а генотип GG є досить рідкісним і визначений тільки в чотирьох (чорно-ряба) та шести особин (червоно-ряба).



**Рис. 3.30** Частоти генотипів за мутацією 2651G>A у локусі *MBL1* в дослідних популяціях корів

Частоти алелів за мутацією 2651G>A гена *MBL1* у дослідних

популяціях великої рогатої худоби наведено на рисунку 3.31. Завдяки проведеному аналізу поліморфізму гена манозозв'язувального лектину виявлено, що в популяції української чорно-рябої породи спостерігається виражена перевага за частотою алеля А (0,63), в той час як в українській червоно-рябої такого переважання немає і частоти алелів дуже близькі до паритетних (0,51/0,49).



**Рис. 3.31** Частоти алелів за мутацією 2651G>А у локусі *MBL1* в дослідних популяціях

У таблиці 3.12 представлено загальні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за дослідним локусом.

Як наведено в таблиці, різниця у значеннях параметрів фактичної та очікуваної гетерозиготності спричинила деякі відмінності у значеннях коефіцієнта інбридингу – індексу фіксації Райта  $F_{is}$  (-0,24 та -0,55) в обох популяціях. Значення  $F_{is}$  є зручним показником оцінки відхилення від HWE, а величина  $\chi^2$  між розподілом фактичних і теоретичних частот генотипів – критерієм достовірності цього відхилення.

В популяції української чорно-рябої породи значення фактичної ( $H_o$ ) та

очікуваної ( $H_e$ ) гетерозиготності склали 0,57 та 0,46; в червоно-рябої – 0,76 та 0,49 відповідно. Значення індексу фіксації Райта у першому випадку -0,24, що свідчить про виражений ексцес гетерозиготних особин, якого, при цьому, недостатньо для виходу популяції з рівноважного стану. У другій популяції  $F_{is} = -0,55$ ; що вказує на відсутність інбридингу та на виражений аутбридинг, що й призвело до відхилення від рівноважного стану.

Таблиця 3.12

**Основні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за локусом *MBL1* (2651G>A)**

Порода корів	$S_a$	$n_e$	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$
Українська чорно-ряба молочна	0,54	1,85	0,57	0,46	-0,24
Українська червоно-ряба молочна	0,51	1,96	0,76	0,49	-0,55

Для маркерної мутації 2651G>A показник ефективного числа алелів в двох дослідних популяціях корів є досить високим, а у випадку червоно-рябої породи він досягає практично максимального значення для двоалельної системи.

Отже, з урахуванням особливостей розподілу частот алелів та генотипів в обох дослідних популяціях, мутацію локусу *MBL1* 2651G>A можна розглядати як перспективну для використання у селекційній роботі, що дозволяє проводити подальші дослідження з аналізу асоціації різних генотипів з показниками продуктивності тварин та проводити спрямований відбір особин.

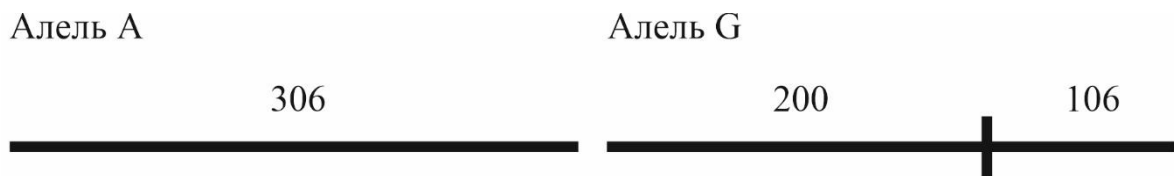
### 3.7 BsiHKA1-поліморфізм у сьомому екзоні гена *IFNGR2*

Поліморфізм гена інтерферону гамма-рецептора 2 (*IFNGR2*) визначено

за маркерною мутацією 1008A>G у сьомому екзоні гена в дослідних популяцій великої рогатої худоби.

Алельні варіанти гена *IFNGR2* виникають внаслідок точкової мутації (SNP) у сьомому екзоні в сайті рестрикції для BsiHKA1, з утворенням двох алелів – А (BsiHKA1-) і G (BsiHKA1+). Генотипи тварин за маркерною мутацією представлені специфічними патернами рестрикції (рис. 3.32).

За результатами досліджень встановлений поліморфний характер локусу *IFNGR2* в обох дослідних популяціях корів. Виявлені особини з різними генотипами.

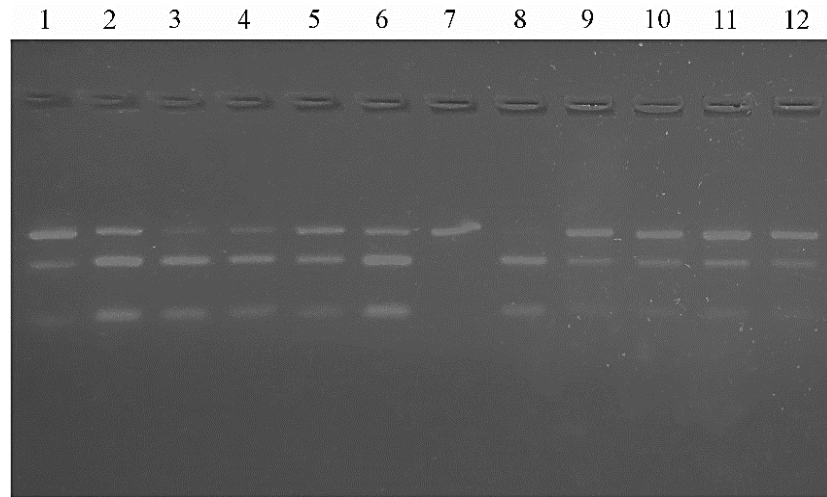


**Рис. 3.32 Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу *IFNGR2* (BsiHKA1-поліморфізм). Розмір фрагментів наведено в п.н.**

Генотипи особин визначали за типовими патернами рестрикції. Електрофоретичні профілі, отримані у результаті ампліфікації та процесу рестрикції відібраних зразків, на 100% співпадають з теоретичними патернами рестрикції. А саме, генотип AA на електрофореграмах представлений одним фрагментом довжиною 306 п.н., генотип GG – фрагментами 200 п.н. та 106 п.н., гетерозиготи AG – фрагментами розміром 306, 200 і 106 п.н. Алелю А відповідає фрагмент розміром 306 п.н., алелю G – два фрагменти розмірами 200 і 106 п.н.

Електрофореграма продуктів рестрикції наведена на рис. 3.33.

Отримані результати генотипування свідчать, що дослідний локус є поліморфним в обох популяціях корів. В популяції чорно-рябої молочної породи наявні особини зі всіма можливими генотипами (AA, AG, GG), тоді як у червоно-рябої породи – лише два з трьох (AA і AG).



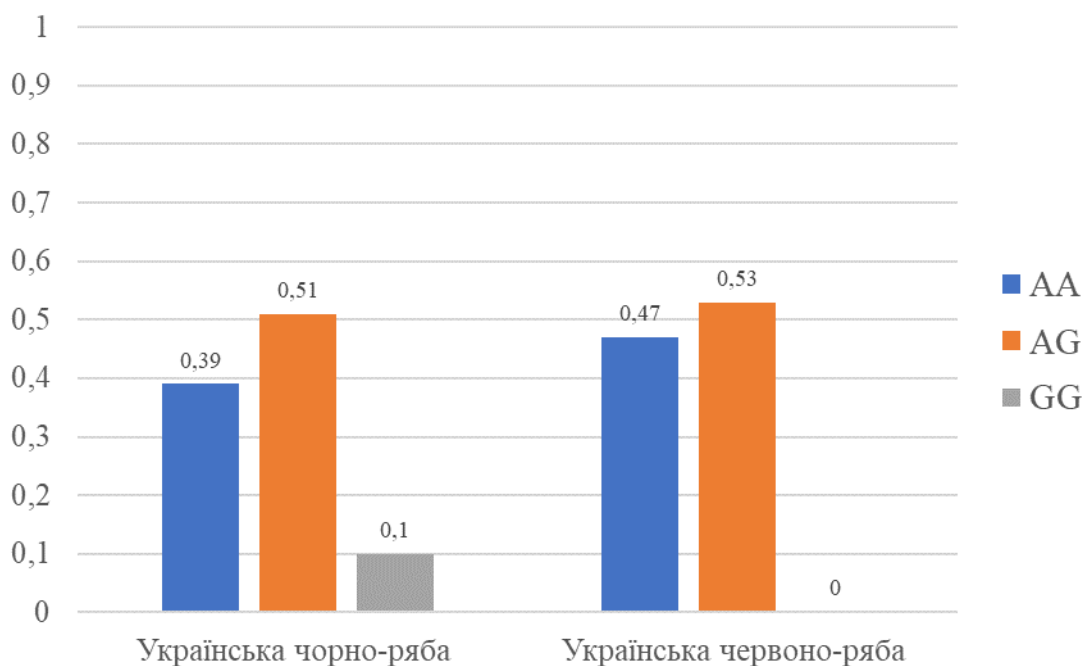
**Рис. 3.33** Електрофореграма продуктів рестрикції сьомого екзону гена *IFNGR2*. 1, 2, 5, 6, 9–12 – генотип AG; 3, 4, 8 – генотип GG; 7 – генотип AA.

Тварин з гомозиготним генотипом GG в межах дослідної вибірки цієї породи не виявлено, тобто алель G у даному випадку спостерігається в популяції лише у гетерозиготному стані. В популяції корів чорно-рябої породи особини з гомозиготним генотипом GG склали 10,2 %. Частка гетерозигот AG становила 0,51 (чорно-ряба молочна порода) і 0,53 (червоно-ряба молочна порода) відповідно. Розподіл частот генотипів у дослідних популяціях представлено на рисунку 3.34.

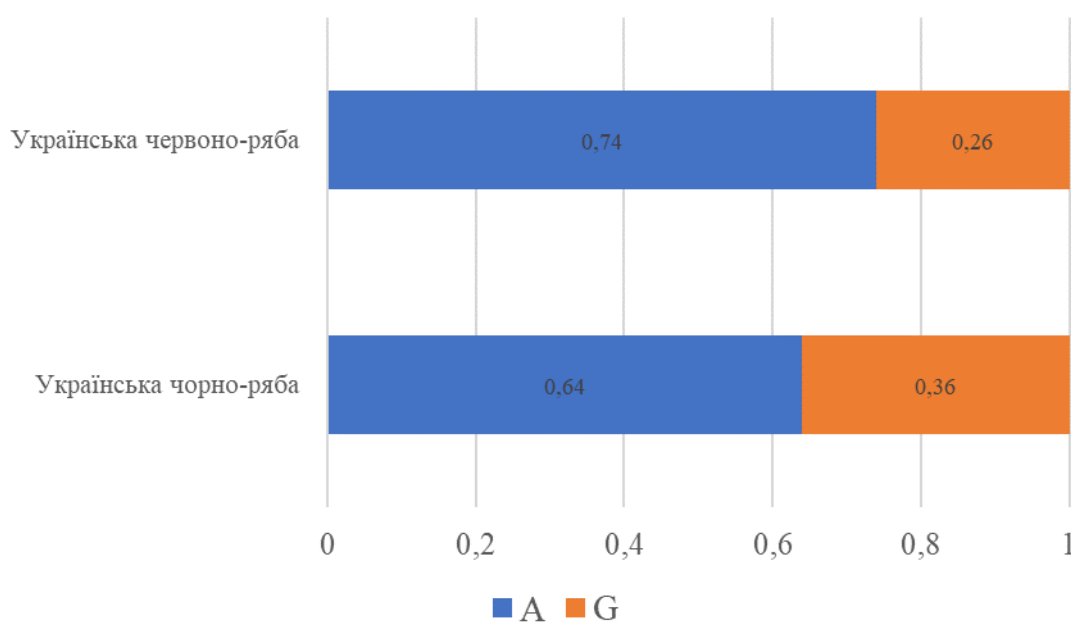
Мутантний алель G, для якого є характерним наявність сайту рестрикції для ендонуклеази *Vsi*HKAI, виявлено з частотою 0,36 в чорно-рябої молочної породи і 0,26 – в червоно-рябої молочної породи. Тобто у двох дослідних популяціях за значенням частоти зустрічальності переважає саме алель A.

Порівняльний аналіз частот алелів гена *IFNGR2* за мутацією 1008A>G в обох популяціях корів представлено на рисунку 3.35.





**Рис. 3.34** Порівняльний аналіз частот генотипів за мутацією 1008A>G локусу *IFNGR2* в дослідних популяціях корів



**Рис. 3.35** Порівняльний аналіз частот алелів за мутацією 1008A>G локусу *IFNGR2* в дослідних популяціях корів

Розрахунки фактичних значень критерію  $\chi^2$  за мутацією 1008A>G у сьомому екзоні локусу інтерферону гамма-рецептора 2 в межах дослідних

популяцій великої рогатої худоби наведено у таблиці 3.13.

Таблиця 3.13

**Відповідність розподілу частот генотипів за локусом *IFNGR2* (1008A>G) стану генетичної рівноваги у дослідних популяціях корів**

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$	О	Е	(О-Е) <sup>2</sup> /Е	$\chi^2$
<b>AA</b>	39	42,25	0,25	1,32	47	54,76	1,09	13,33
<b>AG</b>	51	45,5	0,66		53	38,48	5,48	
<b>GG</b>	10	12,25	0,41		0	6,76	6,76	

Отримані результати свідчать про високу мінливість значень частот зустрічальності різних генотипів у популяціях корів різних порід. Особин, гомозиготних за алелем G, виявлено тільки в популяції корів породи українська чорно-ряба (10 %). Зі свого боку, найбільшу кількість особин, гомозиготних за алелем A, зафіксовано в популяції корів породи українська червоно-ряба молочна (47 %).

Варто відмітити, що за мутацією 1008A>G в гені інтерферону тільки українська чорно-ряба порода знаходиться в стані генетичної рівноваги ( $\chi^2 = 1,32$ ), для української червоно-рябої, навпаки, характерно відхилення від рівноважного стану ( $\chi^2 = 13,33$ ), що, ймовірно, може бути пов'язано з тиском відбору або явищем дрейфу генів.

Інформацію стосовно основних популяційно-генетичних показників за маркерною мутацією 1008A>G в гені *IFNGR2* для дослідних популяцій ВРХ порід української чорно-рябої молочної та червоно-рябої молочної наведено у таблиці 3.14.

Як свідчать результати досліджень, в української чорно-рябої молочної породи спостерігається середній рівень гетерозиготності за досліджуваною

мутацією. Натомість від'ємне значення індексу фіксації Райта ( $F_{is} = -0,12$ ) вказує на незначний надлишок гетерозигот в цій популяції. Щодо показників гетерозиготності в української червоно-рябої – рівень фактичної гетерозиготності теж виявився доволі високим (на рівні 0,53), причому показник  $H_o$  на 27% перевищує очікувану гетерозиготність. В популяції корів цієї породи виявлено відхилення від рівноважного стану за Харді-Вайнбергом за рахунок саме ексцесу гетерозигот ( $F_{is} = -0,38$ ). Розраховані значення індексу фіксації Райта вказують на аутбредність обох популяцій, оскільки показник приймає від'ємне значення, проте менш виражене для чорно-рябої породи.

Таблиця 3.14

**Основні генетико-популяційні характеристики різних порід корів  
за локусом *IFNGR2* (1008A>G)**

Порода корів	$S_a$	$n_e$	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$
Українська чорно-ряба молочна	0,54	1,85	0,51	0,46	-0,12
Українська червоно-ряба молочна	0,62	1,62	0,53	0,38	-0,38

Також в таблиці вказаний показник ефективного числа алелів для обох популяцій корів. Так, в української червоно-рябої породи рівень поліморфності вище середнього, а у випадку української чорно-рябої – параметр  $n_e$  наближається до достатньо високого значення (1,85) для двохалельних систем. Розподіл генотипів та алелей в популяції чорно-рябої молочної породи дає можливість проводити подальші дослідження у напрямі пошуку зв'язку популяцій корів досліджуваних порід із різними генотипами із показниками продуктивності. У свою чергу, для корів червоно-рябої молочної породи ситуація діаметрально протилежна внаслідок повної відсутності особин із гомозиготним генотипом GG. Використання цієї породи для проведення асоціативних досліджень дещо обмежене наявністю

лише двох варіантів генотипів для дослідження.

### **3.8 Порівняльний аналіз генетичної структури української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід за локусами *TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2***

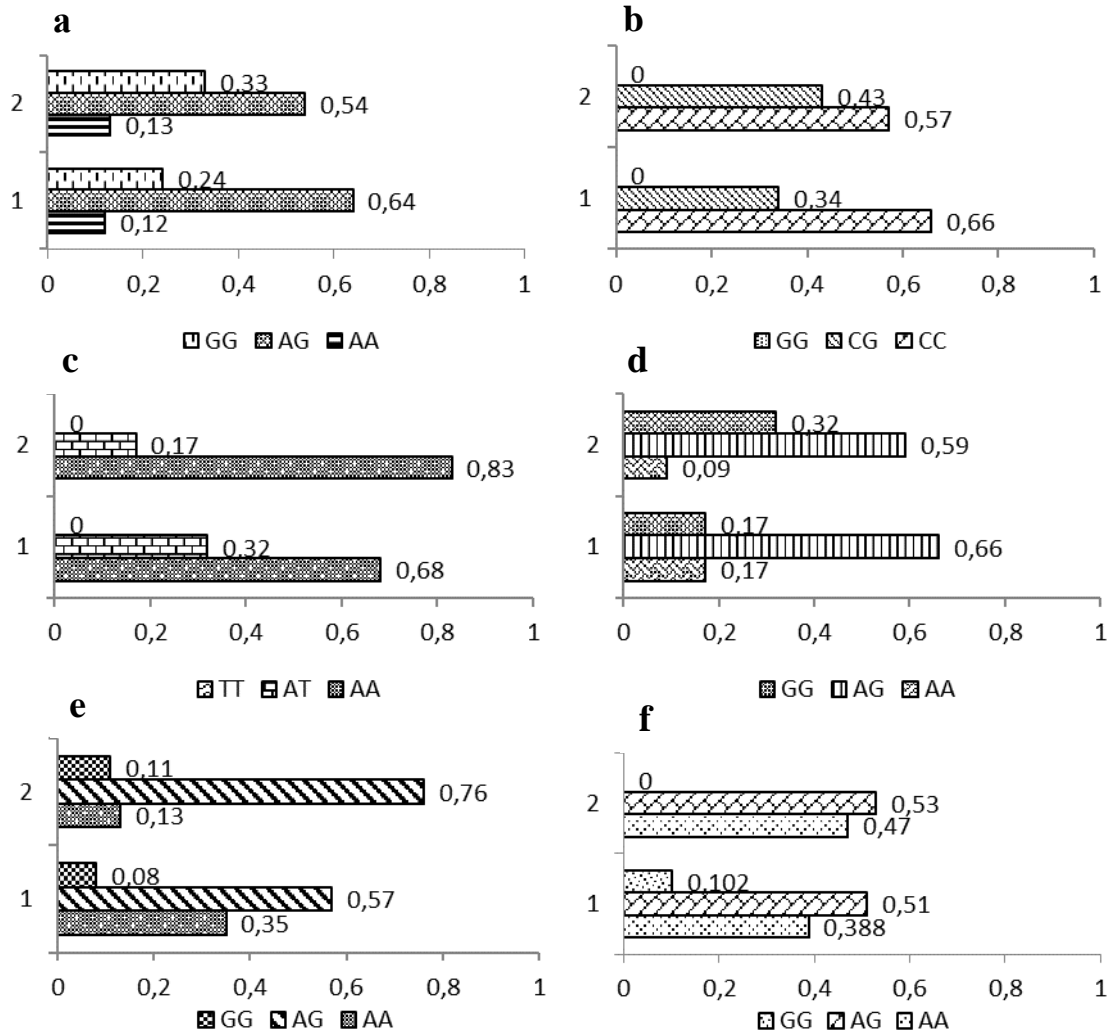
На основі отриманих даних щодо аналізу особливостей генетичної структури двох основних порід великої рогатої худоби, а саме української чорно-рябої молочної ( $n = 100$ ) та української червоно-рябої молочної ( $n = 100$ ) порід за поліморфізмом основних досліджуваних генів кількісних ознак із метою вивчення особливостей формування генофондів цих порід проведено порівняльний аналіз за маркерними мутаціями у генах толл-подібного рецептору 1 (1596G>A), *SLC11A1* (7400C>G; 7808A>T), *TNF $\alpha$*  (-824A>G), *MBL1* (2651G>A) та інтерферону гамма-рецептора 2 (1008A>G). За винятком гена *TLR4*, який виявився мономорфним в популяціях досліджуваних порід за трьома мутаціями (MspI-, RsaI- та BsiHKA1-поліморфізм), що унеможливорює порівняння його генетичної структури з іншими локусами.

Унаслідок аналізу динаміки розподілу генотипів та частот алелів залежно від факторів штучного добору та селекційних умов утримання дослідних вітчизняних порід великої рогатої худоби отримано наступні результати.

У результаті порівняння частот генотипів за шістьма обраними маркерними мутаціями в обраних популяціях корів виявлено, що профілі розподілу генотипів у всіх дослідних групах тварин за дослідними об'єктами дуже схожі, за винятком локусів *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2* (рис. 3.36).

Зокрема у розподілі генотипів в межах двох порід ВРХ за мутацією 1596G>A гена *TLR1* спостерігаються практично аналогічні результати. Так, в усіх порід переважає гетерозиготний генотип AG, проте в популяції української чорно-рябої його значення на 10% вище порівняно з іншою

породою. При цьому показники гомозигот AA в обох порід знаходяться майже на одному рівні. Варто зазначити, що різниця між частотами генотипу AG в дослідних популяціях статистично достовірна на рівні  $p < 0,05$ .



**Рис. 3.36** Порівняльна характеристика частот генотипів дослідних локусів обраних порід корів.

Примітки: 1 – українська чорно-ряба молочна, 2 – українська червоно-ряба молочна;

а) мутація 1596G>A, локус *TLR1*; б) мутація 7400C>G, локус *SLC11A1*; в) мутація 7808A>T, локус *SLC11A1*; д) мутація -824A>G, локус *TNFα*; е) мутація 2651G>A, локус *MBL1*; ф) мутація 1008A>G, локус *IFNGR2*

Найбільш схожим у трьох вибірках тварин виявився розподіл частот генотипів за мутацією 7400C>G у гені *SLC11A1*. В усіх груп встановлено відсутність гомозиготного генотипу GG. Натомість найчастіше зустрічаються гомозиготи CC, причому найвища їх частка характерна для української

чорно-рябої молочної, дещо нижча – в українській червоно-рябої (з різницею в 9 %). Частіше гетерозиготи CG спостерігаються в українській червоно-рябої породи, хоча різниця частот даного генотипу між породами не сильно виражена і не має статистичної достовірності.

Що стосується іншої мутації (7808A>T) у гені *SLC11A1*, то картина розподілу генотипів схожа до попередньої мутації. В українській чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід також спостерігається відсутність одного із гомозиготних генотипів (TT). Гомозиготний генотип AA з високими частотами зустрічається в обох дослідних порід, причому в червоно-рябої молочної його частка наближається до максимального значення (0,83).

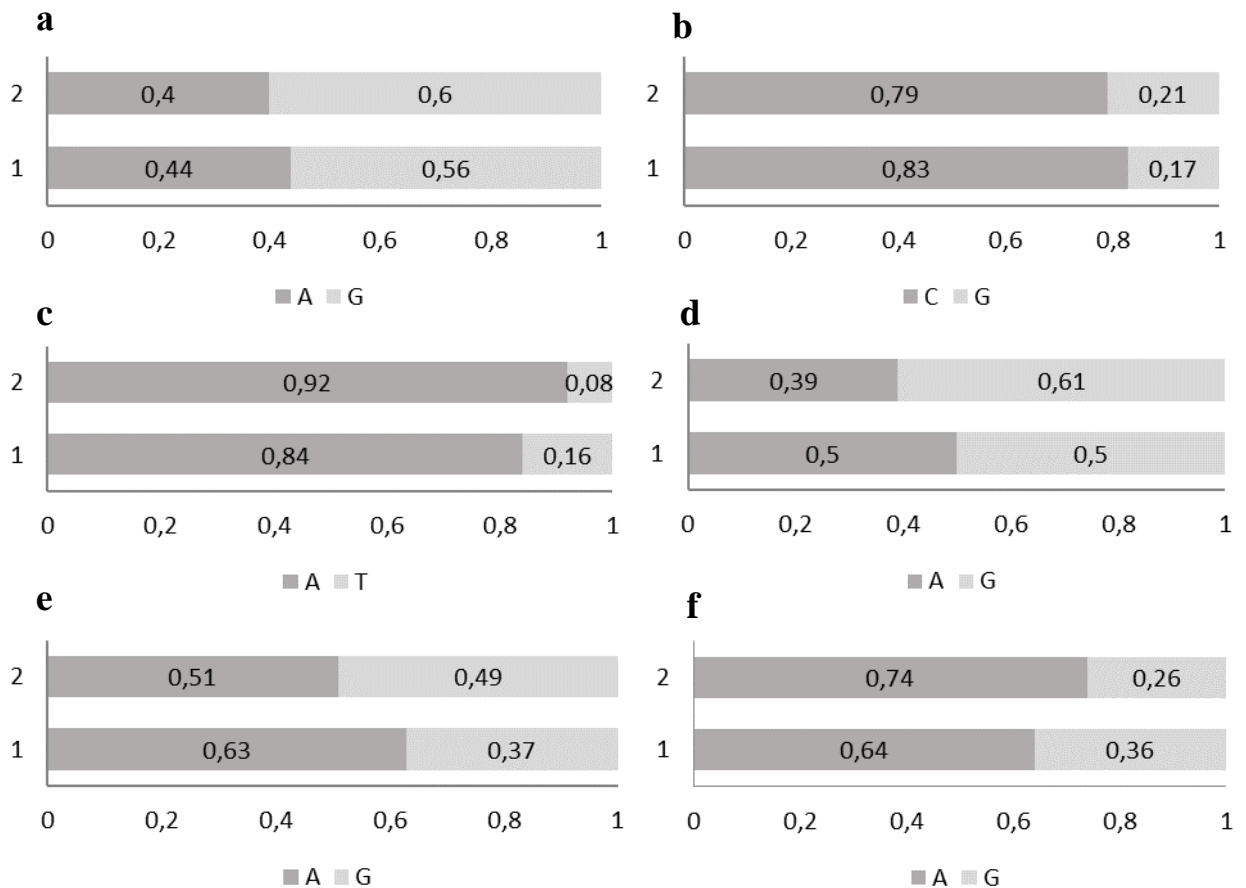
У випадку мутації -824A>G в гені фактору некрозу пухлин альфа, відмінності між дослідними популяціями полягають у тому, що в українській червоно-рябої породи за частотою гомозиготних генотипів переважає генотип GG, тоді як в українській чорно-рябої частоти генотипів GG і AA однакові. При цьому з найвищою частотою в обох породах зустрічається генотип AG.

За мутацією 2651G>A в локусі манозозв'язувального лектину, подібно до гена толл-подібного рецептору 1, спостерігається домінування гетерозиготного генотипу AG, однак, на відміну від нього в обох дослідних популяціях гомозиготи GG зустрічаються в мінімальній кількості, особливо в популяції чорно-рябої молочної породи (0,08). Частота гомозигот AA в червоно-рябої молочної породи практично втричі менша за частоту в чорно-рябої.

В гені *IFNGR2* за мутацією 1008A>G результати показали, що генотип GG наявний лише в популяції чорно-рябих корів, проте його частота на досить низькому рівні (0,102). В обох групах переважає гетерозиготний генотип AG, частота якого характеризується майже однаковими значеннями (0,51-0,53). Частота генотипу AA в червоно-рябої молочної породи на 8% перевищує частоту в чорно-рябої, що, в свою чергу, свідчить про мало виражену різницю частот цих генотипів між породами та відсутність

статистичної достовірності.

Порівняння частот алелів за досліджуваними мутаціями в генах *TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2* у дослідних порід української селекції представлено на рисунку 3.37.



**Рис. 3.37** Порівняльна характеристика дослідних порід корів за частотами алелів.

Примітки: 1 – українська чорно-ряба молочна, 2 – українська червоно-ряба молочна;

а) мутація 1596G>A, локус *TLR1*; б) мутація 7400C>G, локус *SLC11A1*; в) мутація 7808A>T, локус *SLC11A1*; г) мутація -824A>G, локус *TNF $\alpha$* ; е) мутація 2651G>A, локус *MBL1*; ф) мутація 1008A>G, локус *IFNGR2*

За отриманими результатами досліджень, за двома маркерними мутаціями гена *SLC11A1*, мутацією гена інтерферону для обох порід та для української чорно-рябої за геном *MBL1* і червоно-рябої за локусом *TNF $\alpha$*  встановлено виражене превалювання одного із алелів. В той же час, для двох

порід за локусом *TLR1* та для червоно-рябої породи за геном *MBL1* частоти обох алелів практично однакові. А у випадку фактора некрозу пухлини  $\alpha$  в популяції української чорно-рябої частоти алелів виявились паритетними (0,5/0,5). Розглянемо кожний із локусів більш детально.

Аналіз поліморфізму в гені толл-подібного рецептору виявив найбільший відсоток особин, які мають алель G (BcII). Частота цього алелю у дослідних популяціях практично ідентична (0,56 і 0,6 – чорно-ряба і червоно-ряба відповідно). Алель A зустрічався значно рідше, здебільшого в складі гетерозиготних генотипів. Враховуючи низьку частоту алеля A, варто підкреслити необхідність вжиття заходів щодо його збереження у дослідних популяціях, що може підвищити можливість втрати алеля за рахунок дрейфу генів.

Що стосується мутацій в локусі *SLC11A1* (SNP5, SNP6), всі породи виявились поліморфними (частота найбільш розповсюдженого алеля не перевищує 0,95). Розподіл частот алелів у трьох популяціях ВРХ за двома маркерними мутаціями виявився подібним – в усіх випадках різниця між частотами алелів у дослідних тварин статистично невірогідна. В усіх групах корів переважаючий алель за мутацією 7400C>G (SNP5) у гені *SLC11A1* – С, за мутацією 7808A>Т (SNP6) – алель А, відповідно. Значно нижча спостерігалася частота алелів G і Т за мутаціями SNP5 і SNP6, відповідно. Частота алельного варіанта Т (SNP6) виявилась гранично низькою у тварин української червоно-рябої молочної породи і становила 0,08.

На відміну від попередніх двох локусів, за розподілом частот алелів за мутацією -824A>G гена *TNF $\alpha$*  в дослідних популяціях відмічено виражені відмінності. Зокрема, в популяції корів породи українська червоно-ряба молочна переважає алель G (частота якого складає 0,61), натомість в популяції корів породи українська чорно-ряба такого превалювання не виявлено, через те, що частоти алелів виявились однаковими (0,5/0,5).

Розподіл частот алелів у породах чорно-рябої та червоно-рябої за мутацією 2651G>A в гені *MBL1* виявився подібним – в усіх випадках різниця



між частотами алелів у дослідних популяціях статистично недостовірна. В обох порід переважає алель А, при цьому необхідно зауважити, що в української червоно-рябої його значення майже на одному рівні з алелем G, тоді як в чорно-рябої спостерігається дещо вище його значення (0,63).

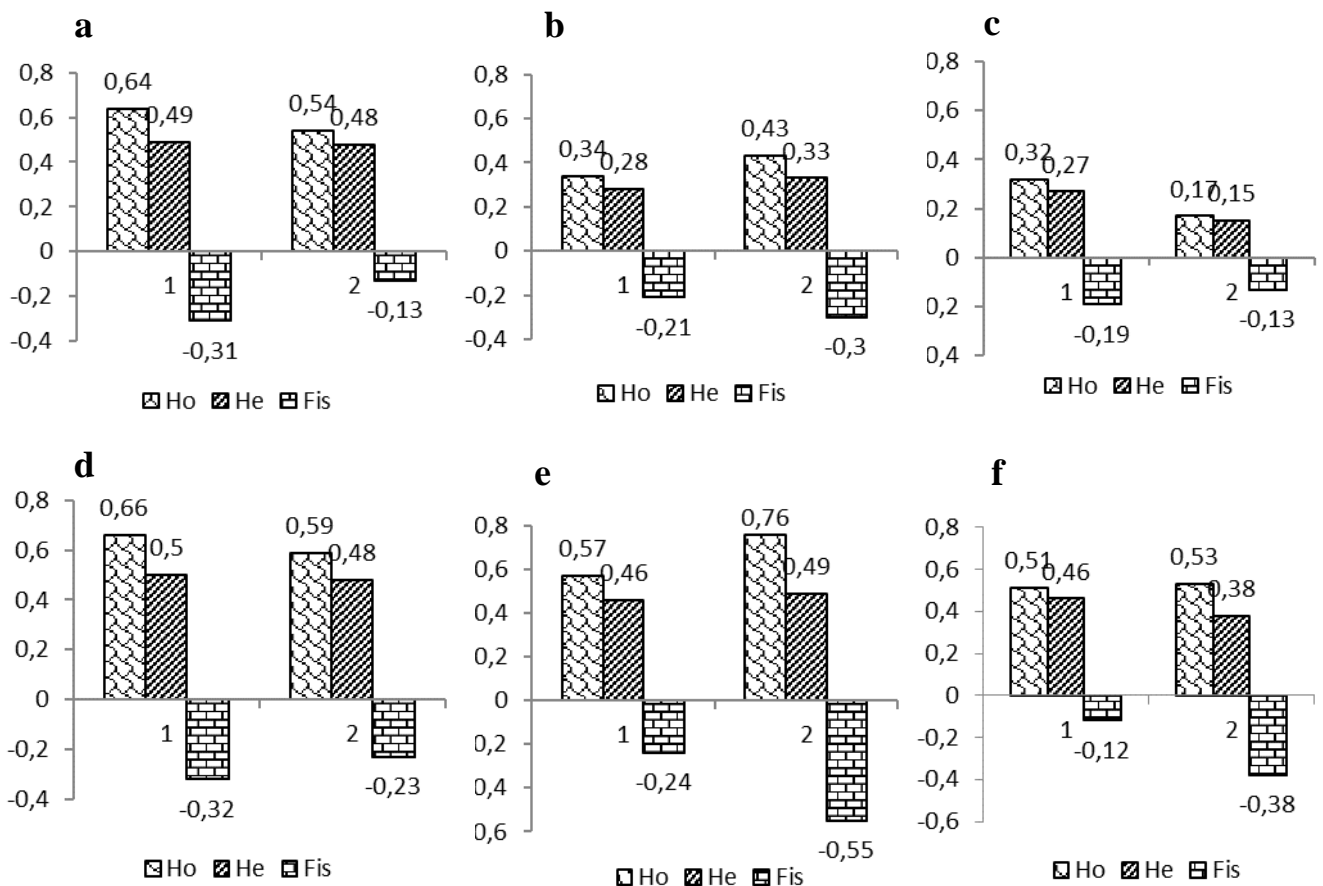
За геном *IFNGR2*, як і у випадку попереднього локусу, теж спостерігається подібність дослідних порід корів за генетичною структурою, для яких характерна низька частота алельного варіанта G. Причому його частка в обох досліджуваних порід практично однакова – в чорно-рябої молочної породи на 10 % значення вище, ніж в червоно-рябої.

З приводу показника Харді-Вайнберга слід зазначити, що майже для кожного із проаналізованих локусів в досліджуваних популяціях корів в більшості випадків характерне відхилення від стану генетичної рівноваги. Так, для породи чорно-рябої молочної за мутацією 1596G>A гена толл-подібного рецептору 1 фактично розрахована величина критерію  $\chi^2$  становить 8,93. За мутаціями 7400C>G і 7808A>T в локусі *SLC11A1* спостерігається наступна ситуація – для популяції української чорно-рябої у першому випадку властиве відхилення від генетичної рівноваги ( $\chi^2 = 4,13$ ), а в іншому – знаходиться в її межах ( $\chi^2 = 3,63$ ), хоча й сильно наближено до критичного значення. Для української червоно-рябої породи характерна аналогічна ситуація, оскільки за мутацією 7400C>G встановлено значне відхилення критерію  $\chi^2$  (7,78) від стану генетичної рівноваги, в той час як за 7808A>T, навпаки, спостерігається рівноважний стан (1,02).

Результати порівняння дослідних популяцій ВРХ за показниками гетерозиготності та індексу фіксації Райта представлено на рисунку 3.38.

За аналізом частот генотипів виникають чітко виражені аналогії, які досягають свого максимального значення у параметрах гетерозиготності ( $H_o$  і  $H_e$ ). Між дослідними популяціями для всіх проаналізованих локусів виявлена подібність як за показниками очікуваної, так і фактичної гетерозиготності. Для української чорно-рябої молочної породи параметри гетерозиготності досягають найвищих значень за мутацією -824A>G в локусі *TNF $\alpha$* , тоді як для

української червоно-рябої – за мутацією 2651G>A в локусі *MBL1*. В той же час найнижчі значення гетерозиготності для дослідних популяцій спостерігаються за мутацією 7808A>T гена *SLC11A1*. Слід зазначити, що в усіх досліджуваних випадках, показник фактичної гетерозиготності перевищував значення очікуваної. Виняток склали тільки величини  $N_0$  і  $N_e$  за мутацією 7808A>T в локусі *SLC11A*, які показали практично ідентичні значення (0,27; 0,28 відповідно).



**Рис. 3.38** Порівняльна характеристика дослідних порід корів за рівнями гетерозиготності ( $H_o$ ,  $H_e$ ) та індексом фіксації Райта ( $F_{is}$ ).

Примітки: 1 – українська чорно-ряба молочна, 2 – українська червоно-ряба молочна;

а) мутація 1596G>A, локус *TLR1*; б) мутація 7400C>G, локус *SLC11A1*; в) мутація 7808A>T, локус *SLC11A1*; д) мутація -824A>G, локус *TNF $\alpha$* ; е) мутація 2651G>A, локус *MBL1*; ф) мутація 1008A>G, локус *IFNGR2*

В середньому, популяція української чорно-рябої породи порівняно з

червоно-рябою характеризується дещо вищими рівнями фактичної та очікуваної гетерозиготності за всіма досліджуваними мутаціями, крім мутації 7400C>G локусу *SLC11A1*, для якої спостерігається зворотна картина, де вищі значення притаманні червоно-рябій молочній породі. Середні величини фактичної і очікуваної гетерозиготності за п'ятьма мутаціями для української чорно-рябої породи показали різницю у 10 % ( $H_o = 0,51$ ;  $H_e = 0,41$ ). Для української червоно-рябої також відмічена аналогічна відмінність середніх значень гетерозиготності ( $H_o = 0,50$ ;  $H_e = 0,39$ ).

Кількісно оцінити ступінь відхилення між показниками фактичної та теоретично розрахованої гетерозиготності можна скориставшись індексом фіксації Райта. У середньому значення  $F_{is}$  вищі в популяції червоно-рябої молочної породи (28,7 %), в чорно-рябої даний показник майже в 1,5 рази менший (23,2 %). При цьому як для одної, так і для іншої групи тварин за всіма досліджуваними мутаціями спостерігається надлишок гетерозигот. Найвищий рівень дефіциту гомозигот в популяції чорно-рябої спостерігається за мутацією -824A>G в локусі *TNF $\alpha$*  (на рівні 32 %), тоді як в популяції червоно-рябої – у локусі *MBL1* (2651G>A) з показником 55 %.

Щодо показника ефективного числа алелів, найвищий рівень поліморфності, що відповідає максимальному значенню показника для двохалельної системи за дослідним локусом *TNF $\alpha$*  характерний для популяції української чорно-рябої породи. Також за мутацією 1596G>A в гені *TLR1* в двох групах тварин чорно-рябої та червоно-рябої молочної значення  $n_e$  наближаються до максимальних, причому в першій групі цей показник дещо вищий (1,96), ніж в іншій (1,92). Так само і в локусі манозозв'язувального лектину 1 величина ефективного числа алелів в обох популяціях корів характеризується високими значеннями, які становлять 1,85 та 1,96 в чорно-рябої та червоно-рябої породи відповідно. У випадку мутації 1008A>G в локусі *IFNGR2* показники  $n_e$  для цих двох порід теж доволі високі (1,85; 1,62 відповідно). В локусі *SLC11A1* за обома маркерними мутаціями спостерігається протилежна ситуація за поліморфізмом. За мутацією

7400C>G показники  $n_e$  мають помітно нижчі значення – в чорно-рябої породи він становить 1,39, в червоно-рябої – практично середнє (1,49). В той же час, величина ефективного числа алелів за 7808A>T в останньої породи найнижча і дорівнює 1,18; в популяції чорно-рябої її значення вище на 20 %. Середнє значення  $n_e$  в популяції чорно-рябої породи за шістьма мутаціями становить 1,74; для червоно-рябої величина дещо нижча і перебуває на рівні 1,68.

Таким чином, за поліморфізмом проаналізованих локусів дослідні групи тварин мають певні аналогії, але, в той же час, характеризуються різкими відмінностями. Цей факт можна пояснити спільним походженням та напрямом продуктивності дослідних популяцій корів. Всі дослідні групи тварин на момент дослідження знаходяться у стані відхилення від генетичної рівноваги та не мають вагомої різниці між показниками фактичної і очікуваної гетерозиготності, що говорить про можливу наявність деяких селекційних процесів і спрямованого штучного добору у дослідних популяціях, що охоплює обрані маркерні мутації. В той же час, в середньому значення  $F_{is}$  вказують на високий рівень аутбредності дослідних груп тварин, що можна пояснити меншим тиском добору. З іншого боку, варіації особливостей генетичної структури дослідних популяцій ВРХ викликані відмінностями у вихідному племінному матеріалі, а також можливим дрейфом генів на фоні застосування штучного добору в нечисленних штучних популяціях. Проте потрібно зауважити, що превалювання частоти зустрічання певних алелів обраних локусів указує на «супутній» відбір мутантних варіантів за допомогою проведення класичних селекційних заходів.

Отже, наявність високого рівня поліморфізму і генетичне різноманіття популяцій за розподілом частот алелей та інших показників генетичної мінливості дає можливість вважати досліджені локуси досить інформативними молекулярно-генетичними маркерами, крім *TLR4*. Отримані дані свідчать про необхідність подальшого вивчення характеру розподілу

поліморфних алелів і генотипів досліджуваних локусів з метою їх використання для розв'язання широкого спектра селекційних завдань, у тому числі для встановлення асоціативних зв'язків «алель-корисна ознака» та «генотип-корисна ознака».

### **3.9 Продуктивні якості корів української селекції з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами**

Вивчення генетичної структури дослідних популяцій великої рогатої худоби є важливим етапом в ефективному проведенні маркер-асоційованої селекції. Не менш необхідним кроком у даному напрямі – дослідження зв'язку різних алельних варіантів цільових генів з господарсько корисними ознаками корів різних порід та напрямів продуктивності. У цьому випадку ключовим моментом є достатня кількість особин з різними генотипами для здійснення порівняльного аналізу. В даному підрозділі нашої роботи приведено аналіз зв'язку алельних варіантів різних досліджуваних генів (поліморфні варіанти яких проаналізовані у попередньому підрозділі дисертації) з показниками молочної продуктивності корів порід українська чорно-ряба молочна та українська червоно-ряба молочна. У кожному випадку проводимо аналіз показників, що відображають напрям продуктивності корів. Зокрема, в якості дослідних параметрів молочної продуктивності тварин використовували показники вмісту білка в молоці (%), жирномолочність (%) та значення середнього надою за 305 днів лактації (кг). Аналіз продуктивних якостей здійснювали шляхом порівняння параметрів за трьома лактаціями для досліджуваної групи тварин.

З метою аналізу впливу різних генотипів на формування показників молочної продуктивності на внутрішньопородному рівні проведено аналіз популяцій української чорно-рябої та української червоно-рябої молочної порід.

Особливості розподілу генотипів у дослідних популяціях прямо впливають на результати досліджень щодо параметрів продуктивності корів з різними генотипами за визначеними локусами. За оптимальних умов в досліджуваних популяціях корів наявні тварини з усіма можливими варіантами генотипів, проте за схожої ситуації вагоме значення можуть мати саме відносні частоти генотипів, що, зі свого боку, буде показано в результатах фінального статистичного аналізу.

### **3.9.1 Продуктивні ознаки корів української чорно-рябої молочної породи із різними генотипами за локусами *TLR1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2***

Дослідження ознак молочної продуктивності корів породи українська чорно-ряба молочна проводили за рахунок порівняння середніх значень кожного із генотипів за окремим локусом за використання t-критерію та умов нормального розподілу, інших – за допомогою непараметричного U-критерія Манна-Уїтні та Краскела-Уоліса.

Одним з важливих питань, що стосується перспектив використання поліморфізму гена толл-подібного рецептора 1 є його вплив на показники молочної продуктивності ВРХ. За результатами проведених попередніх досліджень показано, що за мутацією 1596G>A гена *TLR1*, згідно особливостей розподілу частот алелів та генотипів у дослідних популяціях корів можна проводити статистичний аналіз асоціацій з показниками продуктивності для всіх можливих генотипів – AA, AG та GG. Кількість особин з окремими генотипами є достатньою ( $n \geq 4$ ) для проведення статистичних розрахунків.

Результати проведеного аналізу щодо аналізу параметрів молочної продуктивності особин із різними генотипами за локусом *TLR1* дозволили визначити відмінності у значеннях окремих показників впродовж трьох

лактацій (вміст білка і жиру в молоці, а також значення середнього надою за 305 днів лактації) у дослідних популяціях корів.

За результатами досліджень встановлено, що для першої лактації максимальні значення показнику надою за 305 днів характерні для гетерозиготних особин, найнижчі – для особин із гомозиготним генотипом AA. Що стосується третьої лактації, ситуація трохи змінюється, оскільки найбільші значення надою тепер характерні для особин з генотипом AA, а найнижчі – для гомозигот GG. Однак, незважаючи на картину, що спостерігається, вірогідної різниці між значеннями параметрів не встановлено (табл. 3.15). Також показано, що за показником надою за 305 днів, значення коефіцієнту варіації знаходилось, здебільшого, в діапазоні середнього рівня мінливості показнику (перевищувало межу у 10 %).

Показники молочної продуктивності корів породи українська чорно-ряба з різними генотипами за дослідним маркером наведено у таблиці 3.15.

Варто зауважити, що згідно з результатами аналізу даних таблиці 3.15 різниця між показником стандартного надою для тварин з гомозиготними генотипами AA та GG становить практично одну тонну за третю лактацію (8130,3 та 7141,3 кг відповідно). Цей факт вказує на потенційну корисність цього локусу для проведення подальших досліджень беручи до уваги необхідність використовувати більшу кількість проаналізованих тварин із загальної вибірки. Більша кількість піддослідних тварин у вибірці призведе до зниження значення стандартної помилки та, в решті решт, може значним чином змінити інтерпретацію результатів. Потрібно відмітити той факт, що кількість особин у вибірці досить низька (але є достатньою для проведення статистичного аналізу), що пояснюється необхідністю використання лише особин перших трьох лактацій, а це, в свою чергу, знизило загальну кількість тварин в групах порівняно з однією чи двома лактаціями. За вмістом жиру та білка в молоці достовірної різниці між групами корів української чорно-рябої породи з різними генотипами за локусом *TLR1* не встановлено. Хоча в кожній групі тварин спостерігалась тенденція до зменшення вмісту як жиру,

так і білка в молоці корів з кожною наступною лактацією. Відповідно дозначення коефіцієнту варіації за дослідженими показниками вмісту молочного жиру та білка обрані групи тварин проявили низький рівень мінливості (величина  $C_v$  у кожному випадку не перевищувала 10 %).

Таблиця 3.15

**Показники молочної продуктивності корів української чорно-рябої породи з різними генотипами за локусом *TLRI***

Показник	Генотип		
	AA (n=11)	AG (n=23)	GG (n=8)
Перша лактація			
Надій, кг	5582,5±304,47 <sup>a</sup>	5831,1±190,48 <sup>a</sup>	5769,0±488,39 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	10,91	9,24	16,93
Вміст жиру, %	3,84±0,055 <sup>a</sup>	3,79±0,033 <sup>a</sup>	3,82±0,041 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	2,86	2,48	2,17
Вміст білка, %	3,42±0,019 <sup>a</sup>	3,42±0,02 <sup>a</sup>	3,43±0,031 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	1,11	1,75	1,81
Друга лактація			
Надій, кг	6755,8±502,04 <sup>a</sup>	6779,4±174,07 <sup>a</sup>	6756,5±485,57 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	14,86	7,26	14,37
Вміст жиру, %	3,73±0,068 <sup>a</sup>	3,64±0,037 <sup>a</sup>	3,70±0,056 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	3,67	2,86	3,03
Вміст білка, %	3,31±0,043 <sup>a</sup>	3,34±0,020 <sup>a</sup>	3,36±0,013 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	2,59	1,71	0,80
Третя лактація			
Надій, кг	8130,3±359,47 <sup>a</sup>	7766,9±291,78 <sup>a</sup>	7141,3±402,37 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	8,84	10,63	11,27
Вміст жиру, %	3,65±0,067 <sup>a</sup>	3,60±0,035 <sup>a</sup>	3,69±0,048 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	3,67	2,75	2,61
Вміст білка, %	3,27±0,032 <sup>a</sup>	3,30±0,026 <sup>a</sup>	3,31±0,022 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	1,96	2,27	1,33

За локусом фактора некрозу пухлини  $\alpha$  проводили аналіз показників молочної продуктивності особин із різними генотипами кожній із дослідних



порід протягом трьох лактацій. Особливості розподілу частот алелів та генотипів дозволили проаналізувати продуктивні параметри особин зі всіма можливими генотипами (AA, AG і GG).

За результатами проведених досліджень встановлено, що корови української чорно-рябої молочної породи з генотипом AG не поступаються за величиною стандартного надою тваринам з гомозиготними генотипами за дві перші лактації. Причому для всіх трьох генотипів характерно збільшення надою для другої лактації від 605,9 кг (генотип AA) до 1201,3 кг (генотип GG). Для третьої лактації спостерігається абсолютно протилежна картина, тоді як генотип AA характеризується максимальним надоєм, значення якого зросло ще на 1618,2 кг відносно другої лактації, величина стандартного надою особин із гомозиготним генотипом GG, навпаки, зменшилася на 1079,1 кг. При цьому слід відмітити, що тільки гетерозиготи впродовж трьох лактацій продемонстрували чітку тенденцію зростання рівня надою. Для дослідної популяції корів для третьої лактації встановлено вірогідну різницю між значеннями надою між особинами з генотипами AA і GG, AG і GG за дослідним локусом, натомість для першої та другої лактацій – достовірних відмінностей не виявлено (але наявна тенденція до превалювання значення стандартного надою для тварин з гетерозиготним генотипом).

Показники молочної продуктивності корів породи українська чорно-ряба з різними генотипами за дослідним маркером наведено у таблиці 3.16.

Величина коефіцієнтів варіації вказує на середній рівень мінливості показника стандартного надою у трьох дослідних груп тварин і перебуває в досить широкому діапазоні 16,32–45,84 %. Варто зауважити, що максимальний показник виявився характерним для гомозигот GG, в той час як для гетерозигот він найменший протягом всіх лактацій.

Таблиця 3.16

**Показники молочної продуктивності корів української чорно-рябої породи з різними генотипами за локусом *TNFA* (SacI-поліморфізм)**

Показник	Генотип		
	AA (n=7)	AG (n=30)	GG (n=7)
Перша лактація			
Надій, кг	5725,2±335,3 <sup>a</sup>	5854,8±215,1 <sup>a</sup>	5011,3±430,1 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	16,56	20,78	24,28
Вміст жиру, %	4,12±0,113 <sup>a</sup>	4,06±0,031 <sup>a</sup>	3,91±0,043 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	7,23	4,32	3,12
Вміст білка, %	3,36±0,055 <sup>a</sup>	3,41±0,017 <sup>b</sup>	3,32±0,090 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	4,34	2,78	7,67
Друга лактація			
Надій, кг	6331,1±421,1 <sup>a</sup>	6742,9±194,55 <sup>a</sup>	6212,6±517,6 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	18,81	16,32	23,57
Вміст жиру, %	4,01±0,099 <sup>a</sup>	3,98±0,048 <sup>a</sup>	3,70±0,158 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	7,03	6,88	12,08
Вміст білка, %	3,26±0,025 <sup>a</sup>	3,28±0,048 <sup>a</sup>	3,17±0,079 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	2,20	8,23	7,07
Третя лактація			
Надій, кг	7949,3±714,1 <sup>b</sup>	7255,2±241,1 <sup>b</sup>	5133,5±889,5 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	23,77	18,20	45,84
Вміст жиру, %	3,73±0,106 <sup>a</sup>	3,90±0,063 <sup>a</sup>	3,81±0,117 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	7,51	8,79	8,14
Вміст білка, %	3,15±0,068 <sup>a</sup>	3,19±0,046 <sup>a</sup>	3,04±0,118 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	5,71	7,90	10,22

Що стосується вмісту жиру в молоці, то за першу і другу лактації його значення виявилось найбільшим у гомозигот за алелем А, за третю – у гетерозигот АG. За вмістом білка впродовж усіх трьох періодів дослідні групи тварин з різними генотипами були достатньо схожі, проте між значеннями цього параметру між особинами з генотипами АG і GG встановлено вірогідну різницю за першу лактацію ( $p < 0,05$ ). Як і у випадку з надоем, максимальні значення молочного білка притаманні гетерозиготним

особинам. Слід зазначити, що за вмістом основних складових молока (жир, білок) за дві наступні лактації достовірної різниці між групами корів української чорно-рябої породи за локусом *TNF $\alpha$*  не виявлено.

За дослідженими параметрами вмісту молочного жиру та білка відповідно до значень коефіцієнту варіації, дослідним групам тварин, на відміну від показника надою, властивий достатньо низький рівень мінливості (максимальне значення  $C_v$  дорівнює 12,08 %).

За результатами проведених досліджень з визначення особливостей генетико-популяційної структури дослідних стад великої рогатої худоби за локусом *MBL1* з'ясовано, що особливості розподілу частот алелів та генотипів у популяції української чорно-рябої молочної породи дають змогу проаналізувати продуктивні показники особин зі всіма можливими генотипами (AA, AG та GG).

Показники молочної продуктивності корів української чорно-рябої породи з різними генотипами за дослідним маркером наведено у таблиці 3.17.

За StyI-поліморфізмом у другому екзоні гена *MBL1* статистично вірогідних відмінностей між особинами з різними генотипами за показниками молочної продуктивності для всіх трьох лактацій не зафіксовано.

За результатами досліджень встановлено, що домінуючими значеннями надоїв характеризуються тварини з гомозиготним генотипом GG для першої та третьої лактацій. У свою чергу, для другої лактації ситуація дещо змінюється – найбільше значення надою характерне для гетерозигот AG, тоді як для гомозигот AA відмічено незначну різницю за цим показником (у порівнянні з гетерозиготами), так і для гомозигот GG (також порівняно з гетерозиготними особинами). Причому, якщо для двох груп тварин, зокрема для гомозигот AA та гетерозигот AG спостерігалось зростання значень надою з кожною наступною лактацією, то для особин гомозиготних за алелем G – незначне зменшення кількості надою за другу лактацію на 82 кг.

Зважаючи на одержані результати, вірогідної різниці між більшістю показників молочної продуктивності особин з різними генотипами не встановлено (табл. 3.17).

Таблиця 3.17

**Показники молочної продуктивності корів української чорно-рябої породи з різними генотипами за локусом *MBL1***

Показник	Генотип		
	AA (n=17)	AG (n=25)	GG (n=5)
Перша лактація			
Надій, кг	5430,4±304,4 <sup>a</sup>	5871,6±236,1 <sup>a</sup>	6314,7±463,1 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	23,11	21,28	14,67
Вміст жиру, %	4,08±0,060 <sup>a</sup>	4,02±0,030 <sup>a</sup>	4,12±0,131 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	5,83	3,93	6,33
Вміст білка, %	3,39±0,048 <sup>a</sup>	3,39±0,020 <sup>a</sup>	3,42±0,062 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	5,69	3,16	3,60
Друга лактація			
Надій, кг	6653,4±285,1 <sup>a</sup>	6684,5±239,0 <sup>a</sup>	6232,7±382,89 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	17,66	18,92	12,29
Вміст жиру, %	3,96±0,084 <sup>a</sup>	3,94±0,059 <sup>a</sup>	3,89±0,172 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	8,73	7,87	8,89
Вміст білка, %	3,27±0,066 <sup>a</sup>	3,28±0,039 <sup>a</sup>	3,14±0,098 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	8,30	6,34	6,27
Третя лактація			
Надій, кг	6987,5±447,6 <sup>a</sup>	7273,9±365,5 <sup>a</sup>	7298,7±740,1 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	26,41	25,13	17,56
Вміст жиру, %	3,93±0,060 <sup>a</sup>	3,82±0,073 <sup>a</sup>	3,99±0,064 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	6,27	9,63	2,76
Вміст білка, %	3,14±0,054 <sup>a</sup>	3,18±0,055 <sup>a</sup>	3,11±0,095 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	7,03	8,64	5,30

За значенням коефіцієнту варіації вищеописаний параметр (молочний надій) знаходився на середньому рівні мінливості (в межах 12,29-26,41%), при цьому найнижчою варіативністю впродовж всіх досліджуваних лактацій

характеризувався генотип GG.

За параметрами вмісту молочного жиру і білка достовірних відмінностей між тваринами з різними генотипами не виявлено. Також слід зауважити, що для всіх дослідних груп корів спостерігається тенденція зниження кількості жиру та білка в молоці з кожною подальшою лактацією. Водночас, за значеннями показників вмісту білка для трьох лактацій дослідні групи тварин характеризувались нормальним розподілом відповідно до критерію Шапіро-Уїлка, що дало можливість використати параметричні критерії для аналізу вірогідності різниці між показниками особин з різними генотипами.

Стосовно варіативності господарсько цінних ознак (жир та білок) варто зазначити, що для всіх лактацій вона перебувала у межах низького рівня мінливості (діапазон 2,76–9,63 %), причому максимальні значення припадали на другу лактацію.

За результатами проведених генетико-популяційних досліджень встановлено, що за розподілом частот алелей та генотипів за локусом *IFNGR2* можна використовувати для проведення статистичного аналізу групи корів зі всіма можливими генотипами (AA, AG та GG).

Показники молочної продуктивності корів української чорно-рябої породи з різними генотипами за дослідним маркером наведено у таблиці 3.18.

Зокрема, виявлено асоціацію поліморфізму алельних варіантів досліджуваного гена з надоем, вмістом жиру та білка у молоці.

За результатами досліджень, для корів породи українська чорно-ряба молочна за локусом *IFNGR2* з'ясовано, що для всіх трьох лактацій найвищі значення показнику надою характерні для гомозигот із генотипом GG, причому для кожної наступної лактації спостерігалось збільшення надою практично на одну тону (7480,6 кг та 8150,7 кг на другу і третю лактацію відповідно). Що стосується тварин з генотипами AA і AG, ситуація подібна, для гетерозигот різниця між надоями за 305 днів для першої і другої лактації

склала 1076,1 кг, для гомозигот з алелем А для другої та третьої – 865,8 кг. Слід відмітити, що за другу лактацію встановлено вірогідні відмінності між показниками особин із генотипом АА та іншими групами тварин ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 3.18

**Показники молочної продуктивності корів української чорно-рябої породи з різними генотипами за локусом *IFNGR2***

Показник	Генотип		
	АА (n=13)	АG (n=19)	GG (n=5)
Перша лактація			
Надій, кг	5379,5±317,63 <sup>a</sup>	5781,7±255,93 <sup>a</sup>	6243,4±257,39 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	25,7	21,68	9,22
Вміст жиру, %	4,09±0,059 <sup>a</sup>	3,98±0,028 <sup>a</sup>	4,02±0,042 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	6,31	3,48	2,32
Вміст білка, %	3,36±0,030 <sup>a</sup>	3,37±0,032 <sup>a</sup>	3,41±0,056 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	3,93	4,73	3,64
Друга лактація			
Надій, кг	5989,7±273,26 <sup>a</sup>	6857,8±220,28 <sup>b</sup>	7480,6±356,75 <sup>b</sup>
$C_v$ , %	19,88	15,74	10,66
Вміст жиру, %	3,98±0,065 <sup>a</sup>	3,85±0,080 <sup>a</sup>	4,03±0,083 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	7,07	10,20	4,60
Вміст білка, %	3,28±0,045 <sup>a</sup>	3,19±0,056 <sup>a</sup>	3,34±0,040 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	5,95	8,59	2,71
Третя лактація			
Надій, кг	6855,5±466,65 <sup>a</sup>	6780,3±479,54 <sup>a</sup>	8150,7±245,17 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	24,54	30,83	6,01
Вміст жиру, %	3,69±0,096 <sup>a</sup>	3,93±0,075 <sup>a</sup>	4,09±0,029 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	9,40	8,35	1,40
Вміст білка, %	3,09±0,079 <sup>a</sup>	3,21±0,058 <sup>a</sup>	3,20±0,099 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	9,21	7,88	6,17

У свою чергу, для першої та третьої лактації відмічено відхилення від нормального характеру розподілу, що призвело до необхідності використання непараметричних критеріїв для проведення аналізу.

За даним показником особини з гомозиготним генотипом GG

характеризуються вищими значеннями порівняно як з гетерозиготами, так і відносно групи особин з генотипом AA, що робить цей генотип досить привабливим для проведення подальших досліджень з урахуванням більшої кількості тварин із загальної вибірки.

Величина коефіцієнтів варіації свідчить про середній рівень мінливості показника стандартного надою у трьох дослідних груп і знаходиться в доволі широких межах 6,01 – 30,83 %. Слід зауважити, що найбільший показник виявився притаманним для гетерозигот, в той час як для гомозигот GG він був мінімальним для всіх лактацій.

За першу лактацію відсоток жиру в молоці виявився найбільшим у гомозигот за алелем A, а за другу і третю – у гомозигот за алелем G. Найбільший вміст білка протягом усіх трьох періодів характерний для тварин з генотипом GG, причому на третій лактації відсоток практично аналогічний в особин з генотипом AG.

Однак, варто зауважити, що за значеннями показників вмісту жиру та білка в молоці дослідні групи тварин чорно-рябої молочної породи не мали вірогідних відмінностей. У свою чергу, за показником вмісту жиру спостерігалася подібна ситуація – розподіл відхилявся від нормального для перших двох лактацій, а для третьої, навпаки, відмічено нормальний розподіл, що дозволило скористатися методом Тьюкі-Крамера.

За дослідженими параметрами вмісту молочного жиру та білка згідно зі значенням коефіцієнту варіації дослідні групи тварин, на відміну від показника надою, характеризуються низьким рівнем мінливості (значення  $C_v$  не перевищує 10,20 %).

### **3.9.2 Продуктивні ознаки корів української червоно-рябої молочної породи із різними генотипами за локусами *TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2***

У випадку з популяцією корів української червоно-рябої молочної

породи за дослідним локусом також здійснювали порівняльний аналіз показників продуктивності для особин із усіма можливими генотипами (AA, AG і GG).

Для української червоно-рябої молочної із різними генотипами за локусом *TLR1* проводили дослідження щодо визначення параметрів молочної продуктивності корів (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

**Показники молочної продуктивності корів української червоно-рябої породи з різними генотипами за локусом *TLR1***

Показник	Генотип		
	AA (n=6)	AG (n=14)	GG (n=9)
Перша лактація			
Надій, кг	5370,5±306,02 <sup>a</sup>	5135,9±158,20 <sup>a</sup>	5375,7±280,27 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	13,96	14,11	18,79
Вміст жиру, %	3,82±0,021 <sup>a</sup>	3,86±0,017 <sup>a</sup>	3,87±0,034 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	1,32	2,05	3,13
Вміст білка, %	3,32±0,048 <sup>a</sup>	3,31±0,028 <sup>a</sup>	3,319±0,022 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	3,55	3,86	2,35
Друга лактація			
Надій, кг	6214±267,85 <sup>a</sup>	5949,3±159,42 <sup>a</sup>	6127,5±281,33 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	10,56	12,28	16,55
Вміст жиру, %	3,73±0,032 <sup>a</sup>	3,76±0,015 <sup>a</sup>	3,77±0,026 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	2,11	1,81	2,48
Вміст білка, %	3,26±0,066 <sup>a</sup>	3,25±0,025 <sup>a</sup>	3,26±0,026 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	4,95	3,58	2,88
Третя лактація			
Надій, кг	6760,5±301,21 <sup>a</sup>	6576,5±129,53 <sup>a</sup>	6783,7±240,83 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	10,91	9,03	12,80
Вміст жиру, %	3,67±0,030 <sup>a</sup>	3,69±0,013 <sup>a</sup>	3,70±0,022 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	2,02	1,56	2,12
Вміст білка, %	3,19±0,057 <sup>a</sup>	3,17±0,027 <sup>a</sup>	3,15±0,032 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	4,41	4,02	3,63



Враховуючи особливості генетичної структури вказаної групи корів порівняння показників проводили між тваринами зі всіма можливими генотипами – AA, AG та GG.

Отримані результати досліджень дозволили встановити, що для першої та третьої лактацій максимальні значення показнику надою характерні для гомозигот за алелем G, однак, для гомозигот з генотипом AA спостерігається дуже схожа картина.

Зі свого боку, на другу лактацію ситуація дещо змінюється – найвищі значення молочного надою притаманні гомозиготним особинам за алелем A, тоді як для гомозигот GG зазначено незначну різницю за цим показником (87 кг). З огляду на одержані дані, вірогідної відмінності між значеннями показників не виявлено. До того ж, за показником надою за 305 днів лактації, значення коефіцієнту варіації знаходилось здебільшого в межах середнього рівня мінливості показнику (не перевищувало межу в 19 %) для всіх трьох лактацій.

Слід зазначити, що вибірка характеризувалась невеликою кількістю особин за окремими генотипами, що пояснюється включенням тільки особин трьох перших лактацій, що у вибраний спосіб зменшило загальну кількість тварин у групах, відносно однієї чи двох лактацій.

Що стосується параметрів вмісту молочного жиру та білка суттєвої різниці між групами корів з досліджуваними генотипами за локусом *TLR1* не виявлено. За показниками вмісту молочного жиру і білка щодо значення коефіцієнту варіації групи тварин зі всіма можливими генотипами демонструють мінливість на досить низькому рівні (значення  $C_v$  у кожному випадку не перевищує 5 %).

Особливості генетичної структури дослідних популяцій за локусом *SLC11A1* далі змогу провести статистичний аналіз продуктивних якостей корів із трьома різними гаплотипами (комплексними генотипами) CC-AA, CG-AA та CG-AT. Показники молочної продуктивності корів української червоно-рябої породи з різними генотипами за локусом *SLC11A1* наведено у

таблиці 3.20.

Таблиця 3.20

**Показники молочної продуктивності корів української червоно-рябої породи з різними генотипами за локусом *SLC11A1***

Показник	Гаплотип		
	CC-AA (n=10)	CG-AA (n=7)	CG-AT (n=13)
Перша лактація			
Надій, кг	5006,8±129,79 <sup>ab</sup>	5587,5±222,17 <sup>b</sup>	4814,6±211,28 <sup>ac</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	9,69	17,3	11,61
Вміст жиру, %	3,88±0,026 <sup>a</sup>	3,84±0,02 <sup>a</sup>	3,89±0,031 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	2,57	2,28	2,11
Вміст білка, %	3,31±0,027 <sup>a</sup>	3,335±0,029 <sup>a</sup>	3,29±0,029 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	3,09	3,76	2,40
Друга лактація			
Надій, кг	5884,4±119,33 <sup>ab</sup>	6295,9±233,92 <sup>b</sup>	5696,3±213,31 <sup>ac</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	7,59	16,19	9,90
Вміст жиру, %	3,776±0,019 <sup>a</sup>	3,74±0,019 <sup>a</sup>	3,78±0,021 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	1,91	2,29	1,48
Вміст білка, %	3,26±0,029 <sup>a</sup>	3,26±0,029 <sup>a</sup>	3,22±0,034 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	3,42	3,87	2,84
Третя лактація			
Надій, кг	6518,2±133,62 <sup>ab</sup>	6899,7±200,68 <sup>b</sup>	6358,1±67,03 <sup>ac</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	7,67	12,68	2,79
Вміст жиру, %	3,72±0,017 <sup>a</sup>	3,68±0,016 <sup>a</sup>	3,7±0,019 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	1,74	1,94	1,35
Вміст білка, %	3,18±0,027 <sup>a</sup>	3,17±0,029 <sup>a</sup>	3,13±0,057 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	3,24	4,07	4,84

Локус *SLC11A1* значною мірою відрізняється від описаних вище. В цьому локусі досліджено дві мутації, які утворюють гаплотипи – CC-AA, CG-AA та CG-AT із дев'яти теоретично можливих варіантів. Інших варіації гаплотипів у популяції корів української червоно-рябої породи не виявлено. Варто зауважити, що у цьому випадку аналіз показників продуктивності

корів з різними гаплотипами має особливе практичне значення порівняно з окремими генотипами, так як представляє собою єдину функціональну одиницю (що може бути використане в межах програм маркер-асоційованої селекції).

Як слідує з отриманих результатів, за показниками молочної продуктивності найбільшими надоями відзначились тварини з гаплотипом CG-AA порівняно з особинами з іншими гаплотипами (різниця достовірна на рівні  $p < 0,05$ ). Водночас, максимальна різниця відмічена з гаплотипом CG-AT (772,9 кг). Ця тенденція (домінування значень показника стандартного надоя в корів із гаплотипом CG-AT) спостерігається впродовж всіх трьох лактацій. Крім того, тварини з гаплотипом CG-AA характеризуються найвищою величиною коефіцієнту варіації, що вказує на середній рівень мінливості ознаки, проте ці значення не виходять за межі визначення однорідності вибірки.

До всього іншого, на нашу думку, це може бути пов'язано з необхідністю аналізу істотно більшої вибірки тварин у разі великої кількості ймовірних варіантів варіативності (дев'ять можливих гаплотипів).

У випадку двох мутацій 7400C>G та 7808A>T за показниками вмісту молочного жиру та білка достовірних відмінностей між особинами з різними гаплотипами в української червоно-рябої породи не зафіксовано, незважаючи на те, що протягом всіх трьох лактацій відмічається поступове зниження значень цих показників у всіх досліджуваних гаплотипів. Для трьох лактацій варіативність ознак коливалась у межах незначного рівня.

Необхідно зазначити, що за локусом *SLC11A1* ситуація може відрізнятися від тієї, що склалася для інших локусів через варіативність розподілу гаплотипів у групі. Однак, у будь-якому разі, результати досліджень вказують на перспективність подальших досліджень на інших популяціях та породах корів. При цьому, обов'язковою умовою має бути більша вибірка тварин, що дасть змогу визначити продуктивні параметри тварин також з іншими гаплотипами.

У випадку з SacI-поліморфізмом у промоторному фрагменті гена *TNFA* порівнювали значення показників молочної продуктивності корів української червоно-рябої породи з різними генотипами, що наведено у таблиці 3.21.

Таблиця 3.21

**Показники молочної продуктивності корів української червоно-рябої породи з різними генотипами за локусом *TNFA* (SacI-поліморфізм)**

Показник	Генотип		
	AA (n=5)	AG (n=6)	GG (n=8)
Перша лактація			
Надій, кг	5434,2±399,3 <sup>a</sup>	5513,1±272,3 <sup>a</sup>	5352,8±314,1 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	16,43	27,94	24,19
Вміст жиру, %	4,07±0,080 <sup>a</sup>	4,12±0,061 <sup>a</sup>	4,19±0,085 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	4,39	8,25	8,33
Вміст білка, %	3,22±0,109 <sup>a</sup>	3,19±0,041 <sup>a</sup>	3,22±0,058 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	7,58	7,21	7,42
Друга лактація			
Надій, кг	5531,7±783,2 <sup>a</sup>	6022,9±257,2 <sup>a</sup>	5838,9±249,4 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	28,32	21,35	14,80
Вміст жиру, %	3,92±0,052 <sup>a</sup>	4,18±0,094 <sup>a</sup>	4,12±0,089 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	2,68	11,24	7,50
Вміст білка, %	3,05±0,082 <sup>a</sup>	3,11±0,058 <sup>a</sup>	3,27±0,042 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	5,37	9,32	4,46
Третя лактація			
Надій, кг	6586,7±661,9 <sup>a</sup>	6945,5±411,2 <sup>b</sup>	5111,6±340,7 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	17,41	14,50	18,85
Вміст жиру, %	4,35±0,293 <sup>a</sup>	4,59±0,212 <sup>a</sup>	4,18±0,146 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	11,68	11,36	9,87
Вміст білка, %	3,06±0,044 <sup>a</sup>	3,16±0,056 <sup>a</sup>	3,28±0,055 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	2,48	4,33	4,76

За результатами досліджень з'ясовано, що для всіх досліджуваних лактацій максимальні значення показнику надою притаманні особинам з гетерозиготним генотипом AG. При цьому, з кожною наступною лактацією

значення надою збільшується на 509,8 кг (порівняно з другою) та на 922,6 кг (порівняно з третьою). В той же час, найменші значення стандартного надою характерні для гомозигот GG, причому, якщо для другої лактації його величина збільшувалася, то для третьої, навпаки, знизилася на 727,3 кг (схожі результати були отримані й при аналізі української чорно-рябої молочної породи). Виходячи з одержаних результатів, статистично значущої різниці між більшістю показників молочної продуктивності корів з різними генотипами не встановлено (табл. 3.21).

Проте, за значенням параметру надою за 305 днів для третьої лактації встановлено вірогідні відмінності ( $p < 0,05$ ) між особинами з гомозиготними генотипами (AA та GG) та гетерозиготами AG. Разом з тим, для перших двох лактацій зазначено відхилення від нормального характеру розподілу, що призвело до необхідності використання непараметричного критерію для проведення аналізу.

Крім того, за показником надою значення коефіцієнту варіації знаходилось здебільшого у межах середнього рівня мінливості показнику (не перевищувало поріг в 28,32 %) для всіх трьох лактацій. Найнижча варіативність відмічена для третьої лактації для особин всіх дослідних груп (зі всіма дослідними генотипами).

Також варто зазначити, що вибірка тварин вирізнялася невеликою кількістю особин за деякими генотипами, що можна пояснити включенням лише особин перших трьох лактацій, що таким чином зменшило загальну кількість корів у групах, порівняно з однією чи двома лактаціями.

Щодо показників вмісту молочного жиру та білка для першої лактації суттєвої різниці між групами корів з різними генотипами за локусом фактора некроза пухлини альфа не виявлено. Однак, для другої і третьої лактації найвищий вмісту жиру, як і у випадку надою, спостерігається для гетерозигот. Причому слід зауважити, якщо для гомозигот AA і GG характерно зниження кількості жиру за другу лактацію і підвищення за третю, то для гетерозигот AG – поступове зростання від 4,12 % до 4,59 %. За

кількістю молочного білка для другої і третьої лактації перевагу мали тварини з гомозиготним генотипом GG. Однак, за вмістом жиру та білка в молоці достовірної різниці між групами не встановлено.

За параметрами вмісту молочного жиру і білка стосовно значення коефіцієнту варіації всі групи тварин характеризуються середнім рівнем мінливості (значення  $C_v$  у кожному випадку не перевищує 11,68 %).

У випадку з популяцією корів української червоно-рябої молочної породи за дослідним поліморфізмом у локусі *MBL1* порівняння параметрів молочної продуктивності для третьої лактації здійснювали тільки для двох генотипів AG та GG внаслідок недостатньої кількості особин з гомозиготним генотипом AA.

Показники молочної продуктивності корів української червоно-рябої породи з різними генотипами за локусом *MBL1* наведено у таблиці 3.22.

За результатами проведених досліджень вірогідних відмінностей за кожним із досліджених показників не виявлено. Гомозиготні особини за алелем G демонструють деяку перевагу перед гетерозиготами, однак, різниця знаходиться у межах статистичної похибки.

За результатами статистичного аналізу встановлено, що для першої і третьої лактації максимальні значення показнику надою притаманні для гомозигот за алелем G, найнижчі – для гетерозиготних особин.

Водночас, на другу лактацію картина істотно змінюється – найбільші значення надою є характерними для гомозиготних за алелем A особин. Проте, незважаючи на наявну тенденцію, що спостерігається, вірогідної різниці між значеннями показників не виявлено (табл. 3.22). Слід зауважити, що за результатами аналізу даних таблиці різниця між показником надою за 305 днів для особин з генотипами AA та AG сягає більш ніж одну тонну за другу лактацію, що робить цей локус достатньо корисним для проведення подальших досліджень, враховуючи необхідність використовувати більшу кількість особин за вибіркою. Значення коефіцієнту варіації за показником стандартного надою знаходилось переважно у межах середнього рівня

мінливості показнику (не перевищувало межу у 27,76 %).

Таблиця 3.22

**Показники молочної продуктивності корів української червоно-  
рябої породи з різними генотипами за локусом *MBL1***

Показник	Генотип		
	AA (n=5)	AG (n=16)	GG (n=5)
Перша лактація			
Надій, кг	5610,1±546,0 <sup>a</sup>	5242,0±227,2 <sup>a</sup>	6187,2±318,9 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	25,75	27,76	12,63
Вміст жиру, %	4,33±0,193 <sup>a</sup>	4,11±0,045 <sup>a</sup>	4,10±0,123 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	11,85	7,05	7,37
Вміст білка, %	3,15±0,094 <sup>a</sup>	3,23±0,037 <sup>a</sup>	3,19±0,096 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	7,87	7,31	7,37
Друга лактація			
Надій, кг	6844,4±692,3 <sup>a</sup>	5705,2±189,1 <sup>a</sup>	5990±589,6 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	22,62	19,61	17,05
Вміст жиру, %	4,62±0,308 <sup>a</sup>	4,09±0,054 <sup>a</sup>	4,04±0,092 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	14,91	7,80	3,94
Вміст білка, %	3,17±0,173 <sup>a</sup>	3,15±0,041 <sup>a</sup>	3,31±0,087 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	12,21	7,78	4,53
Третя лактація			
Надій, кг	-	5976,7±299,7 <sup>a</sup>	6151,3±951,1 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	-	20,06	26,78
Вміст жиру, %	-	4,28±0,109 <sup>a</sup>	4,60±0,338 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	-	10,21	12,74
Вміст білка, %	-	3,20±0,042 <sup>a</sup>	3,25±0,020 <sup>a</sup>
<i>C<sub>v</sub></i> , %	-	5,25	1,08

За перші дві лактації відсоток жиру в молоці виявився найбільшим у гомозигот за алелем А, а за третю – у гомозигот за алелем G. Проте, за показниками як вмісту молочного жиру, так і білка достовірної різниці між групами корів з різними генотипами за локусом манозозв'язувального лектину 1 не виявлено. Хоча за вмістом жиру в молоці тварини з генотипом

GG поступалися тваринам з іншими досліджуваними генотипами, а за вмістом білка в молоці навпаки переважали їх.

При цьому, розподіл значень для вмісту білка в молоці корів для всіх трьох лактацій не мав характеру нормального розподілу відповідно до критерію Шапіро-Уїлка, що призвело до використання непараметричного методу Мана-Уїтні для аналізу вірогідності різниці між показниками особин з різними генотипами. За показником вмісту жиру спостерігалася подібна ситуація – розподіл відхилявся від нормального для перших двох лактацій, а для третьої – властивий нормальний розподіл, що дозволило скористатися методом Тьюкі-Крамера.

За дослідженими параметрами вмісту молочного жиру та білка згідно зі значенням коефіцієнту варіації дослідні групи тварин, порівняно з показниками надою, характеризуються достатньо варіативним рівнем мінливості (значення  $C_v$  знаходяться в діапазоні 1,08-14,91 %).

У випадку з популяцією корів української червоно-рябої молочної породи за мутацією 1008A>G у локусі інтерферону гамма-рецептора 2 порівняння показників молочної продуктивності проводили тільки для двох генотипів AA та AG внаслідок незначної кількості особин з генотипом GG. Визначення показників продуктивності особин корів з генотипом GG за даним геном виявилось неможливим через недостатню кількість корів, для яких було отримано дані стосовно молочної продуктивності. Результати розрахунків за зазначеними показниками наведено у таблиці 3.23.

За результатами досліджень встановлено, що максимальні значення надоїв характерні для тварин з гетерозиготним генотипом AG для всіх трьох лактацій. Таким же чином, як і в чорно-рябої породи в популяції червоно-рябої спостерігалось зростання значень молочного надою з кожною наступною лактацією. Так, різниця між першою і другою становила 559,7 кг, між другою і третьою – лише 43,7 кг (для особин з генотипом AG).

Варто зазначити, що у даній групі корів кількість особин була обмежена необхідністю використовувати лише особин перших трьох



лактацій, що, у будь-якому разі, вплинуло на результати досліджень. Виходячи з одержаних результатів, вірогідної різниці між більшістю показників молочної продуктивності особин з різними генотипами не виявлено (табл. 3.23). Проте, за значенням параметру надою для другої лактації встановлено, що для корів української червоно-рябої породи з генотипами AA та AG характерна вірогідна різниця за досліджуваним локусом ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 3.23

**Показники молочної продуктивності корів української червоно-рябої породи з різними генотипами за локусом *IFNGR2***

Показник	Генотип	
	AA (n=6)	AG (n=9)
Перша лактація		
Надій, кг	5478,4±211,32 <sup>a</sup>	5702,1±286,33 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	19,29	25,60
Вміст жиру, %	4,11±0,055 <sup>a</sup>	4,09±0,078 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	6,70	9,78
Вміст білка, %	3,16±0,048 <sup>a</sup>	3,19±0,039 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	7,62	6,25
Друга лактація		
Надій, кг	5457,8±260,54 <sup>a</sup>	6261,8±262,71 <sup>b</sup>
$C_v$ , %	19,68	19,23
Вміст жиру, %	4,06±0,073 <sup>a</sup>	4,19±0,107 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	7,46	11,73
Вміст білка, %	3,15±0,071 <sup>a</sup>	3,12±0,051 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	9,25	7,53
Третя лактація		
Надій, кг	5822,7±484,43 <sup>a</sup>	6305,5±466,01 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	20,38	22,17
Вміст жиру, %	4,46±0,249 <sup>a</sup>	4,26±0,148 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	13,65	10,43
Вміст білка, %	3,22±0,049 <sup>a</sup>	3,21±0,0590,059 <sup>a</sup>
$C_v$ , %	3,70	5,60

У той же час, для першої та третьої лактацій достовірних відмінностей за показником стандартного надюю не виявлено, однак наявне превалювання значень надюю для особин з гетерозиготним генотипом. За коефіцієнтом варіації вказаний параметр надюю характеризувався середнім та високим рівнем мінливості (не вище 25,6 %), при цьому його варіативність дещо знижується на другу лактацію.

За параметрами вмісту молочного білка та жиру вірогідних відмінностей між особинами з різними генотипами не виявлено. Варіативність ознак (жир та білок) для всіх лактацій знаходилась у межах низького та середнього рівня мінливості (діапазон 3,70-13,65%).

### **3.10 Порівняльний аналіз параметрів продуктивності дослідних популяцій корів із різними генотипами за виявленими поліморфними локусами**

Після дослідження асоціативного зв'язку різних алельних варіантів цільових генів з продуктивними ознаками корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочної порід, проводили порівняльний аналіз параметрів продуктивності тварин за різними локусами (*TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2*). Молекулярно-генетичні маркери, які пов'язані з локусами кількісних ознак, не належать до універсальних індикаторів продуктивності тварин. Тому, у цьому контексті, досить важлива породна специфічність кожного ДНК-маркера. Явище породоспецифічності в деякій мірі обмежує можливості використання досягнень маркер-асоційованої селекції в молочному скотарстві, що унеможливорює використання тільки однієї популяції корів будь-якої породи в якості моделі для здійснення селекційного процесу для інших порід загалом. Стійка генетична структура високопродуктивної породи українська чорно-ряба молочна може характеризуватися максимальною реалізацією продуктивного потенціалу саме в цій породі. Перспектива копіювання результатів на інші породи дещо

обмежена чинником впливу зчеплення генів на сукупність бажаних алелів відповідних локусів, які пов'язані з високими господарсько-корисними ознаками молочної худоби. До того ж, це свідчить про необхідність проведення генетико-популяційних досліджень генофондних порід корів. За рахунок дослідження генетичної структури за низкою потенційно перспективних локусів та проведення аналізу зв'язку їх алельних варіантів з показниками продуктивності корів можна визначити оптимальні гени-кандидати для застосування в селекційній роботі. Окрема порода корів може мати свій унікальний перелік алелів різних локусів кількісних ознак, що зумовлюють її продуктивний потенціал. Виходячи з отриманих результатів, проведено аналіз показників молочної продуктивності корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід залежно від генотипу за генами *TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2*.

Що стосується гена толл-подібного рецептора 1, то отримані дані продемонстрували деякі розбіжності між дослідними породами, оскільки для української чорно-рябої домінуючі значення показнику надою за 305 днів за першу лактацію характерні для гетерозигот AG, за третю – для гомозигот AA, тоді як для червоно-рябої максимальні значення показника для першої і третьої лактацій мали особини з гомозиготним генотипом GG. В той же час, за показниками молочної продуктивності (вміст жиру та білка) вірогідних відмінностей між тваринами обох порід з різними генотипами за локусом *TLR1* (1596G>A) не встановлено.

В результаті проведених досліджень з'ясовано, що за локусом *TNF- $\alpha$*  (мутація -824A>G) тварини обох порід характеризуються досить високою молочною продуктивністю. У той же час суттєвої міжпородної різниці між ними не спостерігається, що можна пояснити аналогічними умовами утримання і годівлі корів. Зокрема, найвищий надій за 305 днів за перші дві лактації виявлено у особин з гетерозиготним генотипом AG як в чорно-рябої породи, так і в червоно-рябої, а за третю лактацію максимальний надій зафіксовано у тварин з генотипом AA (чорно-ряба порода), тоді як в червоно-

рябої знову в гетерозигот AG. Поряд з цим, в обох порід найменші значення стандартного надою впродовж трьох лактацій характерні для гомозигот GG. Але в данному випадку слід звернути увагу на мінімальну кількість особин із генотипом GG, що, у свою чергу, може мати суттєвий вплив на значення показнику. За вмістом молочного жиру найвищий показник відмічений у молоці корів української червоно-рябої породи із генотипом AG (4,59 %). Домінуюче значення молочного білка (3,41 %), навпаки, зафіксовано в особин української чорно-рябої породи з генотипом AG. На основі цього можна зробити висновок, що алель A гена фактора некрозу пухлин  $\alpha$  корелює з вищими показниками молочної продуктивності корів обох дослідних порід.

За геном *MBL1* встановлено виразну, в напрямі більшої молочної продуктивності, дію алелю G для двох досліджуваних порід. Так, за результатами досліджень встановлено, що максимальними значеннями надоїв як української чорно-рябої, так і червоно-рябої порід характеризуються тварини з гомозиготним генотипом GG для першої та третьої лактацій. Водночас, для другої лактації найбільше значення надою відмічено для гетерозигот AG в популяції чорно-рябої породи, тоді як в червоно-рябої – для особин гомозиготних за алелем A. За параметрами вмісту молочного жиру і білка достовірних відмінностей між тваринами з дослідними генотипами української чорно-рябої породи не виявлено. Крім того, для даних груп корів спостерігається тенденція зниження кількості жиру та білка в молоці з кожною наступною лактацією. Що стосується популяції української червоно-рябої породи, за перші дві лактації відсоток жиру в молоці виявився найбільшим у гомозигот за алелем A, а за третю – у гомозигот за алелем G. Проте, за показниками як вмісту молочного жиру, так і білка достовірної різниці між групами корів з різними генотипами за локусом манозозв'язувального лектину не встановлено.

Так само як і для двох попередніх генів, у випадку локусу гамма-рецептора інтерферону 2, за проаналізованими показниками молочної продуктивності корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних

порід залежно від генотипу спостерігається деяка аналогія. В українській чорно-рябої породи домінуючі значення показнику надою за 305 днів впродовж всіх трьох лактацій спостерігались для гомозигот GG, в червоно-рябої – для гетерозигот AG, проте, прослідковувався однозначний позитивний вплив алеля G на показники продуктивності досліджуваних груп ВРХ. За значеннями показників надою для другої лактації обидві дослідні популяції корів продемонстрували вірогідну різницю між показниками особин з різними генотипами, натомість для першої та третьої – вірогідних відмінностей не встановлено. Достовірності впливу генотипів за локусом *IFNGR2* (1008A>G) на величину вмісту жиру та білку також не виявлено.

Отже, проведені нами дослідження не показали однозначної залежності продуктивних показників корів української селекції від генотипів особин за обраними локусами. Однак, за геном *IFNGR2* тварини з генотипом GG (чорно-ряба порода) та AG (червоно-ряба порода) характеризувались вищими надоями, а за *TLR1* – гетерозиготи мали більші надої в чорно-рябої породи та гомозиготи з генотипом GG в червоно-рябої. У свою чергу, для української червоно-рябої породи відмічено вплив алельних варіантів за *SacI*-поліморфізмом на показники вмісту молочного жиру, а для української чорно-рябої - на параметри вмісту білка в молоці (у кожному випадку перевага значень на боці гетерозиготних особин).

Підводячи підсумок описаного вище, можна зазначити, що вклад алеля кожного із досліджуваних генів може бути або загальним для різних порід, або породоспецифічним. За результатами проведених досліджень на дослідних популяціях корів української селекції загальний внесок здійснюють алелі фактора некрозу пухлин  $\alpha$ , манозозв'язувального лектину та інтерферону гама-рецептора 2. Тільки алельні варіанти локусу *TLR1* характеризуються породоспецифічними властивостями.

Таким чином, отримані результати досліджень вказують на те, що рівні продуктивності тварин чітко визначеної породи залежать від багатьох критеріїв, зокрема від генотипу матерів потомства, умов середовища

конкретного стада, племінної цінності родоначальника лінії тощо. Тому в умовах кожного окремого стада для формування високопродуктивного потомства в наступному поколінні потрібно визначати найбільш перспективні лінії, а також кращі варіанти поєднання батьків.

Крім того, отримані результати вказують на необхідність доповнення методів класичної селекції сучасними молекулярно-генетичними методами, які дозволяють підбирати тварин з потенційно перспективними генотипами за рядом різних локусів, що пов'язані з важливими господарсько-цінними ознаками великої рогатої худоби.

Матеріали досліджень більш детально викладено у наукових публікаціях [198–202].

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Протягом останніх років досягнення молекулярної біології дозволили впровадити нові методи у селекцію сільськогосподарських тварин. Вивчення механізмів формування генетичного різноманіття у корів, а саме визначення однонуклеотидних поліморфізмів у генах, що контролюють такі ознаки як молочна продуктивність, ріст та розвиток тварин, їх відтворювальні якості є потужним інструментом у вдосконаленні як порід взагалі, так і окремих популяцій великої рогатої худоби.

Розуміння особливостей генетичного складу племінних видів тварин можна віднести до одних з найважливіших завдань українського скотарства. Крім того, встановлення особливостей генетичної будови локальних порід корів української селекції є ключовою задачею для збереження генофонду, з огляду на деякі ризики, які можуть виникнути для вітчизняних порід у тваринництві. Зважаючи на це, першочерговим завданням є розширення спектру генетичних маркерів, які можна використовувати в селекційних програмах. Нещодавно проведено ряд досліджень за деяким комплексом генетичних маркерів та маркерних мутацій, локалізованих у генах-кандидатах (локусах кількісних ознак) відносно українських порід корів [200-204]. Разом з тим, перспективність використання ДНК-маркерів, пов'язаних з господарсько-цінними ознаками у великої рогатої худоби ґрунтується на поліморфізмі генів *TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2*, які досі практично не вивчалися в українських популяціях і породах корів [16-20].

У даній роботі вперше проведено комплексні дослідження, що включають вивчення поліморфізму локусів кількісних ознак у популяціях корів української селекції, в якій виявлено зв'язок господарсько корисних ознак ВРХ з поліморфними варіантами генів *TLR1* та *SLC11A1* з урахуванням породних особливостей тварин. Серед досліджуваних порід обрали українську чорно-рябу молочну породу, що відрізняється високим вмістом

жиру і білка в молоці, та українську червоно-рябу молочну – що характеризується високими надоями. У результаті досліджень встановлено, що частоти генотипів та алелів аналізованих генів зміщувалися залежно від породи або вибірки великої рогатої худоби. Для ефективного генотипування тварин дослідних популяцій за мікросателітними локусами проведено роботу з оптимізації техніки ДНК-типування.

За результатами проведених досліджень проаналізовано генетичну структуру порід вітчизняної селекції (українська чорно-ряба молочна, червоно-ряба молочна) за мутацією 1596G>A в гені толл-подібного рецептору 1, за мутаціями 7400C>G і 7808A>T в гені *SLC11A1*, в локусі *TNFA* (-824A>G), *MBL1* (2651G>A) та в гені інтерферону гамма-рецептора 2 (1008A>G). Встановлено, що всі дослідні популяції ВРХ поліморфні за вказаними мутаціями (дані 2022 року), крім гена *TLR4* (8732G>A; 8834G>C; 2021C>T), який виявився мономорфним. У цьому контексті мономорфність порід великої рогатої худоби української селекції за цим локусом потенційно відображає загальні тенденції племінної роботи у тваринництві. Що стосується *RsaI*-поліморфізму (8834G>C), наше дослідження узгоджується з результатами, отриманими Elmaghraby зі співавторами, які також підтвердили мономорфність локусу за цією мутацією [205]. Крім того, за іншим SNP (+10) локус *TLR4* теж виявився мономорфним у турецьких місцевих порід ВРХ, а також у голштинів і метисів [193, 206]. На противагу цим дослідженням, в інших роботах, навпаки, встановлено, що ген *TLR4* є поліморфним серед порід великої рогатої худоби та його експресія асоційована з чутливістю до інтрамамарної інфекції та високим рівнем молочної продуктивності [207, 208].

На відміну від гена *TLR4* дослідні популяції ВРХ продемонстрували зовсім іншу ситуацію для гена *TLR1*, а саме високий рівень поліморфізму як для чорно-рябої молочної породи, так і для червоно-рябої. За *VclI*-поліморфізмом першого екзону локусу толл-подібного рецептора 1 визначено алельні варіанти А і G в кожній з дослідних популяцій корів. Для



кожної популяції відмічено превалювання частоти алелю G (0,56 – чорно-ряба порода; 0,6 – червоно-ряба), що є більш вираженим у випадку з червоно-рябою молочною породою. Отримані дані корелюють з результатами, що одержані на популяціях великої рогатої худоби, зокрема на комерційних породах. Так, превалювання частоти алелю G відмічено в популяціях голштинських корів (0,81), турецьких породах ВРХ (0,73; 0,71) [193] та китайських голштинських [35]. Також в цих порід, як і в наших дослідних популяціях найбільш розповсюдженим є гетерозиготний генотип AG. З нашої точки зору, домінування частоти алелю G в дослідних популяціях, у голштинів та переважної більшості інших порід ВРХ пов'язано із загальною спрямованістю племінної роботи у напрямку підвищення параметрів молочної продуктивності тварин.

У той же час, за маркером 7808A>T у локусі *SLC11A1*, у двох дослідних популяціях з найвищою частотою зустрічається генотип AA (0,83 – в червоно-рябої; 0,68 – в чорно-рябої) і алель A (0,92 – в червоно-рябої; 0,83 – в чорно-рябої), відповідно. Зате рівень поліморфності, так само як і рівні фактичної та очікуваної гетерозиготності вищі в популяції корів породи української чорно-рябої молочної.

За поліморфізмом локусу *SLC11A1* спостерігається наступна ситуація. За літературними даними частота розповсюдженості алелів A і T гена *SLC11A1* серед різних порід молочного напрямку ВРХ знаходиться майже в однакових межах. При порівнянні отриманих даних з результатами інших досліджень, присвячених дослідженню поліморфізму гена *SLC11A1* за мутацією 7808A>T, можна відмітити, що стосовно даного маркеру теж спостерігається переважання алеля A над T [17]. Аналіз поліморфізму гена *SLC11A1* значно відрізнявся від інших маркерів, які вивчалися, через складнішу технічну процедуру, оскільки в цьому випадку генотипування проводилось одночасно для двох мутацій (7400C>G; 7808A>T). Різні варіанти алелів знайдені для обох SNP (SNP5 і SNP6) у кожній досліджуваній популяції великої рогатої худоби. У всіх випадках зафіксовано превалювання

частот алелів С і А для SNP5 і SNP6 відповідно. Частоти мутантних алелів G і T знаходились в межах 0,08–0,21, що опосередковано свідчить про відносно високий рівень можливих функціональних змін у досліджуваному гені.

За результатами проведених досліджень стосовно SacI-поліморфізму промоторного фрагменту гена фактора некрозу пухлини  $\alpha$  встановлено суттєве переважання частоти алелю G, в той час як для чорно-рябих корів – виявлені паритетні значення частот алелів. Крім того, як в нашому дослідженні, так і в роботі Vimenova зі співавторами [127], для всіх трьох генетичних варіантів існує невідповідність між фактичним розподілом генотипів і теоретично очікуваним, а також спостерігається надмірна частота гетерозиготного генотипу AG і дефіцит гомозигот GG та AA. Аналогічні результати отримані зарубіжними авторами – розподіл генетичних варіантів промоторної ділянки гена *TNF $\alpha$*  у японських молочних корів становив: AA – 36 (16 %); AG – 108 (48 %); GG – 80 (36 %) осіб [126]. Дослідження поліморфізму SNP промоторної частини гена *TNF $\alpha$*  в позиції 824 A→G у корів голштинської породи в Польщі показує більш рівномірний розподіл генотипів: AA – 26 % ; AG – 37,8 %; GG – 36,2 %, однак, в усіх випадках переважають гетерозиготи [209]. Натомість червона степова порода характеризується наступним співвідношенням генотипів G/G, G/A, A/A – 56, 38 і 6 %, яке різко відрізняється від усіх вище зазначених порід за даною мутацією [128].

При порівнянні отриманих результатів з літературними даними відмічається значна схожість генетичної структури досліджуваних популяцій корів та голштинських корів канадської селекції за локусом *TNF $\alpha$*  [127]. В обох випадках відзначається високий рівень гетерозиготності і майже паритетні частоти алелів A і G за мутацією -824A/G. Результати досліджень, що проведені на популяції чорно-рябих молочних корів, підтверджують дані, отримані іншими дослідниками на популяціях польських локальних порід – ідентичні значення частот алелів A і G (0,5) [121]. З іншого боку, в популяції польських голштино-фризьких корів встановлено незначне переважання

частоти алелю А (0,56) [122], так само як і в популяції української сірої породи (0,52) [18], натомість для чорно-рябих корів Новосибірського регіону та аборигенного якутського поголів'я – виявлено домінування алелю G (0,58; 0,77) [18]. Ці значення узгоджуються з раніше отриманими даними для японської чорної та голштино-фризької порід великої рогатої худоби (0,52) [119]. Різницю в частоті алелів G між породами можна пояснити генетичним дрейфом і ефектом засновника, оскільки ефективний розмір популяції під час розвитку породи зазвичай невеликий.

Виявлення різних алельних варіантів гена манозозв'язувального лектину за StyI-поліморфізмом у другому екзоні дозволило вперше в Україні виявити особливості генетичної структури популяцій корів молочних порід за мутацією 2651G>A. За результатами досліджень встановлено превалювання частоти алелю А в обох дослідних популяціях тварин. Значне переважання кількості гетерозигот та зменшення гомозигот в українській червоно-рябої породи призвело до відхилення від стану генетичної рівноваги, що, у свою чергу, свідчить про певний тиск добору або вплив мікроеволюційних процесів. На відміну від отриманих нами результатів, на прикладі індійських локальних порід (Хардхену – G=0,54; Сахівал – G=0,9; Мурра – G=0,62) показано превалювання значення алелю G [19]. Yuan зі співавторами [141] також повідомили про подібний розподіл алелів у популяціях голштинських (0,66), симентальських (0,62) та корів породи Sanhe (0,54). Крім того, на низці китайських локальних/аборигенних порід ВРХ також продемонстровано домінування алелю G: китайська гоштинська – 0,61; порода Luxi Yellow – 0,76; Бохайська чорна худоба – 0,75 [130]. Отримані результати досліджень можна інтерпретувати впливом генного оточення, яке є різним у дослідних популяціях через вплив породної належності, особливостей походження тварин тощо. Отже, ефект впливу генотипу на ознаку можна значно скоректувати та отримати виражений породоспецифічний характер.

За локусом інтерферону гамма-рецептора 2 за мутацією 1008A>G в

обох дослідних популяціях корів встановлено значне переважання частоти алелю А, причому переважаючим генотипом є АG з практично однаковою частотою (0,51 проти 0,53). В популяції української червоно-рябої породи генотип GG виявився відсутнім, тоді як його частка в чорно-рябої досить мала – 0,102. На момент дослідження у стані генетичної рівноваги знаходилась тільки чорно-ряба порода, яка демонструє максимальний рівень поліморфності та середній рівень гетерозиготності. В той же час, в української червоно-рябої спостерігається нижчий рівень поліморфності і гетерозиготності, зумовлений відсутністю гомозигот GG.

При порівнянні отриманих результатів з літературними даними відмічається значна схожість генетичної структури обох дослідних популяцій корів за локусом *IFNGR2* [163]. В всіх випадках спостерігається середній рівень гетерозиготності та істотне переважання частоти алеля А за мутацією 1008A>G. Крім того, як і в нашому дослідженні, на прикладі індійської ВРХ показано, що найвищими частотами характеризуються гетерозиготи АG, в той час як гомозиготи GG практично відсутні.

Одержані нами результати узгоджуються з результатами досліджень Bhaladhare і Prakash зі співавторами, що проведені на популяціях великої рогатої худоби з Шрі Матаджі Гаушала (Індія), в яких відмічено превалювання частоти алелю А (0,69; 0,54) [163, 210]. В дослідженнях Pant в співавторстві та Verschoor [21, 164] також показано домінування частоти алелю А (0,79; 0,75) в популяціях голштинської породи корів. В цілому, домінування частоти алелю А є характерним для локальних/аборигенних порід корів різних країн.

Для усіх локусів характерним є ексцес гетерозигот, який вказує на можливий аутбридинг в досліджуваних стадах корів. Середні значення показника  $F_{is}$  становили 28,7 % і 23,2 % для червоно-рябої та чорно-рябої порід відповідно. Максимальні значення дефіциту гомозигот відзначено для локусу *TNFA* (32 %) в популяції чорно-рябої породи та *MBL1* (55 %) – в популяції червоно-рябої.

У випадку показника ефективного числа алелів, найвищий рівень поліморфності, який відповідає максимальному значенню показника для двоалельної системи притаманний популяції української чорно-рябої породи за локусом *TNF $\alpha$* . Крім того, високі значення  $n_e$  характерні і для червоно-рябої молочної породи за локусами *TLR1* та *MBL1*. Проте в гені *SLC11A1* за обома маркерними мутаціями спостерігається протилежна ситуація за даним показником: в чорно-рябої породи його значення становить 1,39, в червоно-рябої –1,49. Середнє значення  $n_e$  в популяції чорно-рябої породи за п'ятьма мутаціями становить 1,74; для червоно-рябої величина дещо нижча і перебуває на рівні 1,68.

Що стосується асоціацій виявлених генотипів за локусами *TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2* з господарсько-корисними ознаками і показниками продуктивності, потрібно зазначити, що серед різних порід молочного типу великої рогатої худоби, а також в різних групах однієї породи спостерігаються певні відмінності у взаємозв'язку алелів досліджуваних генів з молочною продуктивністю корів.

В результаті дослідження асоціативного зв'язку генотипів за мутацією 1596G>A у гені *TLR1* з показниками надою за 305 днів встановлено, що в української чорно-рябої породи за першу лактацію вищі значення показника пов'язані з гетерозиготним генотипом AG, тоді як для третьої лактації, навпаки, гомозиготні особини AA мають вище значення надою. За показниками молочної продуктивності вірогідних відмінностей між тваринами з різними генотипами за даним локусом не виявлено. Характер встановлених асоціацій свідчить про породоспецифічність мутації 1596G>A як маркера молочної продуктивності корів.

Необхідно зазначити, що в більшості досліджень приділено увагу зв'язку між поліморфізмом генів *TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1*, *IFNGR2* та стійкістю/чутливістю до різних інфекційних захворювань, на відміну від аналізу, проведеного нами, що охоплює параметри молочної продуктивності тварин. Різні дослідження показують, що гени родини TLR пов'язані з

вродженою імунною відповіддю у різних видів худоби [38, 211]. Тому інтерес до розведення тварин, які будуть стійкими до поширених інфекційних захворювань, за використання генів TLR надзвичайно зріс протягом останніх років [212].

Так, в голштино-фризької породи відмічається асоціативний зв'язок між різними SNP у локусі *TLR1*, зниженим рівнем клінічного маститу (КМ) із підвищеним вмістом жиру та білка в молоці [81]. Крім того, на відміну від наших результатів, за даними Russell зі співавторами, генотипи AA та AG, продемонстрували нижчу концентрацію молочного жиру та білка, однак, ці відмінності не були статистично значущими. Жодних відмінностей ні в надоях, ні в середньому значенні кількості соматичних клітин (КСК) між жодною з описаних популяцій не виявлено. Ці результати суперечать дослідженню, проведеному на китайській голштинській популяції, в якому мутація +1762A>G асоціювалася зі значними відмінностями в КСК в молоці. Гомозиготи AA характеризувалися нижчим значенням КСК, що пояснювало їх вищу стійкість до маститу [213]. Охарактеризований в цих дослідженнях позитивний зв'язок зниженого рівня захворюваності на клінічний мастит у локусі *TLR1* із підвищеною концентрацією молочного жиру та білка вказує на те, що відбір тварин за використання цих маркерів зможе сприяти підвищенню якості молока.

У дослідженнях Vjelka та співавторів [214], виконаних на племінних високопродуктивних коровах чеської червоної породи, доведена асоціація синонімічного поліморфізму 798 C>T *TLR1* з репродуктивними та фізичними ознаками корів, а саме зв'язку із легкістю отелення та тривалістю продуктивності, хоча в іншому дослідженні тест показав негативний результат щодо чутливості до туберкульозу ВРХ [35]. З іншого боку, для мутації 1762 G>A також характерна асоціація із продуктивним довголіттям та, в той же час, підвищена сприйнятливість до туберкульозу в голштинської породи для генотипів AA та AG [35].

За результатами аналізу продуктивних ознак корів породи українська

червоно-ряба молочна залежно від генотипу за мутаціями 7400C>G і 7808A>T у локусі *SLC11A1* встановлено статистично вірогідні зв'язки між генотипами та параметрами продуктивності ВРХ, зокрема надоем. Крім того, літературні дані свідчать про наявність асоціацій даного маркеру з поширеними інфекційними захворюваннями, такими як туберкульоз і паратуберкульоз чи бруцельоз [17, 99]. Зокрема, результати, отримані Canive зі співавторами, показали позитивний зв'язок між високим ризиком клінічного туберкульозу в голштинської породи (Іспанія) та високим індексом племінної цінності для більшості ознак, включених до іспанського об'єднаного генетичного індексу [215]. Інші вчені теж встановили зв'язок поліморфізму гена *SLC11A1* з толерантністю/сприйнятливістю до туберкульозу великої рогатої худоби [99, 103].

Відомо, що інтенсивний відбір високопродуктивних тварин, з обмеженим акцентом на показниках здоров'я та довголіття, збільшує появу таких проблем зі здоров'ям, як мастит, молочна лихоманка, затримка оболонки плода та шлунково-кишкові захворювання під час післяпологового періоду [216]. Pritchard зі співавторами показали [217], що високопродуктивні особини частіше хворіють на мастит, що супроводжується вищим показником КСК, вищою частотою кульгавості, збільшенням інтервалу отелення тощо. Як наслідок, стійкість до різних хвороб також можна розглядати в якості ознак продуктивності корів, оскільки висока резистентність до інфекцій свідчить про оптимальні показники здоров'я тварин, що в перспективі дозволить отримати великий вихід молока. Так, науковці в результаті секвенування виявили нову мутацію g.1139 C>G в 11 екзоні гена *SLC11A1* в голштинської породи (Іран), яка мала достовірний зв'язок досліджуваних генотипів із клінічним маститом ( $P < 0,05$ ), що є ще одним доказом вважати ген *SLC11A1* досить цінним геном-кандидатом для покращення стійкості до маститу і продуктивних ознак у популяціях молочної худоби [89]. Ateya та співавтори [218] також вивчали однонуклеотидні поліморфізми та експресію генів, пов'язаних із

сприйнятливостю до маститу на прикладі молочних корів голштинської та бурої швіцької породи, і прийшли до висновку, що варіації нуклеотидної послідовності у формі SNP, пов'язані з толерантністю/сприйнятливостю до маститу у досліджених молочних корів. Натомість, Zhang зі співавторами [91] виявили, що поліморфізм гена *SLC11A1* не пов'язаний із вмістом соматичних клітин і молочного надюю у китайської голштинської породи.

В результаті дослідження асоціацій генотипів за SacI-поліморфізмом у гені *TNF $\alpha$*  з молочною продуктивністю корів встановлено, що найвищий надій за 305 днів за дві лактації виявлено у особин з гетерозиготним генотипом AG і в чорно-рябої породи, і в червоно-рябої, а за третю лактацію максимальний надій зафіксовано у тварин з генотипом AA (чорно-ряба порода), тоді як в червоно-рябої знову в гетерозигот AG ( $p < 0,05$ ). При порівнянні отриманих результатів з дослідженнями інших вчених потрібно враховувати той факт, що в науковій літературі зустрічаються дані про асоціації генотипів за *TNF $\alpha$*  із стійкістю/чутливістю до інфекційних захворювань. Зокрема, доведено, що в популяціях корів голштино-фризької і японської чорної позитивний ефект на стійкість до вірусу лейкемії корів (BLV – Bovine leukemia virus) загалом проявляє гетерозиготний генотип за мутацією -824A/G, тобто SNP (однонуклеотидний поліморфізм) в положенні -824A>G гена *TNF $\alpha$*  (промоторна область) може відігравати важливу роль у патогенезі ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби (EBL), який порушує проліферацію та диференціювання В-лімфоцитів [129]. В роботах Wojarojć-Nosowicz [120, 121] також було підтверджено ці дані – результати показали, що поліморфізм гена *TNF $\alpha$*  -824 A>G та експресія білка mTNF $\alpha$  відіграють важливу роль у патогенезі ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби. Генетична рівновага в цих стадах зберігалася, але спостерігалася тенденція до збільшення частоти G/G гомозигот. Генетична структура здорового стада значно відрізнялася від генетичної структури лейкозного стада. Результати індійських вчених продемонстрували, що в групах чутливих до маститу корів, генотипи AA мають вищу експресію мРНК *TNF $\alpha$* ,



ніж АВ та ВВ. Припускають, що *TNF $\alpha$*  відіграє певну роль в змінах складу білка молока під час зараження маститом [123]. Тобто більш високий рівень мРНК *TNF $\alpha$*  може виявитися вигідним в системі захисту молочної залози від інфекцій [124]. Тому генотипи АВ і ВВ можуть бути використані як маркери-кандидати для відбору стійкості до маститу у молочної худоби.

Проведено аналіз асоціацій виявлених генотипів за локусом манозозв'язувального лектину з показниками продуктивності дослідних популяцій ВРХ. В результаті дослідження асоціацій генотипів за мутацією 2651G>А у гені *MBL1* з надоем за 305 днів лактації встановлено, що в української чорно-рябої та червоно-рябої порід вищі значення показнику пов'язані з генотипом GG ( $p < 0,05$ ) для першої та третьої лактацій, тоді як для другої лактації найбільше значення надою відмічено для гетерозигот AG в популяції чорно-рябої породи, а в червоно-рябої – для гомозигот AA. Через це характер виявлених асоціацій не може точно вказувати на породоспецифічність мутації 2651G>А як маркера молочної продуктивності корів.

При цьому необхідно відмітити, що в більшості досліджень основну увагу приділено поліморфізму гена манозозв'язувального лектину та його зв'язку із КСК в молоці великої рогатої худоби, оскільки в промоторній області він містить локус кількісних ознак (QTL), який впливає на кількість соматичних клітин, на відміну від аналізу, проведеного нами, який охоплює зв'язок поліморфізму гена з основними показниками молочної продуктивності (надій, жир, білок) [130, 140].

При порівнянні отриманих результатів з літературними даними встановлено факт, що в популяціях корів китайської селекції, як і в нашому дослідженні, позитивний ефект стійкості до маститу проявляє генотип GG за мутацією c.2534G>А [141]. Слід відмітити, що в іншому дослідженні статистичний аналіз не виявив кореляції між g.855G>А, g.2686T>С та кількістю соматичних клітин, проте знайдено достовірний зв'язок між g.2651G>А та КСК, що свідчить про можливу роль цього SNP у

резистентності до маститу [140]. Крім того, дані попереднього дослідження свідчать про те, що комбіновані генотипи GGC/AAC з найнижчим вмістом соматичних клітин, AAT/AAT з найбільшим вмістом білка та AGC/AGC з найвищим надоем молока за 305 днів виявилися сприятливими комбінаціями для ознак молочної продуктивності та стійкості до маститу. Тому генотипи GGC/AAC, AAT/AAT та AGC/AGC можуть бути використані як можливі кандидати для маркерної селекції у програмі молочного скотарства [140]. На прикладі молочної худоби та буйволів Індії, як і в дослідженні китайських вчених, тварини з генотипом GG виявилися менш сприйнятливими до клінічного маститу та характеризувалися порівняно нижчим показником соматичних клітин у великої рогатої худоби Hardhenu ( $P < 0,01$ ) і буйволів Murrah ( $P < 0,05$ ) [19]. Також для тварин з генотипом GG властивий значно нижчий ( $P < 0,05$ ) вік першого отелення. Буйволи Murrah з генотипом AG показали значно вищі надой молока за другу лактацію ( $P < 0,01$ ), що корелює з нашими результатами для популяції чорно-рябої породи.

Таким чином, ген *MBL1* можна розглядати як потенційний ген-кандидат, що впливає на КСК в молоці, а також продуктивність і репродуктивні властивості корів, проте його застосування в програмах розведення обмежене, оскільки досі не перевірено на великих розмірах вибірки різних порід. Такі вдосконалення не тільки підвищать прибутковість промислових підприємств, а й сприятимуть збільшенню обсягів органічного молочного виробництва завдяки мінімізації використання антибіотиків.

Поліморфізм локусу *IFNGR2* у популяціях корів різних порід та напрямів продуктивності досить мало вивчений. Як правило, дослідження даного гена спрямовані на визначення параметрів резистентності/чутливості до різних інфекційних захворювань ВРХ, при цьому наукових праць щодо асоціацій з показниками продуктивності практично не знайдено. Зокрема, в роботі Bhaladhare зі співавторами [148] встановлено, що поліморфізм rs109049057 *IFNGR2* має достовірний зв'язок ( $p < 0,01$ ) з чутливістю до туберкульозу великої рогатої худоби в контрольній популяції, причому SNP

виявився несинонімічним, що свідчить про його функціональну роль в імунній відповіді проти туберкульозу ВРХ. У дослідженні Rosenzweig [152], також встановлено асоціативний зв'язок між мікобактеріальною інфекцією та алельними варіантами генів родини *IFN-γRs*. Крім того, мутантні варіанти частіше зустрічаються в локусі *IFN-γR1*, ніж в *IFN-γR2*. Авторами продемонстровано, що мутація +874A/T в гені *IFN-γ* асоційована з параметрами чутливості/резистентності до туберкульозу [153]. Крім встановлених асоціативних зв'язків з інфекцією, спричиненою мікобактеріями, в ряді досліджень згадується про асоціацію з бруцельозом [163, 219]. Так, в наведених роботах у тварин, уражених бруцельозом, сайти SNP в генах *IFNG* (-639 T/C), *IFNG* (+432G/A) та *IFNGR1* (+132G/T) не пов'язані з проявом клінічних ознак інфекції у молочної худоби. Крім того, вченими виявлено незначущі асоціації між SNP генів цитокінів (*IFNG* -639 T/C; *IFNG* +432 G/A; *IFNGR1* +132 G/T; *IFNGR1* +523 A/G), кількістю соматичних клітин та стійкістю лактації [164].

Асоціації алельних варіантів гена *SLC11A1* за мутаціями 7400C>G і 7808A>T та *IFNGR2* за мутацією 1008A>G з показниками продуктивних якостей корів на прикладі української чорно-рябої та червоно-рябої молочної порід виявлено вперше. Хоча дані мутації не призводять до заміни амінокислот в послідовності цих генів, вони розташовані в межах їх функціональної частини (3'-untranslated region), що дає змогу зробити припущення щодо ймовірного впливу на їх експресію. Таким чином, проведені дослідження дають право розглядати мутації 7400C>G і 7808A>T в гені *SLC11A1* та 1008A>G в локусі *IFNGR2* як маркери молочної продуктивності.

Підсумовуючи отримані результати, найбільш виразний підвищуючий ефект показника надою за 305 днів за першу лактацію для корів української чорно-рябої породи за геном *TLR1* мав гетерозиготний генотип AG, для червоно-рябої – гомозиготний GG. В той же час, у розрізі третьої лактації в популяції чорно-рябої породи гомозиготність AA супроводжувалась вищими

надоями, в червоно-рябої, на противагу, максимальні значення показника так само як і для першої лактації мали гомозиготні особини з алелем G. Ситуація за локусом *SLC11A1* істотно відрізнялася, оскільки в ньому досліджено дві мутації, які формують три гаплотипи з можливих дев'яти. У випадку даного гену виявлено позитивний вплив гаплотипу CG-AA на значення стандартного надою впродовж всіх трьох лактацій. При цьому різниця виявилась вірогідною на рівні  $p < 0,05$ . Натомість жодних істотних зв'язків між поліморфізмами *TLR1* (1596G>A) і *SLC11A1* (7400C>G; 7808A>T) та показниками молочної продуктивності (вміст жиру і білка) в обох досліджуваних порід не виявлено.

Проведені дослідження з аналізу асоціативних зв'язків між виявленими генотипами за досліджуваними мутаціями і показниками продуктивності ВРХ довели перспективність використання генів *TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2* в якості маркерів продуктивних ознак корів, зокрема і для українського генотипу. Однак, ця задача потребує подальшого вивчення впливу генотипів за обраними локусами як на вміст складових молока, так і на його технологічні властивості, із включенням значно більшої кількості дослідних особин.

На основі даних стосовно асоціацій виявленого поліморфізму генів рецепторного білка A1, фактора некрозу пухлини  $\alpha$  та гамма-рецептора інтерферону 2 з показниками молочної продуктивності корів сформовано перспективні генотипи для корів дослідних порід.

Формула бажаних генотипів для популяції корів української червоно-рябої молочної породи у напрямку збільшення значень параметрів надою за 305 діб лактації:

$$SLC11A1^{CG}SLC11A1^{AA} TNF\alpha^{AG} IFNGR2^{AG}.$$

Для корів української чорно-рябої молочної породи найбільш перспективними для дослідження є локуси фактора некрозу пухлини альфа та гамма-рецептора інтерферону 2. Кількість перспективних локусів дещо менша порівняно з червоно-рябою молочною породою, що визначається як

особливостями генетичної структури популяцій ВРХ, так і впливом породних факторів та загальної історії походження та спрямованості селекційної роботи, що проводилася на дослідному поголів'ї тварин.

Формула бажаних генотипів для популяції корів української чорно-рябої молочної породи за збільшенням значення параметрів надою:

$$TNF\alpha^{AA} IFNGR2^{GG}.$$

Ідентифікація генетичних варіантів генів, які розглядаються в даній роботі, що впливають на параметри молочної продуктивності, має ключове значення для розуміння генетичних механізмів, що лежать в основі фенотипових змін, а також підвищення результативності розмноження. Геномна селекція широко використовується в молочному скотарстві та вносить вагомні зміни до системи відбору. Однак, отримання більш ґрунтовних знань щодо впливу генетичної структури на продуктивні ознаки є достатньо важливим завданням, через те що, це дійсно може призвести до нового розуміння молекулярної генетики значущих фенотипів та відкриє нові можливості для більш ефективної стратегії розмноження [220].

Таким чином, дослідження ДНК-поліморфізму генів толл-подібного рецептору 1, рецепторного білка A1, фактора некрозу пухлин  $\alpha$ , манозозв'язувального лектину 1 і гамма-рецептора 2 інтерферону за перспективними маркерними мутаціями дозволило виявити ідентифікаційні алелі у внутрішньопородних групах української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід, які можуть бути використані у практичній селекції великої рогатої худоби для подальшого їх удосконалення та підвищення рівня молочної продуктивності. Це, в свою чергу, дасть змогу поповнити дані щодо молекулярно-генетичних характеристик українського генофонду ВРХ, а також визначити ймовірність залучення досліджених маркерних мутацій для проведення маркер-асоційованої селекції у напрямку поліпшення тих чи інших господарсько цінних ознак корів.

В результаті проведеного аналізу асоціативних зв'язків виявлених генотипів за маркерними мутаціями з показниками молочної продуктивності

корів встановлено вірогідну кореляцію між певними алелями та показниками молочного надою корів української чорно-рябої та червоно-рябої порід. При цьому продемонстровано породоспецифічність обраних молекулярно-генетичних маркерів, що свідчить про неоднаковий їхній вплив на прояв ознак молочної продуктивності в межах різних молочних порід великої рогатої худоби. Міжпородні особливості генетичної структури порід молочного напрямку продуктивності за поліморфізмами генів *TLR1* і *SLC11A1* можуть бути використані в якості додаткових критеріїв оцінки генетичної мінливості і відбору бажаних генотипів у селекційній роботі в молочному скотарстві. Разом з тим, між тваринами різних генотипів в двох популяціях за обома досліджуваними локусами встановлено статистично незначущу різницю за якісними параметрами молока. За вмістом жиру та білка в молоці тварини всіх генотипів відповідали стандарту породи. Звідси випливає, що формування стад корів з виявленими комплексними генотипами *TNF $\alpha$ <sup>AA</sup>* та *IFNGR2<sup>GG</sup>* для української чорно-рябої породи і *SLC11A1<sup>CG</sup>SLC11A1<sup>AA</sup>*, *TNF $\alpha$ <sup>AG</sup>* та *IFNGR2<sup>AG</sup>* для української червоно-рябої, ймовірно не будуть мати негативного достовірного впливу на продуктивні ознаки ВРХ, що тим самим дозволить зберегти параметри молочної продуктивності на достатньо високому рівні в стадах корів нового типу.

Отже, практичне втілення MAS племінних українських порід корів готує сприятливе підґрунтя для проведення подальшої роботи, яка буде базуватися на застосуванні характерних особливостей організації спадкового матеріалу корів вітчизняного генофонду, задля створення конкурентоспроможних та високопродуктивних порід великої рогатої худоби.

## ВИСНОВКИ

1. Проведено дослідження поліморфізму генів толл-подібного рецептору 1 (*TLR1*), толл-подібного рецептору 4 (*TLR4*), мембранного білка A1 (*SLC11A1*), фактора некрозу пухлини  $\alpha$  (*TNF $\alpha$* ), манозозв'язувального лектину 1 (*MBL1*) та гамма-рецептора інтерферону 2 (*IFNGR2*) та визначено параметри продуктивності корів різних порід української селекції молочного напрямку продуктивності з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами

2. За використання методів біоінформатики оптимізовано протоколи полімеразної ланцюгової реакції для ампліфікації дослідних фрагментів генів *TLR1*, *SLC11A1*, *TNF $\alpha$* , *MBL1* та *IFNGR2*.

3. Виявлено поліморфізм локусів толл-подібного рецептору 1 (1596G>A), мембранного білка A1 (7400C>G, 7808A>T), фактора некрозу пухлини  $\alpha$  (-824A>G), манозозв'язувального лектину 1(2651G>A) та гамма-рецептора інтерферону 2 (1008A>G) у популяціях корів українська чорно-ряба та червоно-ряба молочних порід. За локусом *TLR1* частота алеля А складає: в чорно-рябої породи – 0,44; в червоно-рябої – 0,40 відповідно. Частота алеля С за 7400C>G (*SLC11A1*) становить 0,83 в чорно-рябої породи; 0,79 в червоно-рябої, тоді як за 7808A>T (*SLC11A1*) частота алеля А складає 0,84 в чорно-рябої; 0,92 в червоно-рябої. За локусом *TNF $\alpha$*  частота алеля А дорівнює: в чорно-рябої породи – 0,5; в червоно-рябої – 0,39. За геном *MBL1* частота алеля А становить: в чорно-рябої породи – 0,63; в червоно-рябої – 0,51. Частота алеля А за 1008A>G (*IFNGR2*) складає 0,65 в чорно-рябої породи; 0,74 в червоно-рябої відповідно.

4. З'ясовано, що локус толл-подібного рецептору 4 (*TLR4*) за *MspI*-поліморфізмом (8732G>A), *RsaI*-поліморфізмом (8834G>C) та *BsiHKA1*-поліморфізмом (2021C>T) у третьому екзоні є мономорфним у всіх дослідних популяціях корів.

5. Визначено, що за поліморфізмом генів *SLC11A1* (7808A>T), *MBL1*

та *IFNGR2* в корів чорно-рябої молочної породи та за поліморфізмом *TLR1*, *SLC11A1* (7808A>T) і *TNF $\alpha$*  в корів червоно-рябої відсутній спрямований селекційний тиск.

6. Встановлено відхилення від стану генетичної рівноваги в корів чорно-рябої молочної породи за локусами *TLR1*, *SLC11A1* (7400C>G), *TNF $\alpha$* ; в популяції корів червоно-рябої – за *SLC11A1* (7400C>G), *MBL1* та *IFNGR2*.

7. Визначено показники молочної продуктивності корів української червоно-рябої породи за маркерними мутаціями 7400C>G і 7808A>T, які утворюють гаплотипи CC-AA, CG-AA і CG-AT у локусі *SLC11A1*. Найвищими значеннями впродовж всіх трьох лактацій характеризуються тварини з гаплотипом CG-AA ( $p < 0,05$ ).

8. За мутацією -824A>G в локусі *TNF $\alpha$*  встановлено статистично достовірну різницю між особинами з різними генотипами за показниками молочної продуктивності: надою за третю лактацію (AA > GG, AG > GG,  $p < 0,05$ ) і вмісту білка за першу лактацію (AG > GG,  $p < 0,05$ ) у корів породи українська чорно-ряба молочна; надою за третю лактацію (AG > GG,  $p < 0,05$ ) у корів української червоно-рябої породи.

9. За мутацією 1008A>G у локусі *IFNGR2* за значеннями надою виявлено вірогідні відмінності між особинами з різними генотипами (AA < AG та AA < GG,  $p < 0,05$ ) у корів обох дослідних порід. Найвищий показник надою для української чорно-рябої характерний для особин з генотипом GG, для української червоно-рябої – для тварин з гетерозиготним генотипом AG.

10. Розроблено формули бажаних генотипів, перспективних у напрямку підвищення молочної продуктивності за генами фактора некрозу пухлини  $\alpha$  та гамма-рецептора інтерферону 2 для породи українська чорно-ряба молочна та за генами *SLC11A1*, *TNF $\alpha$*  та *IFNGR2* для української червоно-рябої молочної породи.



## ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. З метою покращення показників молочної продуктивності популяції корів української чорно-рябої молочної породи в системі маркерної оцінки вітчизняних порід корів рекомендовано використовувати комплексний генотип  $TNF\alpha^{AA} IFN\alpha^{GG}$ .

2. З метою поліпшення показників молочної продуктивності популяції корів української червоно-рябої молочної породи в системі маркерної оцінки вітчизняних порід корів доцільно використовувати комплексний генотип  $SLC11A1^{CG} SLC11A1^{AA} TNF\alpha^{AG} IFN\alpha^{AG}$ .

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Копилов К. В. Поліморфізм генів асоційованих з господарсько корисними ознаками (QTL) у різних порід великої рогатої худоби. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2010. Т. 12, № 3 (45). С. 52–58.
2. Кулібаба Р.О. Теоретичне обґрунтування та практична реалізація маркер-асоційованої селекції українських локальних порід курей : монографія / Р.О. Кулібаба. Київ : НУБіП України, 2021. - 330 с. ISBN 978-617-7878-71-0.
3. Рубан С. Ю., Федота О. М. Напрями організації селекційної роботи в молочному та м'ясному скотарстві України. *Розведення і генетика тварин*. 2013. Вип. 47. С. 5–13.
4. Suprovich T. M., Kopylov K. V. Determination of DNA markers in susceptible and resistant to mastitis cows Ukrainian black and white dairy cattle. *Animal Breeding and Genetics*. 2014. No. 48. P. 214–223. (in Ukrainian)
5. Почерняев К. Ф., Ломако Д. В. Генетичне різноманіття мітохондріальних геномів свиней великої чорної породи. *Свинарство*. 2012. Вип. 61. С. 46–51.
6. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Том 17. №4/2. С. 1044-1053.
7. Hill R., Canal A., Bondioli K., Morell R., Garcia M. D. Molecular markers located on the DGAT1, CAST, and LEPR genes and their associations with milk production and fertility traits in Holstein cattle. *Genetics and molecular research*. 2016. Vol. 15. P. 1–8. doi.org/10.4238/gmr.15017794.
8. Williams J. L. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Revue scientifique et technique (International*

*Office of Epizootics*). 2005. №24 (1). P. 379–391.

9. Чесноков Ю. В. Молекулярно-генетические маркеры и их использование в предселекционных исследованиях. СПб.: АФИ, 2013. 116 с.

10. Метлицька О. І., Копилов К. В., Березовський О. В. Сучасні молекулярно-генетичні підходи для підвищення ефективності селекційного процесу в тваринництві України. *Розведення і генетика тварин*. 2016. №51. С. 193–200.

11. Алтухов Ю. П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике. *Генетика*. 2002. Т.38, №9. С.1173-1195.

12. Метлицька О. І. Методологія ДНК-паспортизації генофондів сільськогосподарських тварин за гіперваріабельними локусами геному: дис. ... д-ра с.-г. наук: 03.00.15 / Ін-т розведення і генетики тварин НААН, Чубинське, 2012. 376 с.

13. Глазко В. И. Молекулярная биология для животноводства. *Farm Animals*. 2012. №1 (1). С. 24-29.

14. Li Y. C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 2002. Vol. 11 (12). P. 2453–2465. doi:10.1046/j.1365-294x.2002.01643.x.

15. Ladyka V. I., Khmelnychiy L. M., Lyashenko Y. V., Kulibaba R. O. Analysis of the genetic structure of a population of Lebedyn cattle by microsatellite markers. 2019. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. Vol. 10(1). P. 45-49.

16. Novák K., Bjelka M., Samake K., Valčíková T. Potential of *TLR*-gene diversity in Czech indigenous cattle for resistance breeding as revealed by hybrid sequencing. *Archives animal breeding*. 2019. Vol. 62(2). P. 477-490. doi: 10.5194/aab-62-477-2019.

17. Liu K., Zhang B., Teng Z., Wang Y., Dong G., Xu C., Qin B., Song C., Chai J., Li Y., Shi X., Shu X., Zhang Y. Association between

SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Chinese Holstein cattle. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2017. Vol. 103. P. 10-15. doi: 10.1016/j.tube.2016.11.003.

18. Yudin N. S., Aitnazarov R. B., Voevoda M. I., Gerlinskaya L. A., Moshkin M. P. Association of polymorphism harbored by tumor necrosis factor alpha gene and sex of calf with lactation performance in cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2013. №26 (10). P. 1379-87. doi: 10.5713/ajas.2013.13114.

19. Kamaldeep, Magotra A., Pander B. L., Dalal D. S., Malik B. S., Garg A. R., Malik A. Evaluation of candidate genotype of immune gene MBL1 associated with udder health and performance traits in dairy cattle and buffalo of India. *Tropical animal health and production*. 2021. №53 (4). P. 429. doi: 10.1007/s11250-021-02865-2.

20. Pant S. D., Verschoor C. P., Skelding A. M., Schenkel F. S., You Q., Biggar G. A., Kelton D. F., Karrow N. A. Bovine IFNGR2, IL12RB1, IL12RB2, and IL23R polymorphisms and MAP infection status. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*. 2011. № 22 (9-10). P. 583-588. doi: 10.1007/s00335-011-9332-8.

21. Зубець М. В., Буркат В. П., Єфіменко М. Я., Полупан Ю. П. Генетика і селекція у скотарстві. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. Т. 4. Київ: Логос, 2001. 181-198 с.

22. Харченко П. Н., Глазко В. И. ДНК-технологии в развитии агробиологии. Москва: Воскресенье, 2006. 480 с.

23. Глазко В. И., Глазко Т. Т. Перспективы и ограничения использования нанотехнологий в геномных исследованиях. Нанотехнологии в сельском хозяйстве: докл. междунар. науч.-практ. конф. М.: Изд-во РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. 2008. С. 20-21.

24. Khatkar M. S., Thomson P. C., Tammien I., Raadsma H. W. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genetics, selection, evolution: GSE*. 2004. №36 (2). P. 163-90. doi:

10.1186/1297-9686-36-2-163.

25. Dekkers J C M. 2004. Dekkers J. C. M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J Anim Sci.* 2004. №82. P. 313–328.

26. Гончаренко І. В. Методологія системної оцінки генотипу високопродуктивних корів: Монографія. – К.: Аграрна наука. 2011. С. 352.

27. Гончаренко І. В. Генетичні аспекти системної оцінки молочних корів племінного стада. – К.: Аграрна наука. 2004. С. 56.

28. Календарь Р. М., Глазко В. И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение. *Физиология и биохимия культурных растений.* 2002. Т. 34, №4. С. 279–296.

29. Гончаренко І. В. Генетические маркеры в селекции животных. – К.: Наукова думка, 2003. С. 39.

30. Wakchaure R., Ganguly S., Praveen P. K., Kumar A., Sharma S., Mahajan T. Marker Assisted Selection (MAS) in Animal Breeding: A Review. *Journal of Drug Metabolism and Toxicology (OMICS Group, USA).* 2015. №6 (5). P. 1-4. doi: 10.4172/2157-7609.1000e127.

31. Garkovenko A. V., Radchenko V. V., Ilitskaya E. V., Koshchaev A. G., Shchukina I. V., Bakharev A. A., Sukhanova S. F. Polymorphism of Cattle Microsatellite Complexes. *J. Pharm. Sci. Res.* 2018. Vol. 10(6). P. 1545–1551.

32. Mucha R., Bhide M. R., Chakurkar E. B., Novak M., Mikula I. Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2009. Vol. 128 (4). P. 381–388.

33. Gopi B., Vir Singh R., Kumar S., Kumar S., Chauhan A., Sonwane A., Kumar A., Bharati J., Vir Singh S. Effect of selected single nucleotide polymorphisms in SLC11A1, ANKRA2, IFNG and PGLYRP1 genes on host

susceptibility to *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* infection in Indian cattle. *Vet Res Commun.* 2022. Vol. 46 (1). P. 209-221. doi: 10.1007/s11259-021-09849-5.

34. Ozsensoy Y. Investigation of PRL-RsaI and HaeIII gene polymorphisms in Anatolian water buffaloes bred by using PCR-RFLP method. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 2018. №47. e20170166. doi: 10.1590/rbz4720170166.

35. Sun L., Song Y., Riaz H., Yang H., Hua G., Guo A., Yang L. Polymorphisms in toll-like receptor 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle. *Veterinary immunology and immunopathology* 2012. Vol. 147 (3-4). P. 195-201. doi:10.1016/j.vetimm.2012.04.016.

36. Glatzer S., Merten N. J., Dierks C., Wöhlke A., Philipp U., Distl O. A Single Nucleotide Polymorphism within the Interferon Gamma Receptor 2 Gene Perfectly Coincides with Polledness in Holstein Cattle. *PLoS One.* 2013. Vol. 8 (6). P. e67992. doi: 10.1371/journal.pone.0067992.

37. Hristov P. I., Teofanova D. R., Mehandzhiyski I. D., Zagorchev L. I., Radoslavov G. A. Significance of Milk Protein Genes Polymorphism for Bulgarian Rhodopean Cattle: Comparative Studies. *Biotechnology and Biotechnological Equipment (Bulgaria).* 2013. Vol. 27 (2). P. 3659–3664. doi: 10.5504/BBEQ.2012.0132.

38. Ulas Cinar M., Hizlisoy H., Akyüz B. I., Arslan K., Aksel E. G., Gümü Şsoy K. S. Polymorphisms in toll-like receptor (*TLR*) 1, 4, 9 and *SLC11A1* genes and their association with paratuberculosis susceptibility in Holstein and indigenous crossbred cattle in Turkey. *Journal of genetics.* 2018. Vol. 97 (5). P. 1147-1154.

39. Heyen D. W., Weller J. I., Ron M. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiological genomics.* 1999. № 3 (1). P. 165–175.

40. Bodnaruk V. Y., Muzyka L. I., Bodnar P. V., Zhmur A. J.,

Orihivskyj T.V. New possibilities of effective breeding in cattle based on the study of the genome. *Scientific Messenger LNUVMB*. 2017. Vol. 19 (79). P. 32–37.

41. Dybus A., Grzesiak W., Kamieniecki H., Szatkowska I., Sobek Z., Blaszczyk P., Czerniawska-Piatkowska E., Zych S., Muszynska M. Association of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle. *Arch. Anim. Breed.* 2005. Vol. 48 (2). P. 149–156. doi.org/10.5194/aab-48-149-2005.

42. Kurak O. P., Gandga A. I., Gurina N. V., Letkevich L. L., Simonenko V. P., Kovalchuk M.A., Kirillova I. V. Monitoring cattle Belarusian black-motley breed on the loci of economically significant traits. *Animal Breeding and Genetics*. 2014. №48. P. 194–202. (in Ukrainian)

43. Bovenhuis H., VanArendock J. A. M., Korver S. Association between milk-protein polymorphisms and milk production traits. *Dairy Science*. 1992. №75. P. 25–49.

44. Perchun A.V., Lazebnaya I.V., Belokurov S. G., Ruzina M. N., Sulimova G. E. Polymorphism of genes CSN3, bPRL I bGHu cows of Kostroma breed in connection with the performance of milk production. *Basic research*. 2012. No. 11–2. P. 304–308. (in Russian)

45. Zinoveva N. A., Kostunica O. V., Gladyr E. A. DNA diagnostics polymorphisms gene-proteins of milk bovine. *Methods of research in biotechnology livestock*. 2004. P. 7–22. (in Russian)

46. Kopylova K. V., Kopylov K. V., Tarasiuk S. I., Metlitska O. I. Polymorphisms of genes associated with economically useful traits in cattle. *Journal of Agricultural Science*. 2006. No. 10. P. 52–58. (in Ukrainian)

47. Babenko H. I. Relations of somatotropin hormone in ukrainian black and white dairy cattle breed and its association with productivity traits. *Animal Breeding and Genetics*, 2015, no. 49, pp. 148–153. (in Ukrainian)

48. Rincón J. C., López-Herrera A., Echeverri J. J. Effect of two single nucleotide polymorphisms on milk yield and composition. *Genet Mol Res.*

2013. Vol. 12 (2). P. 995-1004. doi: 10.4238/2013.April.2.15.

49. Mihailov N. V., Getmantseva L. V., Bakoev S. U., Usatov A. V. Associations between PRLR / AluI gene polymorphism with reproductive, growth and meat traits in pigs. *Cytology and Genetics*. 2014. Vol. 48 (5). P. 323–326.

50. Shuster D., Kehril M., Ackermann M., Gilbert R. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. №89. P. 9225– 9229.

51. Бащенко М. І., Копилов К. В., Добрянська М. Л., Дубін А. В., Подоба Ю.В. Визначення генотипу тварин за генами калпаїну, тиреоглобуліну та міостатину у тварин м'ясних порід великої рогатої худоби: метод. рекомендації. НААН. Інститут розведення і генетики тварин. 2011.

52. Akira S., Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*. 2004. Vol. 4 (7). P. 499–511. doi.org/10.1038/nri1391.

53. Kaisho T., Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006. Vol. 117 (5). P. 979–988. doi.org/10.1016/j.jaci.2006.02.023.

54. Liu J., Zhang Z., Chai L., Che Y., Min S., Yang R. Identification and characterization of a unique leucine-rich repeat protein (LRRC33) that inhibits Toll-like receptor-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013. Vol. 434 (1). P. 28–34. doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.071.

55. Roach J. C., Glusman G., Rowen L., Kaur A., Purcell M. K., Smith K. D., Hood L. E., Aderem A. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. Vol. 102 (27). P. 9577–9582. doi.org/10.1073/pnas.0502272102.

56. Zhou H., Gu J., Lamont S. J., Gu X. Evolutionary analysis for functional divergence of the toll-like receptor gene family and altered



functional constraints. *Journal of molecular evolution*. 2007. Vol. 65 (2). P. 119–123. doi.org/10.1007/s00239-005-0008-4.

57. Leifer C. A., Medvedev A. E. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *Journal of leukocyte biology*. 2016. Vol. 100 (5). P. 927–941. doi.org/10.1189/jlb.2MR0316-117RR.

58. Calabrese V., Cighetti R., Peri F. Molecular simplification of lipid A structure: TLR4-modulating cationic and anionic amphiphiles. *Molecular immunology*. 2015. Vol. 63 (2). P. 153–161. doi.org/10.1016/j.molimm.2014.05.011.

59. Farhat K., Sauter K. S., Brcic M., Frey J., Ulmer A. J., Jungi T. W. The response of HEK293 cells transfected with bovine TLR2 to established pathogen-associated molecular patterns and to bacteria causing mastitis in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2008. Vol. 125 (3-4). P. 326–336. doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.05.026.

60. Lee J. W., Bannerman D. D., Paape M. J., Huang M. K., Zhao X. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet Res*. 2006. №37. P. 219-229.

61. Щебляков Д. В., Логунов Д. Ю., Тухватулин А. И., Шмаров М. М. Толл-подобные рецепторы (TLR) и их значение в опухолевой прогрессии. *Acta Nature*. 2010. Т. 2, № 3. С. 28–37.

62. Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., Modlin R. L., Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *The Journal of Immunology*. 2002. Vol. 169. P. 10-14.

63. Omueti K. O., Beyer J. M., Johnson C. M., Lyle E. A., Tapping R. I. Domain exchange between human toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280. P. 36616-36625.

64. Babu M. M., Priya M. L., Selvan A. T., Madera M., Gough J.,

Aravind L., Sankaran K. A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *Journal of Bacteriology*. 2006. Vol. 188. P. 2761-2773.

65. Werling D., Jann O. C., Offord V., Glass E. J., Coffey T. J. Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends in Immunology*. 2009. Vol. 30. P. 124-130.

66. Guan Y., Ranoa D. R., Jiang S., Mutha S. K., Li X., Baudry J., Tapping R. I. Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *The Journal of Immunology*. 2010. Vol. 184. P. 5094-5103.

67. Opsal M. A., Vage D. I., Hayes B., Berget I., Lien S. Genomic organization and transcript profiling of the bovine toll-like receptor gene cluster TLR6- TLR1-TLR10. *Gene*. 2006. Vol. 384. P. 45-50.

68. Ogorevc J., Kunej T., Razpet A., Dovc P. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetic*. 2009. Vol. 40. P. 832-851.

69. Klungland H., Sabry A., Heringstad B., Olsen H. G., Gomez-Raya L., Vage D. I., Olsaker I., Odegard J., Klemetsdal G., Schulman N., Vilkki J., Ruane J., Aasland M., Rønningen K., Lien S. Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. *Mammalian Genome*. 2001. Vol. 12. P. 837-842.

70. Jann O. C., King A., Corrales N. L., Anderson S. I., Jensen K., Ait-Ali T., Tang H., Wu C., Cockett N. E., Archibald A. L., Glass E. J. Comparative genomics of Toll-like receptor signalling in five species. *BMC Genomics*. 2009. Vol. 10. P. 216. doi.org/10.1186/1471-2164-10-216.

71. Hawn T. R., Misch E. A., Dunstan S. J., Thwaites G. E., Lan N. T., Quy H. T., Chau T. T., Rodrigues S., Nachman A., Janer M., Hien T. T., Farrar J. J., Aderem A. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *European Journal of Immunology*. 2007. Vol. 37. P. 2280–2289.

72. Johnson C. M., Lyle E. A., Omuetti K. O., Stepensky V. A., Yegin O., Alpsy E., Hamann L., Schumann R. R., Tapping R. I. Cutting edge: a common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J. Immunol.* 2007. Vol. 178. P. 7520–7524.

73. Schroder N. W., Schumann R. R. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *The Lancet. Infectious diseases.* 2005. Vol. 5 (3). P. 156–164. doi.org/10.1016/S1473-3099(05)01308-3.

74. Schwartz D. A. The genetics of innate immunity. *Chest.* №121 (3 Suppl). P. 62S–68S. doi.org/10.1378/chest.121.3\_suppl.62s.

75. Omuetti K. O., Mazur D. J., Thompson K. S., Lyle E. A., Tapping R. I. The polymorphism P315L of human toll-like receptor 1 impairs innate immune sensing of microbial cell wall components. *Journal of immunology.* 2007. Vol. 178 (10). P. 6387–6394. doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6387.

76. Thuong N. T., Hawn T. R., Thwaites G. E., Chau T. T., Lan N. T., Quy H. T., Hieu N. T., Aderem A., Hien T. T., Farrar J. J., Dunstan S. J., A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes and immunity.* 2007. Vol. 8 (5). P. 422–428. doi.org/10.1038/sj.gene.6364405.

77. Bochud P. Y., Hawn T. R., Siddiqui M. R., Saunderson P., Britton S., Abraham I., Argaw A. T., Janer M., Zhao L. P., Kaplan G., Aderem A. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *The Journal of infectious diseases.* 2008. Vol. 197 (2). P. 253–261. doi.org/10.1086/524688.

78. Khor C. C., Chapman S. J., Vannberg F. O., Dunne A., Murphy C., Ling E. Y., Frodsham A. J., Walley A. J., Kyrieleis O., Khan A., Aucan C., Segal S., Moore C. E., Knox K., Campbell S. J., Lienhardt C., Scott A., Aaby P., Sow O. Y., Grignani R. T., Sillah J., Sirugo G., Peshu N., Williams T. N., Maitland K., Davies R. J., Kwiatkowski D. P., Day N. P., Yala D., Crook D.

W., Marsh K., Berkley J. A., O'Neill L. A., Hill A. V. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nature genetics*. 2007. Vol. 39 (4). P. 523–528. doi.org/10.1038/ng1976.

79. Hong J., Leung E., Fraser A. G., Merriman T. R., Vishnu P., Krissansen G. W. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007. Vol. 22(11). P. 1760–1766. doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04727.x.

80. Mucha R., Bhide M. R., Chakurkar E. B., Novak M., Mikula I. Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009. Vol. 128 (4). P. 381–388.

81. Russell C. D., Widdison S., Leigh J. A., Coffey T. J. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine Toll-like receptor 1 gene and association with health traits in cattle. *Veterinary Research*. 2012. Vol. 43 (1). P. 17. doi.org/10.1186/1297-9716-43-17.

82. Vidal S., Tremblay M. L., Govoni G., Gauthier S., Sebastiani G., Malo D., Skamene E., Olivier M., Jothy S., Gros P. The Ity/Lsh/Bcglocus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *The Journal of experimental medicine*. 1995. Vol. 182 (3). P. 655–666. https://doi.org/10.1084/jem.182.3.655.

83. Martínez R., Dunner S., Barrera G., Cañon J. Novel variants within the coding regions of the SLC11A1 gene identified in Bos Taurus and Bos indicus breeds. *Journal of animal breeding and genetics*. 2008. Vol. 125 (1). P. 57–62. doi.org/10.1111/j.1439-0388.2007.00690.x.

84. Searle S., Bright N. A., Roach T. I., Atkinson P. G., Barton C. H., Melen R. H., Blackwell J. M. Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *Journal of cell science*. 1998. Vol.

111. P. 2855–2866. doi.org/10.1242/jcs.111.19.2855.

85. Canonne-Hergaux F., Calafat J., Richer E., Cellier M., Grinstein S., Borregaard N., Gros P. Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules. *Blood*. 2002. Vol. 100 (1). P. 268–275. doi.org/10.1182/blood.v100.1.268.

86. Evans C. A., Harbuz M. S., Ostefeld T., Norrish A., Blackwell J. M. Nramp1 is expressed in neurons and is associated with behavioural and immune responses to stress. *Neurogenetics*. 2001. Vol. 3 (2). P. 69–78. doi.org/10.1007/s100480100105.

87. Feng J., Li Y., Hashad M., Schurr E., Gros P., Adams L. G., Templeton J. Bovine natural resistance associated macrophageprotein 1 (Nramp1) gene. *Genome research*. 1996. Vol. 6 (10). P. 956–964. doi.org/10.1101/gr.6.10.956.

88. Youngerman S. M., Saxton A. M., Pighetti G. M. Novel single nucleotide polymorphisms and haplotypes within the bovine CXCR2 gene. *Immunogenetics*. 2004. Vol. 56 (5). P. 355–359. doi.org/10.1007/s00251-004-0699-5.

89. Bagheri M., Moradi-Sharhrbabak M., Miraie-Ashtiani R., Safdari-Shahroudi M., Abdollahi-Arpanahi R. Case–control approach application for finding a relationship between candidate genes and clinical mastitis in Holstein dairy cattle. *Journal of Applied Genetics*. 2015. Vol. 57 (1). P. 107–112.

90. Hu H. C., Wang H. M., Li J. B., Wang C. F., Lai S. J., Li Q. L., Zhong J. F. Genetic polymorphism of Nramp1 gene and correlation with mastitis in Holstein cattle. *HEREDITAS (Beijing)*. 2009. Vol. 31 (1). P. 57-62. doi: 10.3724/sp.j.1005.2009.00057.

91. Zhang C., Wang Y., Chen H., Gu C., Fang X. SLC11A1 gene polymorphisms are not associated to somatic cell score and milk yield in Chinese Holstein. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009. Vol. 127 (3-4). P. 389–392.

92. Sharma B. S., Leyva I., Schenkel F., Karrow N. A. Association of

tolllike receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *Journal of dairy science*. 2006. Vol. 89 (9). P. 3626–3635. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72402-X.

93. Guilloteau L. A., Dornand J., Gross A., Olivier M., Cortade F., Vern Y., Kerboeuf D. Nramp1 is not a major determinant in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infection and immunity*. 2003. Vol. 71 (2). P. 621–628. doi.org/10.1128/IAI.71.2.621-628.2003.

94. Hasenauer F. C., Caffaro M. E., Czibener C., Comerci D., Poli M. A., Rossetti C. A. Genetic analysis of the 3'untranslated region of the bovine SLC11A1 gene reveals novel polymorphisms. *Molecular Biology Reports*. 2012. Vol. 40 (1). P. 545–552.

95. Martinez R., Dunner S., Toro R., Tobon J., Gallego J., Canon J. Effect of polymorphisms in the Slc11a1 coding region on resistance to brucellosis by macrophages in vitro and after challenge in two Bos breeds (Blanco Orejinegro and Zebu). *Genetics and molecular biology*. 2010. Vol. 33 (3). P. 463–470. doi.org/10.1590/S1415-47572010000300014.

96. Paixao T. A., Poester F. P., Carvalho Neta A. V., Borges A. M., Lage A. P., Santos R. L. NRAMP1 3'untranslated region polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infection and immunity*. 2007. Vol. 75 (5). P. 2493–2499. doi.org/10.1128/IAI.01855-06.

97. Martinez R., Toro R., Montoya F., Burbano M., Tobon J., Gallego J., Dunner S., Canon J. Bovine SLC11A1 3' UTR SSCP genotype evaluated by a macrophage in vitro killing assay employing a *Brucella abortus* strain. *Journal of animal breeding and genetics*. 2008. Vol. 125 (4). P. 271–279. doi.org/10.1111/j.1439-0388.2008.00727.x.

98. Balasubramaniam S., Kumar S., Sharma A., Mitra A. Microsatellite (GT)<sub>n</sub> polymorphism at 3'UTR of SLC11A1 influences the expression of brucella LPS induced MCP1 mRNA in buffalo peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2013. Vol. 152 (3-4). P. 295–302.

99. Kadarmideen H. N., Ali A. A., Thomson P. C., Müller B., Zinsstag J. Polymorphisms of the SLC11A1 gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. *Animal Genetics*. 2011. Vol. 42 (6). P. 656–658.
100. Cheng Y., Huang C., Tsai H. J. Relationship of Bovine SLC11A1 (Formerly NRAMP1) Polymorphisms to the risk of Bovine tuberculosis in Holstein cattle. *Journal of Veterinary Science & Technology*. 2015. Vol. 6 (5). P. 247. doi: 10.4172/2157-7579.1000247.
101. Paixao T. A., Ferreira C., Borges A. M., Oliveira D. A., Lage A. P., Santos R. L. Frequency of bovine Nramp1 (Slc11a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2006. Vol. 109. P. 37–42. doi:10.1016/j.vetimm. 2005.07.018.
102. Vazquez-Flores F., Alonso R., Villegas-Sepulveda N., Arriaga C., Pereira-Suarez A. L., Mancilla R., Estrada-Chávez C. A microsatellite study of bovine solute carrier family 11 a1 (Slc11a1) gene diversity in Mexico in relation to bovine tuberculosis. *Genetics and Molecular Biology*. 2006. Vol. 29 (3). P. 503–507. doi: 10.1590/S1415-47572006000300019.
103. Holder A., Garty R., Elder C., Mesnard P., Laquerbe C., Bartens M. C., Werling, D. Analysis of Genetic Variation in the Bovine SLC11A1 Gene, Its Influence on the Expression of NRAMP1 and Potential Association With Resistance to Bovine Tuberculosis. *Frontiers in microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 1420. doi.org/10.3389/fmicb.2020.01420.
104. Pinedo P. J., Buergelt C. D., Donovan G. A., Melendez P., Morel L., Wu R., Rae D. O. Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. *Preventive Veterinary Medicine*. 2009. Vol. 91(2-4). P. 189–196.
105. Ruiz-Larracaga O., Garrido J. M., Manzano C., Iriondo M., Molina E., Gil A., Koets A. P., Rutten V. P., Juste R. A., Estonba A. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine solute carrier family 11 member1 (SLC11A1) gene and their association with infection by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Journal of dairy science*.

2010. Vol. 93 (4). P. 1713–1721. doi.org/10.3168/jds.2009-2438.

106. Benedict C. A., Banks T. A., Ware C. F. Death and survival: viral regulation of TNF signaling pathways. *Current opinion in immunology* 2003. Vol. 15 (1). P. 59–65. doi.org/10.1016/s0952-7915(02)00018-3.

107. Bradley J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology*. 2008. Vol. 214 (2). P. 149–160. doi.org/10.1002/path.2287.

108. Bannerman D. D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of animal science*. 2009. Vol. 87 (13 Suppl). P. 10–25. doi.org/10.2527/jas.2008-1187.

109. Sherry S. T., Ward M. H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E. M., Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*. 2001. Vol. 29 (1). P. 308–311. doi.org/10.1093/nar/29.1.308.

110. Shirasuna K., Kawashima C., Murayama C., Aoki Y., Masuda Y., Kida K., Matsui M., Shimizu T., Miyamoto A. Relationships between the first ovulation postpartum and polymorphism in genes relating to function of immunity, metabolism and reproduction in high-producing dairy cows. *The Journal of reproduction and development*. 2011. Vol. 57 (1). P. 135–142. doi.org/10.1262/jrd.10-100t.

111. Sharma B. S., Jansen G. B., Karrow N. A., Kelton D., Jiang Z. Detection and characterization of amplified fragment length polymorphism markers for clinical mastitis in Canadian Holsteins. *Journal of dairy science*. 2006. Vol. 89 (9). P. 3653–3663. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72405-5.

112. Lund M. S., Guldbbrandsen B., Buitenhuis A. J., Thomsen B., Bendixen C. Detection of quantitative trait loci in Danish Holstein cattle affecting clinical mastitis, somatic cell score, udder conformation traits, and assessment of associated effects on milk yield. *Journal of dairy science*. 2008. Vol. 91 (10). P. 4028–4036. doi.org/10.3168/jds.2007-0290.

113. Agaba, M., Kemp, S.J., Barendse, W., and Teale, A.J.,



Polymorphism at the bovine tumor necrosis factor alpha locus and assignment to BTA 23. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*. 1996. Vol. 7 (3). P. 186–187. doi.org/10.1007/s003359900051.

114. Skarzynski D. J., Woclawek-Potocka I., Korzekwa A., Bah M. M., Piotrowska K., Barszewska B., Okuda K. Infusion of exogenous tumor necrosis factor dose dependently alters the length of the luteal phase: differential responses to treatment with indomethacin and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Biology of Reproduction*. 2007. Vol. 76 (4). P. 619–627. doi.org/10.1095/biolreprod.106.053280.

115. Okuda K., Sakumoto R., Okamoto N., Acosta T. J., Abe H., Okada H., Skarzynski D. J. Cellular localization of genes and proteins for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF), TNF receptor types I and II in bovine endometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010. Vol. 330 (1-2). P. 41–48. doi.org/10.1016/j.mce.2010.07.025

116. Kehrli M. E. Jr, Nonnecke B. J., Roth J. A. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *American Journal of Veterinary Research*. 1989. Vol. 50, №2. P. 207–214.

117. Кевра М. К. Фактор некроза опухолей: изучение роли в организме. *Медицинские новости*. 1995. №8. С. 3–22.

118. Aggarwal B. B., Gupta S. C., Kim J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012. Vol. 119. № 3. P. 651–665. doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225.

119. Konnai S., Usui T., Ikeda M., Kohara J., Hirata T., Okada K., Ohashi K., Onuma M. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes and infection*. 2006. Vol. 8 (8). P. 2163–2171. doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.017.

120. Bojarojć-Nosowicz B., Kaczmarczyk E., Stachura A., Kubińska M.

Tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) gene polymorphism and expression of membrane-bound TNF $\alpha$  protein on CD11b<sup>+</sup> and IgM<sup>+</sup> cells in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2015. Vol. 18 (3). P. 533–539. doi.org/10.1515/pjvs-2015-0069.

121. Bojarojć-Nosowicz B., Kaczmarczyk E., Stachura A., Kotkiewicz M. Polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha gene in cattle herds naturally infected and uninfected with the Bovine Leukemia Virus. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2011. Vol. 14 (4). P. 671–673. doi.org/10.2478/v10181-011-0101-0.

122. Wojdak-Maksymiec K., Szyda J., Strabel T. Parity-dependent association between TNF- $\alpha$  and LTF gene polymorphisms and clinical mastitis in dairy cattle. *BMC Veterinary Research*. 2013. Vol. 9 (1). P. 114. doi.org/10.1186/1746-6148-9-114.

123. Paape MJ, Rautiainen PM, Lilius EM, Malstrom CE, Elsasser TH. Development of anti-bovine TNF-alpha mABand ELISA for quantitating TNF-alpha in milk after intramammary injection of endotoxin. *Journal of dairy science*. 2002. Vol. 85 (4). P. 765–773. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74134-9.

124. Ranjan S., Bhushan B., Panigrahi M., Kumar A., Deb R., Kumar P., Sharma D. Association and Expression Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms of Partial Tumor Necrosis Factor Alpha Gene with Mastitis in Crossbred Cattle. *Animal Biotechnology*. 2014. Vol. 26 (2). P. 98–104.

125. Lin C. Y., McAllister A. J., Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Batra T. R., Lee A. J., Roy G. L., Vesely J. A., Wauthy J. M., Winter K. A. Association of milk protein types with growth and reproductive performance of dairy heifers. *Journal of dairy science*. 1987. Vol. 70 (1). P. 29–39. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)79977-9.

126. Kawasaki Y., Aoki Y., Magata F., Miyamoto A., Kawashima C., Hojo T., Okuda K., Shirasuna K., Shimizu T. The effect of single nucleotide polymorphisms in the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene on reproductive

performance and immune function in dairy cattle. *The Journal of reproduction and development*. 2014. Vol. 60 (3). P. 173–178. doi.org/10.1262/jrd.2013-140.

127. Bimenova Zh., Ussenbekov Ye. S., Terletskiy V. P., Makashev Ye. K., Tyshchenko V. I., Kassymbekova Sh. N. Reproductive Function of Cows with Different Genotypes for TNF $\alpha$  Locus and Estimation of Sperm Fertility by the DNA Fragmentation Method. *Cytology and genetics*. 2019. Vol. 53, no. 1. P. 42–48. doi.org/10.3103/S0095452719010043.

128. Krytsyna T. I., Kochnev N. N., Aitnazarov R. B., Yudin N. S., Pechurin S. N. -824 A/G polymorphism of the tumor necrosisfactor alpha gene and reproduction indicators of cattle. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2015. Vol. 29, №1. P. 39-41.

129. Lendez P. A., Passucci J. A., Poli M. A., Gutierrez S. E., Dolcini G. L., Ceriani M. C. Association of TNF- $\alpha$  gene promoter region polymorphisms in bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle with different proviral loads. *Archives of Virology*. 2015. Vol. 160 (8). P. 2001–2007. doi.org/10.1007/s00705-015-2448-5.

130. Liu J., Ju Z., Li Q., Huang J., Li R., Li J., Wang C. Mannose-binding lectin 1 haplotypes influence serum MBL-A concentration, complement activity, and milk production traits in Chinese Holstein cattle. *Immunogenetics*. 2011. Vol. 63 (11). P. 727–742. doi.org/10.1007/s00251-011-0548-2.

131. Bouwman L. H., Roep B. O., Roos A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Human immunology*. 2006. Vol. 67 (4-5). P. 247–256. doi.org/10.1016/j.humimm.2006.02.030.

132. Turner M. W., Hamvas R. M. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Reviews in immunogenetics*. 2000. Vol. 2 (3). P. 305–322.

133. Turner M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular immunology*. 2003. Vol. 40 (7). P. 423–429.

doi.org/10.1016/s0161-5890(03)00155-x.

134. Phatsara C., Jennen D. G., Ponsuksili S., Murani E., Tesfaye D., Schellander K., Wimmers K. Molecular genetic analysis of porcine mannose-binding lectin genes, MBL1 and MBL2, and their association with complement activity. *International journal of immunogenetics*. 2007. Vol. 34 (1). P. 55–63. doi.org/10.1111/j.1744-313X.2007.00656.x.

135. Juul-Madsen H. R., Kjærup R. M., Toft C., Henryon M., Heegaard P. M., Berg P., Dalgaard T. S. Structural gene variants in the porcine mannose-binding lectin 1 (MBL1) gene are associated with low serum MBL-A concentrations. *Immunogenetics*. 2011. Vol. 63 (5). P. 309–317. doi.org/10.1007/s00251-011-0512-1.

136. Neth O., Jack D. L., Dodds A. W., Holzel H., Klein N. J., Turner M. W. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infection and immunity*. 2000. Vol. 68 (2). P. 688–693. doi.org/10.1128/IAI.68.2.688-693.2000.

137. Van de Wetering J. K., van Golde L. M., Batenburg J. J. Collectins: players of the innate immune system. *European journal of biochemistry*. 2004. Vol. 271 (7). P. 1229–1249. doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04040.x.

138. Sorensen R., Thiel S., Jensenius J. C., 2005. Mannan-binding lectin associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer seminars in immunopathology*. 2005. Vol. 27 (3). P. 299–319. doi.org/10.1007/s00281-005-0006-z.

139. Gjerstorff M., Hansen S., Jensen B., Dueholm B., Horn P., Bendixen C., Holmskov U. The genes encoding bovine SPA, SP-D, MBL-A, conglutinin, CL-43 and CL-46 form a distinct collectin locus on Bos taurus chromosome 28 (BTA28) at position q.1.8–1.9. *Animal genetics*. 2004. Vol. 35 (4). P. 333–337. doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01167.x.

140. Wang C., Liu M., Li Q., Ju Z., Huang J., Li J., Zhong J. Three novel single-nucleotide polymorphisms of MBL1 gene in Chinese native cattle and their associations with milk performance traits. *Veterinary Immunology and*

*Immunopathology*. 2011. Vol. 139 (2-4). P. 229–236. doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.10.023.

141. Yuan Z., Li J., Li J., Gao X., Xu S. SNPs identification and its correlation analysis with milk somatic cell score in bovine MBL1 gene. *Molecular biology reports*. 2012. Vol. 40 (1). P. 7–12. doi.org/10.1007/s11033-012-1934-z.

142. Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*. 2004. Vol. 75 (2). P. 163–189. doi.org/10.1189/jlb.0603252.

143. Barnes P. F. Wize B. Type 1 cytokines and the pathogenesis of tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000. Vol. 161 (6). P. 1773–1774. doi.org/10.1164/ajrccm.161.6.16167.

144. Philips J. A., Ernst J. D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual review of pathology*. 2012. Vol. 7. P. 353–384. doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132458.

145. Desvignes L., Ernst J. D. Interferon-gamma-responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*. 2009. Vol. 31 (6). P. 974–985. doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.007.

146. Lee J., Kornfeld H. Interferon- $\gamma$  Regulates the Death of *M. tuberculosis*-Infected Macrophages. *Journal of cell death*. 2010. Vol. 3. P. 1–11. doi.org/10.4137/jcd.s2822.

147. Ray J., Christian J. The timing of TNF and IFN- $\gamma$  signaling affects macrophage activation strategies during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of theoretical biology*. 2008. Vol. 252, No 1. P. 24–38. doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.01.010.

148. Bhaladhare A., Chauhan A., Sonwane A., Kumar A., Kumar P., Kumar S., Kumar S., Panigrahi M., Bhushan B. Association of single nucleotide polymorphisms in IFNGR1 and IFNGR2 genes with bovine tuberculosis. *Indian Journal of Animal Research*. 2020. Vol. 54 (1). P. 36-40.

doi.org/10.18805/ijar.B-3733.

149. Schölvinck E., Wilkinson K. A., Whelan A. O., Martineau A. R., Levin M., Wilkinson R. J. Gamma interferon-based immunodiagnosis of tuberculosis: comparison between whole-blood and enzyme-linked immunospot methods. *Journal of clinical microbiology*. 2004. Vol. 42 (2). P. 829–831. doi.org/10.1128/JCM.42.2.829-831.2004.

150. Bannerman D. D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of animal science*. 2009. Vol. 87 (13 Suppl). P. 10–25. doi.org/10.2527/jas.2008-1187.

151. Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H., Rigi-Ladiz M. A., Taheri M., Moazenni-Roodi A., Hashemi M. Association of TGF- $\beta$ 1 -509 C/T, 29 C/T and 788 C/T gene polymorphisms with chronic periodontitis: a case-control study. *Gene*. 2013. Vol. 518 (2). P. 330–334. doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.108.

152. Rosenzweigand S. D., Holland S. M. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunological reviews*. 2005. Vol. 203. P. 38–47. doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00227.x.

153. Wang J., Tang S., Shen H. Association of genetic polymorphisms in the IL12-IFNG pathway with susceptibility to and prognosis of pulmonary tuberculosis in a Chinese population. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2010. Vol. 29 (10). P. 1291–1295. doi.org/10.1007/s10096-010-0985-0.

154. Loo W. T., Fan C. B., Bai L. J., Yue Y., Dou Y. D., Wang M., Liang H., Cheung M. N., Chow L. W., Li J. L., Tian Y., Qing L. Gene polymorphism and protein of human pro- and anti-inflammatory cytokines in Chinese healthy subjects and chronic periodontitis patients. *Journal of translational medicine*. 2012. Vol. 10 Suppl 1 (Suppl 1). P. S8. doi.org/10.1186/1479-5876-10-S1-S8.

155. Hijikata M., Shojima J., Matsushita I., Tokunaga K., Ohashi J., Hang N. T. Horie, T. Sakurada S., Hoang N. P., Thuong P. H., Lien L. T., Keicho N. Association of IFNGR2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among the Vietnamese. *Human genetics*. 2012. Vol. 131 (5). P. 675–682. doi.org/10.1007/s00439-011-1112-8.

156. Glatzer S., Merten N. J., Dierks C., Wöhlke A., Philipp U., Distl O. A Single Nucleotide Polymorphism within the Interferon Gamma Receptor 2 Gene Perfectly Coincides with Polledness in Holstein Cattle. *PloS one*. 2013. Vol. 8 (6). P. e67992. doi.org/10.1371/journal.pone.0067992.

157. Rothhammer S., Capitan A., Mullaart E., Seichter D., Russ I., Medugorac I. The 80-kb DNA duplication onBTA1 is the only remaining candidate mutation for the polled phenotype of Friesian origin. *Genet Sel Evol*. 2014. Vol. 46. P. 44. doi.org/10.1186/1297-9686-46-44.

158. El Nahas A. F., Abd El Naby W. S. H., Khatab S. A., Fergany A. A., Rashed R. R. Comparative Expression Analysis of Inflammatory and Immune-related Genes in Cattle During Acute Infection with Foot-and-mouth Disease Virus in Egypt. *Journal of veterinary research*. 2021. Vol. 65 (1). P. 39–44. doi.org/10.2478/jvetres-2021-0005.

159. Van Wyk B., Snider M., Scruten E., van Drunen Littel-van den Hurk S., Scott Napper S. Induction of functional interferon alpha and gamma responses during acute infection of cattle with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*. 2016. Vol. 195. P.104–114. doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.09.015.

160. Kang S., Brown H. M., Hwang S. Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. *Immune network*. 2018. Vol. 18 (5). P. e33. doi.org/10.4110/in.2018.18.e33.

161. Abend J. R., Low J. A., Imperiale M. J. Inhibitory effect of gamma interferon on BK virus gene expression and replication. *Journal of virology*. 2007. Vol. 81 (1). P. 272–279. doi.org/10.1128/JVI.01571-06.

162. Gopi B., Vir Singh R., Kumar S., Kumar S., Chauhan A., Sonwane

A., Kumar A., Bharati J., Vir Singh S. Effect of selected single nucleotide polymorphisms in SLC11A1, ANKRA2, IFNG and PGLYRP1 genes on host susceptibility to *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* infection in Indian cattle. *Veterinary research communications*. 2022. Vol. 46 (1). P. 209–221. doi.org/10.1007/s11259-021-09849-5.

163. Prakash O., Kumar A., Sonwane A., Rathore R., Singh R. V., Chauhan A., Kumar P., Renjith R., Yadav R., Bhaladhare A., Baqir M., Sharma D. Polymorphism of cytokine and innate immunity genes associated with bovine brucellosis in cattle. *Molecular biology reports*. 2014. Vol. 41 (5). P. 2815–2825. doi.org/10.1007/s11033-014-3136-3.

164. Verschoor C. P., Pant S. D., Biggar G. A., Schenkel F. S., Sharma B. S., Karrow N. A. Identification of SNPs in interferon gamma, interleukin-22, and their receptors and associations with health and production-related traits in Canadian Holstein bulls. *Animal biotechnology*. 2011. Vol. 22 (1). P. 7–15. doi.org/10.1080/10495398.2011.536078.

165. Подоба Б. Є. Генетичні маркери продуктивних і адаптаційних ознак у молочної худоби. *Розведення та штучне осіменіння великої рогатої худоби*. Київ, 1994. Вип. 26. С. 58–59.

166. Bodnaruk V., Bodnar P., Zhmur A., Muzyka L., Kropyvka Y., Orihivskyj, T., Poslavska J. Options for genetic-biochemical markers in connection with dairy productivity. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural Sciences*. 2018. Vol. 20 (84). P. 98–103. doi.org/10.15421/nvlvet8418.

167. Kulibaba R. O., Liashenko Y. V., Yurko P. S. Genetic structure features of cattle populations of Ukrainian selection by polymorphism of loci that are associated with milk productivity traits. *Agricultural Science and Practice*. 2019. Vol. 6, No. 3. P. 37–44.

168. Супрович Т. М., Карчевська Т. М., Супрович М. П., Колінчук Р. В. Молекулярно-генетичні маркери захворюваності великої рогатої худоби на фузобактеріоз. *Вісник Дніпропетровського державного*



аграрно-економічного університету. *Ветеринарні науки*. 2018. № 1-2 (47). С. 69-74.

169. Хмельничий Л. М., Павленко Ю. М. Генетичні маркери в селекції та збереженні генофонду бурої худоби Сумського регіону. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Сер. «Тваринництво»*. 2021. Вип. 3 (46). С. 3-6.

170. Ефименко М. Я., Подоба Б. Е., Бирюкова О. Д. Роль генетических маркеров в системе геномной селекции. Достижения в генетике, селекции и воспроизводстве сельскохозяйственных животных. *Материалы междунар. науч. конф.* СПб. 2009. Ч. 2. С. 78–82.

171. Костюнина О. В., Зиновьева Н. А., Левитченков А. Н., Гоголев А. В. Селекция на основе ДНК-технологии. *Животноводство России*. 2008. № 4. С. 39–42.

172. Ahmadzadeh M., Rashidi F., Amirpour H. N., Jaferian A., Eghbalsaied S. Effects of genetic polymorphism in Pit1, GH, GHR and KCN3 on milk yield and body weight of Khuzestan (Iran) water buffaloes. *Revista Columbiana de Ciencias Pecuarias*. 2019. Vol. 32, №2. P. 107–116. doi.org/10.17533/udea.rccp.v32n2a04.

173. Zhou G. L., Liu H. G., Liu C., Guo S. L., Zhu Q., Wu Y. H. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *Journal of Biosciences*. 2005. Vol. 30 (5). P. 595– 580. doi.org/10.1007/BF02703558.

174. Эрнст Л. К., Зиновьева Н. А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. Москва: РАСХН, 2008. 68 с.

175. Georges M., Nielsen D., Mackinnon M., Mishra A., Okimoto R., Pasquino A. T., Sargeant L. S., Sorensen A., Steele M. R., Zhao X. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*. 1995. Vol. 139 (2). P. 907–920. doi.org/10.1093/genetics/139.2.907.

176. Lundén A., Nilsson M., Janson L. Marked effect of beta-

lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of dairy science*. 1997. Vol. 80 (11). P. 2996–3005. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76266-0.

177. Tsiaras A. M., Barbouli G. G., Boscoss G. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 2005. Vol. 88. P. 327–334.

178. Ortnet M., Alois E. Zuchterische Bedeutung des kappa-caseins und anderer Milchproteine beim Rind Forderungsdienst. *Forderungsdienst*. 1995. № 43 (7). P. 210–211.

179. Guimaraes E. P., Ruane J., Scherf B. D., Sonnino A. Dargie J. D. (Ed.). Marker-assisted selection Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): FAO. 2007. 494 p.

180. Rischkowsky B., Dafydd P. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. Rome: Food & Agriculture Org., 2007. 511 p.

181. Копилов К. В. Стан та перспективи використання генотипного маркування в селекції тварин. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2010. Т. 8, № 1. С. 91-98.

182. Гузеєв Ю. В., Мельник О. В., Спиридонов В. Г., Мельничук С. Д. Порівняльний аналіз генетичної структури мікропопуляції сірої української породи великої рогатої худоби за ДНК-маркерами. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2015. Т. 17, № 3 (63). С. 166–171.

183. Добрянська М. Л. Генетична структура м'ясних порід великої рогатої худоби за різними типами ДНК-маркерів. *Розведення і генетика тварин*. 2014. Вип. 48. С. 183–189.

184. Копилов К. В. Характеристика тварин української чорно-рябої молочної породи за поліморфізмом генів (QTL). *Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С. З.*

Гжицького. 2010. Т. 12, № 2 (44). С. 98–103.

185. Шельов А. В. Поліморфізм мікросателітних локусів ДНК у різних видів сільськогосподарських тварин. *Розведення і генетика тварин*. 2015. Вип. 50. С. 183–190.

186. Bodnaruk V.Y., Muzyka L.I., Bodnar P.V., Zhmur A.J., Orihivsjkyj T.V. New possibilities of effective breeding in cattle based on the study of the genome. *Scientific Messenger LNUVMB*. 2017. Vol. 19 (79). P. 32–37. doi.org/10.15421/nvlvet7907.

187. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*. 2012. Vol. 13. P. 134. doi.org/10.1186/1471-2105-13-134.

188. Кузнецов В. М. F-статистики Райта: оценка и интерпретация. *Проблемы биологии продуктивных животных*. РАСХН, ГНУ ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 2014. № 4. С. 80–104.

189. Меркурьева Е. К. Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных. Москва: Колос, 1970. 424 с.

190. Меркурьева Е. К. Генетические основы селекции в скотоводстве. Москва: Колос, 1977. 240 с.

191. Лакин Г. Ф. Биометрия. 4-е изд. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.

192. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: МедиаСфера, 2002. 312 с.

193. Arslan K., Akyuz B., Aksel E. G., Ozdemir F., Cinar M. U. Polymorphisms of *TLR1*, *TLR4* and *SLC11A1* Genes in Some Cattle Breeds Reared in Turkey. *Journal of Agricultural Science*. 2018. Vol. 24. P. 547–553. doi.org/10.15832/ankutbd.349728.

194. Elmaghraby M. M., El-Nahas A. F., Fathala M. M. Association of toll-like receptors 2 and 6 polymorphism with clinical mastitis and production

traits in Holstein cattle. *Iranian journal of veterinary research*. 2018. Vol. 19 (3). P. 202–207.

195. Beecher C., Daly M., Childs S., Berry D. P., Magee D. A., McCarthy T. V., Giblin L. Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. *BMC genetics*. 2010. Vol. 11. P. 99. doi.org/10.1186/1471-2156-11-99.

196. Wang X., Xu S., Gao X., Ren H., Chen J. Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle. *Journal of genetics and genomics*. 2007. Vol. 34 (5). P. 406–412. doi.org/10.1016/S1673-8527(07)60044-7.

197. Kumar S., Kumar S., Singh R. V., Chauhan A., Kumar A., Sulabh S., Bharati J., Singh S. V. Genetic association of polymorphisms in bovine TLR2 and TLR4 genes with *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* infection in Indian cattle population. *Veterinary research communications*. 2019. Vol. 43 (2). P. 105–114. doi.org/10.1007/s11259-019-09750-2.

198. Chen H., Liu C., Xiang M., Yu J., Xia Y., Hu X., Wang D., Tao B., Zhang Y., Cheng L. Contribution of the mutation rs8193069 in TLR4 to mastitis resistance and performance in Holstein cows in southern China. *Veterinary medicine and science*. 2022. Vol. 8 (1). P. 357–366. doi.org/10.1002/vms3.671.

199. Животовский Л. А. Популяционная биометрия. Москва: Наука, 1991. 271 с.

200. Kulibaba R., Liashenko Yu., Ivashchenko O. Polymorphism of TLR1, TLR4, and SLC11A1 genes in populations of different cattle breeds of Ukrainian selection. *Agricultural Science and Practice*. 2021. Vol. 8, № 3. P. 25-34. doi.org/10.15407/agrisp8.03.025.

201. Іващенко О. Ю., Кулібаба Р.О. Параметри молочної продуктивності корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами за локусами *TLR1* та *CSN2*. *Таврійський науковий вісник*.

*Серія: Сільськогосподарські науки.* 2022. № 126. С. 114–121. doi.org/10.32851/2226-0099.2022.126.16.

202. Ivashchenko O., Kulibaba R. Productivity of cows of the Ukrainian red-spotted dairy breed with different genotypes according to the TLR1, SLC11A1 and CSN2 loci. *Ukrainian Black Sea Region Agrarian Science.* 2022. Vol. 26 (2). P. 35-42. doi.org/10.31521/2313-092X/2022-26(2)-4.

203. Іващенко О. Ю., Ляшенко Ю. В., Кулібаба Р. О. Аналіз молочної продуктивності корів порід української селекції з різними генотипами за локусом IFNGR2. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Тваринництво.* 2022. № 2 (49). С. 14–19. doi.org/10.32845/bsnau.lvst.2022.2.3.

204. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В., Іващенко О. Ю., Альшамайлех Х. С. Поліморфізм локусів кількісних ознак у популяціях корів молочних порід української селекції: монографія. Київ: НУБіП України, 2022. – 268 с.

205. Elmaghraby M. M., El-Nahas A. F., Fathala M. M., Sahwan F. M., Tag El-Dien M. A. Association of *toll-like receptors 2 and 6* polymorphism with clinical mastitis and production traits in Holstein cattle. *Iranian journal of veterinary research.* 2018. Vol. 19 (3). P. 202–207.

206. Bilgen N., Cinar Kul B., Offord V., Werling D., Ertugrul O. Determination of Genetic Variations of Toll-Like Receptor (TLR) 2, 4, and 6 with Next-Generation Sequencing in Native Cattle Breeds of Anatolia and Holstein Friesian. *Diversity.* 2016. Vol. 8 (4). P. 23. doi.org/10.3390/d8040023.

207. de Mesquita A. Q., E Rezende C. S., de Mesquita A. J., Jardim E. A., Kipnis A. P. Association of *TLR4* polymorphisms with subclinical mastitis in Brazilian holsteins. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology].* 2012. Vol. 43 (2). P. 692–697. doi.org/10.1590/S1517-83822012000200034.

208. Алексеев А. А., Виноградова И. В., Костюнина О. В. Изучение ассоциации полиморфизмов в генах CARD15 и TLR4 с продуктивностью и количеством соматических М-клеток у коров черно-пестрой породы. *Эффективное животноводство*. 2018. № 1 (140). С. 36-37.

209. Wojarojc-Nosowicz B., Brym P., Kaczmarczyk E., Stachura A., Habel A. K. Polymorphism and expression of the tumour necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) gene in non-infected cows and in cows naturally infected with the bovine leukaemia virus (BLV). *Vet Med-Czech*. 2016. Vol. 61 (1). P. 1-9. doi: 10.17221/8676-VETMED.

210. Bhaladhare A., Kumar A., Quadari M., Sharma D. Polymorphism in Ifngr2 Gene And Its Association With Susceptibility To Tuberculosis In Cattle. *Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology*. 2014. Vol. 9 (4). P. 35–38.

211. le Roex N., Koets A. P., van Helden P. D., Hoal E. G. Gene polymorphisms in African buffalo associated with susceptibility to bovine tuberculosis infection. *PloS one*. 2013. Vol. 8 (5). P. e64494. doi.org/10.1371/journal.pone.0064494.

212. Novák K. Functional polymorphisms in Toll-like receptor genes for innate immunity in farm animals. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2014. Vol. 157 (1-2). P. 1–11. doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.10.016.

213. Li C., Shi W., Chu M. X., An Y. F., Chen H. Q., Di R., Fang L. Polymorphisms of TLR1 Gene and Their Relationship with Somatic Cell Score in Holstein Cows. *Biochemical Genetics*. 2009. Vol. 47 (3-4). P. 279-287. doi: 10.1007/s10528-008-9216-4.

214. Bjelka M., Novák K. Association of TLR gene variants in a Czech Red Pied cattle population with reproductive traits. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2020. Vol. 220. P. 109997. doi:10.1016/j.vetimm.2019.109997.

215. Canive M., Casais R., Jimenez J. A., Blanco-Vazquez C., Amado J.,

Garrido J. M., Juste R. A., Alonso-Hearn M. Correlations between single nucleotide polymorphisms in bovine *CD209*, *SLC11A1*, *SP110* and *TLR2* genes and estimated breeding values for several traits in Spanish Holstein cattle. *Heliyon*. 2020. Vol. 6 (6). P. e04254. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04254.

216. Aleri J. W., Hine B. C., Pyman M. F., Mansell P. D., Wales W. J., Mallard B., Fisher A. D. Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. *Research in veterinary science*. 2016. Vol. 108. P. 8–17. doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.07.007.

217. Pritchard T., Coffey M., Mrode R., Wall, E. Understanding the genetics of survival in dairy cows. *Journal of dairy science*. 2013. Vol. 96 (5). P. 3296–3309. doi.org/10.3168/jds.2012-6219.

218. Ateya A. I., Ibrahim S. S., Al-Sharif M. M. Single Nucleotide Polymorphisms, Gene Expression and Economic Evaluation of Parameters Associated with Mastitis Susceptibility in European Cattle Breeds. *Veterinary sciences*. 2022. Vol. 9 (6). P. 294. doi.org/10.3390/vetsci9060294.

219. Hasenauer F. C., Rossi U. A., Caffaro M. E., Raschia M. A., Maurizio E., Poli M. A., Rossetti C. A. Association of TNF rs668920841 and INRA111 polymorphisms with caprine brucellosis: A case-control study of candidate genes involved in innate immunity. *Genomics*. 2020. Vol. 112 (6). P. 3925–3932. doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.06.050.

220. Egger-Danner C., Cole J. B., Pryce J. E., Gengler N., Heringstad B., Bradley A., Stock K. F. Invited review: overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits. *Animal: an international journal of animal bioscience*. 2015. Vol. 9 (2). P. 191–207. doi.org/10.1017/S1751731114002614.

## **ДОДАТКИ**



## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Стаття у науковому фаховому виданні, включеному до міжнародних наукометричних баз даних Web of Science Core Collection та/або Scopus

1. Kulibaba R., Liashenko Yu., **Ivashchenko O.** Polymorphism of TLR1, TLR4, and SLC11A1 genes in populations of different cattle breeds of Ukrainian selection. *Agricultural Science and Practice*. 2021. № 8 (3). P. 25–34. *(Здобувачем здійснено узагальнення результатів та підготовка частини тексту публікації).*

### Статті у наукових фахових виданнях України

2. **Іващенко О. Ю.**, Кулібаба Р.О. Параметри молочної продуктивності корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами за локусами *TLR1* та *CSN2*. *Таврійський науковий вісник. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2022. № 126. С. 114–121. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, аналіз результатів та написання статті).*

3. **Ivashchenko O.**, Kulibaba R. Productivity of cows of the Ukrainian red-spotted dairy breed with different genotypes according to the TLR1, SLC11A1 and CSN2 loci. *Ukrainian Black Sea Region Agrarian Science*. 2022. № 26 (2). P. 35–42. *(Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, проводив статистичну обробку та аналіз даних, узагальнення результатів та підготовку частини тексту публікації).*

4. **Іващенко О. Ю.**, Ляшенко Ю. В., Кулібаба Р. О. Аналіз молочної продуктивності корів порід української селекції з різними генотипами за

локусом IFNGR2. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Тваринництво. 2022. № 2 (49). С. 14–19. *(Здобувачем проведено збір первинних даних, їх біометричну обробку та аналіз, узагальнення результатів, оформлення статті).*

### **Додатково відображають наукові результати дисертації**

5. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В., **Іващенко О. Ю.**, Альшамайлех Х. С. Поліморфізм локусів кількісних ознак у популяціях корів молочних порід української селекції: монографія. Київ: НУБіП України, 2022. – 268 с. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень, здійснював статистичну обробку та аналіз даних, узагальнення результатів та підготовку частини тексту публікації).*

### **Наукові праці апробаційного характеру**

6. **Іващенко О. Ю.**, Афанасенко В. Ю. Обґрунтування стандартів якості молока в Україні та ЄС. Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми: 73 Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, м. Київ, 3–4 квітня 2019 року: тези доповіді. К., 2019. С. 256–259. *(Здобувачем опрацьовано наукову літературу, проведено її аналіз та узагальнення, написано тези доповідей).*

7. **Іващенко О. Ю.**, Афанасенко В. Ю. Основні фактори впливу на прояв клінічного маститу в молочному скотарстві. Наукові і технологічні виклики тваринництва у XXI столітті: Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 90-річчю від дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора, академіка УААН і РААН Г. О. Богданова, м. Київ, 12–14 березня 2020 року: тези доповіді. К., 2020. С. 42–47. *(Здобувачем опрацьовано наукову літературу та проведено її аналіз і*

*узагальнення, написано тези доповідей).*

8. **Іващенко О. Ю.**, Кулібаба Р. О. Бактеріальне забруднення як один з основних факторів зниження якості молочної продукції в Україні. Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 90-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора О. Д. Бугрова: м. Харків, 16-17 вересня, 2020: тези доповіді, Х., 2020. С. 58–61. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел та їх узагальнення, написано тези доповідей).*

9. **Іващенко О. Ю.** Деякі питання щодо практичних підходів до профілактики маститу корів. Актуальні питання технологій тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали Всеукраїнської науково-практичної інтернет конференції, присвяченої 100-річчю факультету технологій продукції тваринництва та менеджменту: м. Харків, 2020: тези доповіді, РВВ ХДЗВА, 2020. С. 76–81.

10. **Іващенко О. Ю.**, Кулібаба Р. О. Перспективи використання генів родини TLR в маркер-асоційованій селекції у скотарстві. Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми: 75 Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, м. Київ, 25–26 березня 2021 року: тези доповіді. К., 2021. С. 126–128. *(Здобувачем здійснено узагальнення наукових літературних джерел та написано тези доповідей).*

11. **Іващенко О.** Аналіз взаємозв'язку показника кількості соматичних клітин молока корів з параметрами бактеріальної контамінації. Міжнародний симпозіум зі зменшення біологічної загрози (IBTRS) 2021 року: збірник тез. Україна, 2021. С. 189.

12. **Іващенко О. Ю.**, Кулібаба Р. О. Алельні варіанти гену SLC11A1 як маркери резистентності до інфекційних захворювань молочної худоби. Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених,

присвяченої 90-річчю від дня народження доктора економічних наук, професора, академіка УААН А. О. Омеляненка: м. Харків, 26-27 серпня, 2021: тези доповіді, Х., 2021. С. 54–56. *(Здобувачем проведено збір первинних даних, виконано експериментальні дослідження, узагальнення результатів, написано тези доповідей).*

13. **Іващенко О. Ю.**, Кулібаба Р. О. Використання методів біоінформаційного аналізу для оптимізації параметрів ампліфікації за локусами *TNF $\alpha$*  та *SLC11A1*. Сучасна наука: стан та перспективи розвитку тваринництва України в умовах Євроінтеграції: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції: м. Херсон, ХДАУ, 23 вересня 2021: тези доповіді, Х., 2021. С. 29–32. *(Здобувачем проведено біоінформаційний аналіз, узагальнення результатів, написано тези доповідей).*

14. **Іващенко О. Ю.**, Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В. Генетична структура популяції корів сірої української породи за локусами кількісних ознак. Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми: 76 Всеукраїнська науково-практична конференція, м. Київ, 18–19 травня 2022 року: тези доповіді. К., 2022. С. 116–118. *(Здобувачем виконано частину експериментальних досліджень, здійснено узагальнення літературних джерел та написано тези доповідей).*

**Характеристика раціону для корів вітчизняних порід з добовим  
надоєм 28 кг, вмістом жиру в молоці 3,8 %, вмістом білка 3,4 % та  
живою масою 580–620 кг (ДП «ДГ «Гонтарівка», Харківська область)**

Корми	Міститься в 1 кг корму			В раціоні			
	СР,%	В 1 кг СР*		маса корму, кг		ОЕ	ПП
		ОЕ**	ПП***	фізична	СР		
Сіно вико-вівсяне	83	8,19	80,72	7	5,8	47,6	469
Силос кукурудзяний	25	9,20	56,0	28	7	64,4	392
Сінаж люцерновий	45	9,31	157,78	9	4,1	37,7	639
Комбікорм	87	40,36	538,82	6,9	5,9	78,9	828,9
Всього у раціоні	–	–	–	–	22,8	228,6	2328,9
Всього за нормою	–	–	–	–	22,9	237	2280
± до норми					-0,1	-8,4	+48,9

Примітки: \*СР – вміст сухої речовини в кормі (кг, або %); \*\*ОЕ – кількість обмінної енергії, МДж; \*\*\*ПП – кількість перетравного протеїну, г



### КАРТКА ЗВОТНОГО ЗВ'ЯЗКУ

Представлені в інформаційному листі матеріали дисертаційної роботи Іващенко Оксани Юріївни на тему: «Генетичне різноманіття популяцій великої рогатої худоби за асоційованими з резистентністю ДНК-маркерами», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 204 – технологія виробництва і переробки продукції тваринництва, використовуються у навчальному процесі при викладенні дисциплін «Інноваційні технології виробництва продукції тваринництва», «Технологія органічної продукції тваринництва» фахівцям освітніх рівнів «Бакалавр» та «Магістр» за спеціальністю «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва», а також у науковій роботі кафедри «Технології виробництва продукції тваринництва».

Матеріали дисертаційної роботи Іващенко О.Ю. розглянуто та затверджено на засіданні кафедри «Технології виробництва продукції тваринництва» (протокол № 1 від 01 вересня 2022 року).

Завідувач кафедри технології  
 виробництва продукції тваринництва  
 доктор сільськогосподарських наук,  
 професор

Анатолій ПОЛІЩУК

Декан факультету технології виробництва  
 і переробки продукції тваринництва,  
 доктор сільськогосподарських наук

Анатолій ШОСТЯ