

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

АЛЬШАМАЙЛЕХ ХАМЗА САМІ

УДК 636.2.034.082

ДИСЕРТАЦІЯ

ОБҐРУНТУВАННЯ КРИТЕРІЇВ ВІДБОРУ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ
МАРКЕР-АСОЦІЙОВАНОЇ СЕЛЕКЦІЇ У МОЛОЧНОМУ СКОТАРСТВІ

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

Х.С. Альшамайлех

Науковий керівник:

Кулібаба Роман Олександрович,
доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник

Київ – 2023

АНОТАЦІЯ

Альшамайлах Х.С. Обґрунтування критеріїв відбору із застосуванням маркер-асоційованої селекції у молочному скотарстві. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Дисертаційна робота присвячена вирішенню питання оцінки генетичної мінливості популяцій української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід за локусами кількісних ознак та визначенню зв'язку різних алельних варіантів поліморфних локусів з параметрами продуктивності тварин з метою обґрунтування критеріїв відбору із застосуванням методів маркер-асоційованої селекції та ДНК-типування.

Встановлено загальні генетико-популяційні параметри української чорно-рябої та червоної молочних порід корів, виявлено особливості перебігу мікроеволюційних процесів. Проведено дослідження з визначення особливостей генетичної структури дослідних популяцій за локусами пролактину (*PRL*), плацентарного лактогену (*PL*), рецептору гормону росту (*GHR*), лептину (*LEP*), фактору некрозу пухлини альфа (*TNF-α*) та міогенного фактору 5 (*MYF5*).

За результатами досліджень встановлено, що в обох дослідних популяціях корів локуси *PRL*, *GHR*, *LEP*, *MYF5* та *TNF-α* є поліморфними.

За *RsaI*-поліморфізмом у четвертому екзоні гену пролактину частота алеля С склала 0,85; алеля Т – 0,15 у популяції чорно-рябої молочної породи та 0,58 і 0,42 у популяції червоно-рябої молочної породи відповідно. У популяції корів української червоно-рябої молочної породи встановлено відхилення від стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом.

У свою чергу за *AluI*-поліморфізмом промоторного фрагменту гену рецептору гормону росту частота алеля *AluI*⁺ склала 0,61; алеля *AluI*⁻ – 0,39 у популяції чорно-рябої молочної породи та 0,54 і 0,46 у популяції червоно-рябої

молочної породи відповідно. Дослідні групи корів знаходяться в стані генетичної рівноваги, що свідчить про відсутність дії добору (мікроеволюційних змін) у популяціях.

Встановлено наявність різних алельних варіантів локусу лептину (*HphI*-поліморфізм у третьому екзоні гену, мутація A59V). У популяції чорно-рябої молочної породи частота алеля С склала 0,77; алеля Т – 0,23; у популяції червоно-рябої молочної породи – 0,72 і 0,28 відповідно. У популяції корів української чорно-рябої молочної породи встановлено відхилення від стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом.

За *TaqI*-поліморфізмом у другому інтроні гену міогенного фактору 5 частота алеля *TaqI*⁺ склала 0,65; алеля *TaqI*⁻ – 0,35 у популяції чорно-рябої молочної породи та 0,64 і 0,36 у популяції червоно-рябої молочної породи відповідно. Обидві групи корів знаходяться в стані генетичної рівноваги.

За використання оптимізованої методики проведення SSCP-аналізу досліджено поліморфізм фрагмента гену фактору некрозу пухлини альфа. За результатами аналізу виявлених одноланцюгових патернів визначено 6 алелів, розміром 450-1200 п.н. – алелі А, В та F у популяції чорно-рябої молочної породи; А, В, С, D, E, F – у популяції червоно-рябих корів. В обох випадках встановлено суттєве переважання частоти алелю А – 0,58 та 0,54 відповідно. Слід відмітити, що єдиний тип гомозиготних особин, які виявлені в обох дослідних породах ВРХ, відноситься до генотипу АА. Всі інші алельні варіанти представлені у вигляді гетерозиготних особин.

Локус *PL* (за *RsaI*-поліморфізмом у п'ятому екзоні) є мономорфним в обох популяціях.

Як слідує з результатів досліджень українська червоно-ряба порода корів демонструє значно більший рівень поліморфізму локусу *TNF-α* за кількістю виявлених алелів та генотипів, але, приймаючи до уваги той факт, що значення частоти домінуючого алеля А є практично однаковою в обох популяціях, а також наявність гомозигот одного типу, можна зробити висновок про загальну спрямованість мікроеволюційних процесів у породах тварин внаслідок

проведення селекційної роботи в напрямку підвищення параметрів молочної продуктивності.

З метою проведення порівняльного аналізу генетичної структури різних популяцій (Pop 1 та Pop 2) української чорно-рябої молочної породи відбирали біологічний матеріал у різних господарствах Харківської області.

За результатами проведених досліджень з'ясовано, що різні популяції корів української чорно-рябої молочної породи характеризуються превалюванням «домінуючих» алелів за локусами *PRL*, *LEP* та *TNF- α* , проте й вираженими відмінностями у значеннях частот генотипів та загальних параметрів генетичної мінливості. За результатами проведеного аналізу встановлено наступні закономірності: мономорфний характер локусу *PL* в обох дослідних популяціях; превалювання частот зустрічальності «домінуючих алелів» за різними локусами (С над Т за локусом *PRL*, С над Т за локусом *LEP*, А над В и F за локусом *TNF- α*) в обох групах тварин; виражені відмінності у значеннях частот зустрічальності різних генотипів за кожним з локусів; суттєві відмінності в показниках фактичної та очікуваної гетерозиготності (відповідно і в рівні генетичної мінливості популяцій); суттєві відмінності в значенні індексу фіксації Райта (у кожній популяції виявлено відмінності за значенням ексцесу гетерозиготних та гомозиготних особин). Відповідно, незважаючи на подібність за значенням частот алелів, різні популяції корів української чорно-рябої молочної породи суттєво відрізняються за загальними показниками генетичної мінливості. В умовах відсутності використання спрямованого добору за генотипом (MAS, геномна селекція) популяції відрізняються одна від одної за окремими локусами внаслідок відмінностей у вихідному племінному матеріалі, а також можливого впливу таких мікроеволюційних факторів, як добір та дрейф генів. Таким чином, отримані результати вказують на необхідність індивідуального аналізу параметрів генетичної структури у випадку з окремими популяціями однієї породи корів.

У свою чергу, варіювання показників генетичної мінливості (H_e) безпосередньо залежить від маркера, який використовується, – у випадку з SSCP значення цього показника суттєво вище ніж його ж за використання PCR-RFLP.

На наступному етапі дисертаційних досліджень проводили аналіз продуктивних якостей особин з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами. За результатами проведених досліджень встановлені значення параметрів молочної продуктивності корів (надій за 305 днів лактації, вміст молочного жиру та білка) з різними генотипами для трьох лактацій.

За результатами проведених досліджень встановлено, що за локусом пролактину підвищеними значеннями параметру надою за 305 днів лактації характеризуються особини з протилежними гомозиготними генотипами для дослідних порід. Для української чорно-рябої молочної породи бажаним генотипом є СС, для української червоно-рябої молочної породи – генотип ТТ.

У свою чергу, за локусом рецептора гормону росту зафіксовано переважні значення показника вмісту жиру в молоці для гомозиготних за алелем $AluI^+$ особин української чорно-рябої породи ($p < 0,05$). Для першої лактації різниця між значеннями показників для протилежних гомозиготних генотипів досягала 5,9%; для другої – 4,1%; для третьої – 3,5% відповідно.

За локусом лептину з'ясовано, що гомозиготні за алелем С особини характеризуються більшими значеннями параметру надою за 305 днів лактації для обох дослідних порід корів ($p < 0,05$). Для чорно-рябої молочної породи різниця у значеннях показнику між особинами з різними гомозиготними генотипами складає 19,7% на першу лактацію; для червоно-рябої – 18,8% на першу, 16,8% – на другу та 13,5% на третю лактацію відповідно. Для чорно-рябої породи встановлений зв'язок генотипу ТТ з вмістом жиру в молоці ($ТТ > СС$; 3,3% на першу лактацію), для червоно-рябої – виявлено переважання гетерозиготних особин за цим показником протягом всіх трьох лактацій ($СТ > СС$; 2,3%, 2,1% та 1,6% відповідно).

Встановлено, що для корів української чорно-рябої молочної породи за параметром надою за 305 днів лактації за локусом міогенного фактору 5

домінуючими значеннями показнику характеризуються особини з гетерозиготним генотипом ($p < 0,05$). Різниця у значеннях показнику між особинами з різними генотипами (TaqI⁺/TaqI⁻ та TaqI⁻/TaqI⁻) складає 16,8% для першої лактації та 14,1% для другої.

За результатами проведених досліджень визначені перспективні комплексні генотипи для кожної з порід залежно від спрямованості селекційних задач.

Як слідує за результатами досліджень для корів української чорно-рябої молочної породи найбільш перспективними для дослідження та використання у племінних програмах локусами є пролактин (RsaI-поліморфізм у п'ятому екзоні), лептин (HphI-поліморфізм у третьому екзоні), рецептор гормону росту (AluI-поліморфізм промоторного фрагменту) та міогенний фактор 5 (TaqI-поліморфізм у другому інтроні). Для цієї породи формула бажаних генотипів у напрямку збільшення значення параметрів надою за 305 днів лактації – $PRL^{CC}LEP^{CC}MYF5^{TaqI^{+}/TaqI^{-}}$; у напрямку збільшення вмісту молочного жиру – $GHR^{AluI^{+}/AluI^{+}}LEP^{TT}$.

У свою чергу, для корів української червоно-рябої молочної породи найбільш перспективними для дослідження є локуси пролактину та лептину. Для цієї породи формула бажаних генотипів у напрямку збільшення значення параметрів надою за 305 днів лактації – $PRL^{TT}LEP^{CC}$; у напрямку збільшення вмісту молочного жиру – LEP^{CT} .

Отже, запропоновані методичні підходи, в цілому, доповнюють класичні методи роботи у племінній справі та, у випадку їх реалізації, будуть сприяти максимально можливій реалізації продуктивного потенціалу тварин (велика рогата худоба дослідних порід) в напрямку підвищення параметрів молочної продуктивності.

Ключові слова: ДНК-маркер, популяція, селекція, розведення, ген, локус, алель, генотип, рестрикція, поліморфізм, генетична мінливість, продуктивність, велика рогата худоба.

ABSTRACT

Alshamaileh H.S. Substantiation of selection criteria using marker-assisted selection in dairy cattle-breeding. Qualifying scientific paper as manuscript.

Doctoral dissertation with a degree in 204 «Animal products manufacturing and processing technology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2023.

The dissertation is devoted to the decision of estimation of genetic variability of populations of Ukrainian black-and-white and red-and-white dairy breeds by quantitative trait loci and to definition of association of various allelic variants with animal productivity traits for substantiation of selection criteria with using of marker-assisted selection and DNA-typing.

The general population-genetics parameters of Ukrainian black-and-white and red-and-white dairy breeds are studied, the microevolutionary processes specifications are revealed. A studies of genetic structure characteristics of experimental populations by prolactin gene (*PRL*), placental lactogen gene (*PL*), growth hormone receptor gene (*GHR*), leptin gene (*LEP*), tumor necrosis factor alpha gene (*TNF- α*) and myogenic growth factor 5 gene (*MYF5*) were carried out.

The results showed that the *PRL*, *GHR*, *LEP*, *MYF5* and *TNF- α* genes were polymorphic in both experimental cow populations.

By *RsaI*-polymorphism in the fourth exon of the prolactin gene, the frequency of the C allele was 0.85; T allele – 0.15 in the population of black-and-white dairy breed and 0.58 and 0.42 in the population of red-and-white dairy breed, respectively. The deviation from Hardy-Weinberg genetic equilibrium state in the red-and-white dairy cow population was detected.

In turn, according to the *AluI*-polymorphism in the promoter fragment of the growth hormone receptor gene, the frequency of the *AluI*⁺ allele was 0.61; *AluI*⁻ allele – 0.39 in the population of black-and-white dairy breed and 0.54 and 0.46 in the population of red-and-white dairy breed, respectively. The experimental animal groups

were in genetic equilibrium state, that indicates the absence of selection processes (microevolutionary changes) in populations.

The presence of different allelic variants for leptin locus (HphI-polymorphism in the third exon, mutation A59V) was founded. In the population of black-and-white dairy cows, the frequency of the C allele was 0.77; allele T – 0.23; in the population of red-and-white dairy cows – 0.72 and 0.28, respectively. In the population of cows of black-and-white dairy breed deviations from Hardy-Weinberg genetic equilibrium state was detected.

By TaqI-polymorphism in the second intron of the myogenic growth factor 5 gene, the frequency of the TaqI + allele was 0.65; TaqI- allele – 0.35 in the population of black-and-white dairy breed and 0.64 and 0.36 in the population of red-and-white dairy breed, respectively. Both cow populations were in a genetic equilibrium state.

Using the developed SSCP-analysis technique, the polymorphism of the fragment of tumor necrosis factor-alpha gene was studied. According to the analysis results of the detected single-chain patterns, 6 alleles, 450-1200 bp in size, were identified – alleles A, B and F in the population of black-and-white dairy breed; A, B, C, D, E, F – in the population of red-and-white cows. In both cases, a significant predominance of allele frequency A (0.58 and 0.54) was detected. It should be noted that the only one type of homozygous individuals, belongs to the genotype AA, were found in both cattle breeds. All addition allelic variants were presented in the form of heterozygous individuals.

The *PL* locus (by RsaI-polymorphism in the fifth exon) was monomorphic in both cattle populations.

As follows from the results of research, the Ukrainian red-and-white breed shows a much higher level of polymorphism of the *TNF- α* locus by number of detected alleles and genotypes, but considering the fact that the frequencies of the dominant allele A were almost identical in both populations and presence only one type of homozygotes as well, it is possible to make a conclusion about the general direction of microevolutionary processes in animal breeds due to carrying out selection work in the direction for increase of dairy productivity parameters.

For the purpose of comparative analysis of the genetic structure of different populations (Pop 1 and Pop 2) of Ukrainian black-and-white dairy breed the biological material from different farms of the Kharkiv region was obtained.

Studies have shown that different populations of Ukrainian black-and-white dairy cows were characterized by a predominance of «dominant» alleles by *PRL*, *LEP* and *TNF- α* loci, but had some differences in genotype frequencies and general parameters of genetic variability. According to the results of the analysis, the following regularities were established: monomorphic character of the PL locus in both experimental populations; the prevalence of «dominant alleles» at different loci (allele C frequency over T by *PRL*, allele C frequency over T by *LEP*, allele A frequency over B and F by *TNF- α*) in both groups of animals; pronounced differences in the values of the frequencies of different genotypes at each of the loci; significant differences in parameters of actual and expected heterozygosity (respectively in the level of genetic variability of populations); significant differences in the value of the Wright fixation index (differences in the value of excess of heterozygous and homozygous individuals were found in each population). Accordingly, despite the similarity in the value of allele frequencies, different populations of cows of the Ukrainian black-and-white dairy breed differ significantly in general indicators of genetic variability. In the absence of the use of targeted selection by genotype (MAS, genomic selection) populations differ by individual loci due to differences in the original breeding material, as well as the possible influence of microevolutionary factors such as gene selection and genetic drift. Thus, the obtained results indicate the necessity for individual analysis of genetic structure parameters in the case of different populations of one cattle breed.

In turn, the variation of genetic variability (H_e) directly depends on the marker that used – in the case of SSCP, the value of this indicator is significantly higher than using PCR-RFLP.

At the next stage of the research, the analysis of productive traits of individuals with different genotypes by identified polymorphic loci was performed. According to the results of the study, the values of milk productivity parameters of cows (305-day

cumulative milk yield, milk fat and protein content) with different genotypes for three lactations were founded.

According to the results of the study it was founded that the increased values of the milk yield for 305 days were characterize individuals with opposite homozygous genotypes by the prolactin locus for different cattle populations. For the Ukrainian black-and-white dairy breed the desirable genotype was CC, for the Ukrainian red-and-white dairy breed – the TT genotype.

In turn, at the growth hormone receptor gene, the predominant values of the fat content of milk for homozygous individuals by AluI+ allele for Ukrainian black-and-white cows ($p < 0.05$) were recorded. For the first lactation, the difference between the values reached 5.9%; for the second – 4.1%; for the third – 3.5% respectively.

For leptin locus, it was found that homozygous individuals by C allele are characterized by higher values of the milk yield for 305 lactation days for both experimental cattle breeds ($p < 0.05$). For black-and-white dairy breed, the difference in the values of this trait between individuals with different homozygous genotypes was 19.7% for the first lactation; for red-and-white dairy breed – 18.8% for the first, 16.8% – for the second and 13.5% for the third lactation, respectively. For the black-and-white dairy breed was founded the associations of TT genotype with increased milk fat content (TT > CC; 3.3% for first lactation); for the red-and-white dairy breed was founded the predominance of heterozygous individuals by this parameter for all three lactations (CT > CC; 2.3%, 2.1% and 1.6%).

It was shown that for Ukrainian black-and-white cows by the parameter of milk yield for 305 lactation days the dominant values were characteristic for the individuals with heterozygous genotype by myogenic factor 5 locus ($p < 0.05$). The difference in the values of this parameter between individuals with different genotypes (TaqI+/TaqI- and TaqI-/TaqI-) was 16.8% for the first lactation and 14.1% for the second.

According to the results of the study, perspective complex genotypes for each of the breeds depending on the direction of selection tasks were determined.

For the population of the Ukrainian black-and-white dairy breed, the most perspective functional units for research and use in breeding programs were prolactin

gene (RsaI-polymorphism in the fifth exon), leptin gene (HphI-polymorphism in the third exon), growth hormone receptor gene (AluI-polymorphism of the promoter fragment) and myogenic factor 5 gene (TaqI-polymorphism in the second intron). For this breed, the formula of the desired genotypes in the direction of increasing the value of milk yield for 305 lactation days – $PRL^{CC}LEP^{CC}MYF5^{TaqI+/TaqI-}$; in the direction of increasing the milk fat content – $GHR^{AluI+/AluI+}LEP^{TT}$.

In turn, prolactin and leptin loci are the most perspective for the population of the Ukrainian red-and-white dairy breed. For this breed, the formula of the desired genotypes in the direction of increasing the value of milk yield for 305 lactation days – $PRL^{TT}LEP^{CC}$; in the direction of increasing the milk fat content – LEP^{CT} .

Thus, the proposed methodological approaches, in general, complement the classical methods of breeding work and, in case of their implementation, will contribute to the maximum possible realization of the animal productive potential (experimental cattle breeds) in the direction for increasing milk productivity.

Key words: DNA-marker, population, selection, breeding, gene, locus, allele, genotype, restriction, polymorphism, genetic diversity, productivity, cattle.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Альшамайлех Х., Кулібаба Р.О. Генетична структура популяції корів української чорно-рябої молочної породи за локусами пролактину та плацентарного лактогена. *Таврійський науковий вісник*. 2019. № 109 (2). С. 3–8. (Дисертант провів дослідження і аналіз даних, біометричну обробку, підготував статтю до друку).

2. Альшамайлех Х.С., Кулібаба Р.О., Ляшенко Ю.В., Борзова Г.С. Поліморфізм генів рецептора гормону росту та міогенного фактору 5 в популяціях корів молочних порід. *Науково-технічний бюлетень ІТ НААН*. 2021. № 125. С. 69–78. (Здобувач брав участь у відборі дослідного матеріалу, інтерпретації та описі отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку).

3. Альшамайлех Х., Кулібаба Р.О., Ляшенко Ю.В. Аналіз особливостей генетичної структури різних популяцій корів української чорно-рябої молочної породи за поліморфізмом локусів кількісних ознак. *Таврійський науковий вісник*. 2021. № 119. С. 152–159. (Здобувачем здійснено проведення експериментів, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів).

4. Альшамайлех Х.С., Ляшенко Ю.В., Кулібаба Р.О. Параметри продуктивності корів молочних порід з різними генотипами за локусами *TNF-α* та *MYF5*. *Науково-технічний бюлетень ІТ НААН*. 2022. №127. С. 69–79. (Здобувач брав участь у відборі дослідного матеріалу, проведенні досліджень, описі отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку).

Стаття у періодичному науковому виданні, що індексується у наукометричній базі SCOPUS

5. Kulibaba R., Liashenko Y., Yurko P., Sakhatskyi M., Osadcha Y., **Alshamaileh H.** Polymorphism of LEP and TNF- α Genes in the Dairy Cattle Populations of Ukrainian Selection. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*. 2021.

Vol. 34(1). P. 180–191. doi:10.37077/25200860.2021.34.1.16 *(Дисертант провів частину досліджень, аналіз отриманих даних, підготував статтю).*

Додатково відображають наукові результати дисертації

6. 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. *(Здобувачем проведено частку експериментальних досліджень, викладення частини основного змісту, аналіз результатів).*

Тези наукових доповідей

7. Альшамайлех Х.С. Питання щодо перспективи використання MAS у селекційній роботі з локальними породами великої рогатої худоби України XIV. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві», м. Харків, 16-17 вересня 2020 р.: тези доповіді. Харків: Інститут тваринництва НААН, 2020. С. 20–23.

8. Кулібаба Р.О., Альшамайлех Х.С. Дослідження поліморфізму функціональних генів – невід’ємна складова загальної стратегії MAS. Міжнародна науково-практична конференція «Наукові і технологічні виклики тваринництва у XXI столітті», присвячена 90-річчю від дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора, академіка УААН і РААН Г.О. Богданова, м. Київ, 12-14 березня 2020 р.: тези доповіді. Київ: НУБіП України, 2020. С. 61–64. *(Дисертант провів частину досліджень і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

9. Кулібаба Р.О., Альшамайлех Х.С. Аналіз поліморфізму ДНК за використання SSCP-маркерів. Всеукраїнська науково-практична інтернет конференція присвячена 100-річчю факультету технологій продукції тваринництва та менеджменту «Актуальні питання технологій тваринництва та ветеринарної медицини», м. Харків, 2020 р.: тези доповіді. Харків: ХДЗВА, 2020. С. 6–10. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, викладення частини основного змісту, аналіз результатів).*

10. **Альшамайлех Х.С.** Поліморфізм локусу TNF- α у популяції корів української чорно-рябої молочної породи. 75 Всеукраїнська науково-практична конференція «Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми», м. Київ, 25-26 березня 2021 р.: тези доповіді. Київ: НУБіП України, 2021. С. 98–100.

11. **Альшамайлех Х.С.,** Кулібаба Р.О. Генетична структура популяції корів української чорно-рябої породи за локусами кількісних ознак. XV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Науковий прогрес в тваринництві та птахівництві», м. Харків, 26-27 серпня 2021 р.: тези доповіді. Харків: Інститут тваринництва НААН, 2021. С. 33–36. *(Здобувачем здійснено проведення частини експериментів, аналіз результатів, сформульовано висновки).*

12. **Альшамайлех Х.С.,** Кулібаба Р.О. Продуктивні якості корів молочних порід з різними генотипами за локусами пролактину та рецептору гормону росту. Всеукраїнська науково-практична конференція «Сучасна наука: стан та перспективи розвитку тваринництва України в умовах Євроінтеграції», м. Херсон, 23 вересня 2021р.: тези доповіді. Херсон: ХДАУ, 2021. С. 4–8. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, сформульовано висновки).*

13. Кулибаба Р.А., **Альшамайлех Х.,** Ляшенко Ю.В., Онищенко А.В. К вопросу о сравнении генетической структуры различных популяций крупного рогатого скота по локусам количественных признаков. *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: материалы XXIV Международной научно-практической конференции.* Горки, 2021. С. 54–58. *(Здобувач брав участь у відборі дослідного матеріалу, інтерпретації та описі отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1. Маркер-асоційована селекція (MAS) у тваринництві – сучасний стан та перспективи використання.....	25
1.2. Пошук новий об’єктів досліджень – основа стратегії MAS	27
1.3. Технологія молекулярно-генетичних маркерів – основний інструмент сучасної селекції у тваринництві.....	30
1.4. Перспективні локуси для вирішення завдань MAS у молочному скотарстві: <i>PRL, PL, LEP, GHR, TNF-α, MYF5</i>	35
1.4.1. Ген пролактину (<i>PRL</i>).....	35
1.4.2. Ген плацентарного лактогену (<i>PL</i>).....	37
1.4.3. Ген лептину (<i>LEP</i>).....	39
1.4.4. Ген рецептору гормону росту (<i>GHR</i>).....	40
1.4.5. Ген фактору некрозу пухлини- α (<i>TNF-α</i>)	42
1.4.6. Ген міогенного фактору 5 (<i>MYF5</i>)	43
1.5. Обґрунтування напряму дисертаційних досліджень.....	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	47
2.1. Місце проведення і матеріали досліджень	47
2.2. Перелік використаного обладнання	49
2.3. Методи досліджень	49
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	55
3.1. Дослідження ефективності та апробація методів генотипування особин ВРХ за різними типами ДНК-маркерів.....	55
3.1.1. Визначення ефективності ампліфікації таргетних фрагментів локусів <i>PRL</i> та <i>PL</i> з метою подальшого генотипування за використання <i>PCR-RFLP</i> маркерів	55

3.1.2. Оптимізація методу генотипування особин за SSCP-маркерами локусу <i>TNF-α</i>	60
3.2. Поліморфізм локусів <i>PRL</i> , <i>PL</i> , <i>GHR</i> , <i>LEP</i> , <i>TNF-α</i> та <i>MYF5</i> у дослідних популяціях великої рогатої худоби	66
3.2.1. <i>RsaI</i> -поліморфізм четвертого екзону гену пролактину	67
3.2.2. <i>RsaI</i> -поліморфізм у п'ятому екзоні гену плацентарного лактогену	71
3.2.3. <i>AluI</i> -поліморфізм промоторного фрагменту гену рецептору гормону росту	75
3.2.4. <i>HphI</i> -поліморфізм у третьому екзоні гену лептину (мутація A59V)...	79
3.2.5. <i>TaqI</i> -поліморфізм у другому інтроні гену міогенного фактору 5	83
3.2.6. SSCP поліморфізм у другому екзоні гену фактору некрозу пухлини-α	87
3.3. Аналіз особливостей генетичної структури різних популяцій корів української чорно-рябої молочної породи за локусами кількісних ознак	92
3.4. Аналіз зв'язку виявлених алельних варіантів поліморфних локусів з показниками молочної продуктивності корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід	100
3.4.1. Продуктивні якості корів молочних порід за різними генотипами локусу пролактину	103
3.4.2. Продуктивні якості корів молочних порід за різними генотипами локусу рецептору гормону росту	106
3.4.3. Продуктивні якості корів молочних порід за різними генотипами локусу лептину	109
3.4.4. Продуктивні якості корів молочних порід за різними генотипами локусу міогенного фактору 5	113
3.4.5. Продуктивні якості корів молочних порід за різними генотипами гену фактору некрозу пухлини-α	117
3.4.6. Порівняльний аналіз параметрів молочної продуктивності корів дослідних порід за різними генотипами виявлених поліморфних локусів	120

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	125
ВИСНОВКИ.....	135
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	139
ДОДАТКИ.....	167

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

- bp – base pair;
- GHR* – ген рецептору гормону росту;
- Indel – інсерція/делеція;
- LEP* – ген лептину;
- MAS – маркер-асоційована селекція;
- MYF5* – ген міогенного фактору росту 5;
- РААГ – поліакриламідний гель;
- PCR-RFLP – полімеразна ланцюгова реакція поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів;
- PL* – ген плацентарного лактогену;
- PRL* – ген пролактину;
- QTL – локуси кількісних ознак;
- RFLP – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів;
- SNP – однонуклеотидний поліморфізм;
- SSCP – одноланцюговий конформаційний поліморфізм;
- SSR – короткі прості послідовності;
- TNF- α* – ген фактору некрозу пухлини- α ;
- ВРХ – велика рогата худоба;
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
- п.н. – пар нуклеотидів;
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція.

ВСТУП

Актуальність теми. На сучасному етапі розвитку сільського господарства у цілому, а також тваринництва як невід’ємної його складової, використання ДНК-орієнтованих технологій вже є не лише додатковим інструментом, а навпаки, відноситься до невід’ємного атрибуту загальної стратегії [1, 2]. Різноманітні методичні підходи, що базуються на використанні різних типів молекулярно-генетичних маркерів, дали змогу суттєвим чином покращити досягнення селекції, підвищити господарсько-корисну цінність тварин, забезпечити можливість здійснення контролю за проведенням племінної роботи на недосяжному для класичного інструментарію рівні [3-5]. І, дійсно, як показали результати досліджень, проведені, у тому числі, й в Україні (на різних видах сільськогосподарських тварин), використання лише фенотипових підходів у якості основного інструменту оцінки ефективності селекційної роботи – є абсолютно недостатнім і, в умовах теперішніх ринкових реалій, без залучення ДНК-технологій призводить до суттєвого відставання в розвитку цілої галузі [5, 6]. Проте, як вже було неодноразово продемонстровано, будь-який аналіз рівня мінливості, заснований на фенотиповій оцінці, залишає у тіні гігантський пласт прихованої генетичної мінливості, що призводить до зниження загальної ефективності селекційної роботи у цілому. Саме тому перспектива використання ДНК-технологій в контексті селекційно-племінної роботи у тваринництві відноситься до питання більш риторичного характеру. Широке застосування сучасних досягнень генетики призвело до ситуації, коли для багатьох видів тварин прогрес у напрямку підвищення продуктивних якостей дещо зменшився, внаслідок виникнення проблеми вичерпування генетичних ресурсів [7]. І в цьому ключі на перший план, у контексті генетичних досліджень, виходять локальні і генофондні породи тварин [8, 9].

На теперішній час накопичено достатній масив інформації щодо поліморфізму генів, які пов’язані з господарсько-корисними ознаками великої рогатої худоби. Широко відомо, що алельні варіанти генів капа-казеїну (*k-CN*) і бета-лактоглобуліну (*βLG*) асоційовані з білковомолочністю та технологічними

властивостями молока [10-12]. У свою чергу, для підвищення параметрів м'ясної продуктивності великої рогатої худоби використовують низку селекційних заходів за локусами гормону росту (*GH*), рецептору гормону росту (*GHR*), міостатину (*MSTN*) та іншими [13-15].

Вітчизняними науковцями проведені масштабні дослідження генетичної структури популяцій великої рогатої худоби різних порід та напрямів продуктивності (української чорно-рябої, червоно-рябої, голштинської, симентальської, бурої карпатської, червоної польської та ін.) за такими структурними генами як *k-CN*, *βLG*, *LEP*, *GH*, *PIT1*, *TG*, *MSTN* та іншими [16-21].

Однак, поряд з вищенаведеним, досить широко відомими маркерними генами, значний інтерес викликає також і пошук нових об'єктів для досліджень, яким приділяється значна увага у контексті полігенної природи продуктивних ознак. Даний підхід досить широко використовується у світовій практиці, особливо при вивченні генетичної мінливості популяцій аборигенних порід великої рогатої худоби та інших видів сільськогосподарських тварин [22, 23]. З даної точки зору до одних з найбільш актуальних та нових кандидатів відносяться такі об'єкти, як гени β-казеїну, лептину, фактору некрозу пухлин альфа. Використання нових таргетних локусів для вивчення особливостей генетичної структури популяцій ВРХ різних порід вітчизняної селекції може стати необхідним фундаментом для проведення подальшої племінної роботи з метою максимального розкриття продуктивного потенціалу тварин.

Необхідність детального аналізу особливостей генетико-популяційної структури великої рогатої худоби українських молочних порід за низкою нових поліморфних локусів, а також визначення параметрів продуктивності особин з різними генотипами для обґрунтування перспективних завдань маркер-асоційованої селекції і зумовили актуальність та спрямованість даної дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження за темою дисертаційної роботи виконані на кафедрі біології тварин факультету тваринництва та водних біоресурсів Національного університету

біоресурсів і природокористування України в рамках ініціативної тематики «Удосконалити фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні методи прогнозування продуктивності тварин» (номер державної реєстрації 0121U112146).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є дослідження генетичної структури популяцій великої рогатої худоби молочних порід за комплексом локусів кількісних ознак (QTL) та визначення параметрів продуктивності корів із різними генотипами за виявленими поліморфними локусами для обґрунтування критеріїв добору із застосуванням методів маркер-асоційованої селекції.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

- Оптимізувати методи генотипування особин великої рогатої худоби за локусами кількісних ознак з використанням маркерів PCR-RFLP та SSCP;
- Вивчити поліморфізм генів пролактину (*PRL*), плацентарного лактогену (*PL*), рецептору гормону росту (*GHR*), лептину (*LEP*), фактору некрозу пухлини- α (*TNF-\alpha*) та міогенного фактору росту 5 (*MYF5*) в дослідних популяціях великої рогатої худоби;
- Виявити специфіку генетичної структури дослідних популяцій тварин за сукупністю локусів кількісних ознак;
- Проаналізувати генетичну структуру двох популяцій корів української чорно-рябої молочної породи за поліморфізмом локусів кількісних ознак;
- Дослідити параметри молочної продуктивності корів із різними генотипами за виявленими поліморфними локусами;
- Розробити критерії відбору особин у молочному скотарстві на основі методів маркер-асоційованої селекції.

Об'єкт дослідження: генетична структура популяцій корів молочних порід вітчизняної селекції, продуктивність корів молочних порід із різними генотипами за виявленими поліморфними локусами.

Предмет дослідження: поліморфізм генів кількісних ознак у різних популяціях великої рогатої худоби, генетико-популяційні параметри дослідних популяцій тварин, показники молочної продуктивності корів різних порід.

Методи дослідження: *молекулярно-генетичні* – виділення ДНК з біологічного матеріалу, проведення ампліфікації та рестрикції, проведення електрофоретичного розподілу дослідних фрагментів ДНК; *популяційно-генетичні* – визначення частот алелів та генотипів за виявленими поліморфними локусами, параметрів очікуваної та фактичної гетерозиготності, показників F-статистик Райта, ефективної кількості алелів, відповідності стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом; *зоотехнічні* – визначення показників молочної продуктивності корів; *статистичні* – біометрична обробка результатів досліджень, параметричні та непараметричні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше встановлено особливості генетичної структури популяцій корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід за локусами пролактину (*PRL*), плацентарного лактогену (*PL*), рецептору гормону росту (*GHR*), лептину (*LEP*), фактору некрозу пухлини- α (*TNF- α*) та міогенного фактору росту 5 (*MYF5*).

Оптимізовано та апробовано методику SSCP-типування поліморфізму локусу *TNF- α* .

Проаналізовано відмінності та особливості генетичної структури двох різних популяцій корів породи українська чорно-ряба молочна за комплексом локусів кількісних ознак.

Вперше проаналізовано параметри продуктивності корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід із різними генотипами за локусами пролактину (*PRL*), рецептору гормону росту (*GHR*), лептину (*LEP*), фактору некрозу пухлин- α (*TNF- α*) та міогенного фактору 5 (*MYF5*).

Практичне значення роботи. За результатами досліджень визначено низку перспективних генів-кандидатів для проведення спрямованої селекційної роботи в напрямку підвищення параметрів продуктивності тварин. Оптимізовано та апробовано методику SSCP-типування особин за локусом фактору некрозу

пухлин- α ($TNF-\alpha$). Встановлений зв'язок різних алельних варіантів виявлених поліморфних локусів з показниками продуктивності корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід. Розроблено формули комплексних генотипів у напрямку підвищення молочної продуктивності для кожної з дослідних порід, що дає змогу проводити селекційну роботу за умов створення ліній тварин з бажаними генотипами.

Матеріали дисертаційних досліджень використовуються у навчальному процесі при викладенні дисциплін, що підтверджується актами про впровадження: «Основи молекулярної біотехнології та генної інженерії», «Молекулярно-генетичні методи діагностики» кафедри біотехнології ім. академіка Ф.І. Осташка факультету біотехнології та природокористування Харківської державної зооветеринарної академії.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто проаналізовано наукові джерела за темою дисертаційної роботи, проведено відповідний патентний пошук, проведені заплановані дослідження, отримано експериментальний матеріал, здійснено його статистичну обробку, аналіз, інтерпретацію та узагальнення отриманих результатів, проведено підготовку до друку наукових публікацій, оформлено рукопис дисертаційної роботи. Науковий напрям, загальна схема, концепція та методика досліджень розроблені спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлені здобувачем на: засіданнях рад молодих вчених Національного університету біоресурсів та природокористування України (2018 – 2020); XIII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Науковий прогрес в тваринництві та птахівництві» (Харків, 2019); Міжнародній науково-практичній конференції «Наукові і технологічні виклики тваринництва у XXI столітті», присвяченої 90-річчю від дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора, академіка УААН і РААН Г.О. Богданова (Київ, 2020); XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві»,

присвяченої 90-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Бугрова Олексія Дмитровича (Харків, 2020); Всеукраїнській науково-практичній інтернет конференції, присвяченої 100-річчю факультету технологій продукції тваринництва та менеджменту «Актуальні питання технологій тваринництва та ветеринарної медицини» (Харків, 2020); 75-ї Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми» (Київ, 2021); XXIV Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства» (Горки, 2021); XV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Науковий прогрес у тваринництві і птахівництві» (Харків, 2021), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасний стан та перспективи розвитку тваринництва України в умовах євроінтеграції» (Херсон, 2021).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, з них: 4 – публікації у наукових фахових виданнях України; 1 – у виданні, що індексується у наукометричній базі даних Scopus; 1 – колективна монографія; 7 – тези доповідей у матеріалах конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається з анотацій українською та англійською мовами, переліку умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Дисертаційна робота викладена на 172 сторінках комп'ютерного тексту, містить 29 таблиць, 33 рисунки. Список використаних джерел літератури включає 231 найменування, у тому числі 182 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Маркер-асоційована селекція (MAS) у тваринництві – сучасний стан та перспективи використання

Розвиток науки завжди корелює, за рідкісним винятком, з відповідним розвитком практичних аспектів її використання. За винятком деяких, практично «абсолютно теоретичних» галузей людського знання, природничі науки повністю підкоряються цьому правилу і, виходячи з вищевикладеного, їх досягнення, рано чи пізно, обов'язково втілюються на практиці. У сучасній селекції тварин, у контексті дисертаційної роботи буде йти мова про селекцію саме великої рогатої худоби, в якості фундаменту виступає генетика, а її практичним втіленням слугує досягнення селекційно-племінної роботи з тваринами – нові породи, лінії, експериментальні популяції, показники продуктивності окремих тварин та їх груп і так далі. У будь-якому випадку, для ефективного існування в сучасному світі, наповненому конкурентною боротьбою за виживання, селекційна робота завжди повинна йти в одному темпі з останніми досягненнями наукового прогресу. В іншому випадку, результати селекції, які виражаються, в першу чергу, показниками продуктивності відповідних тварин, не зможуть конкурувати з результатами своїх закордонних аналогів, що, в контексті загальних тенденцій до глобалізації, призведе до зникнення вихідних популяцій, що не мають виражених комерційних переваг. Таким чином, питання відставання у випадку з практичними аспектами генетики ВРХ неминуче призводить до актуалізації проблеми збереження генофонду. В Україні, незважаючи на весь наявний потенціал, ситуація знаходиться саме в такому стані [24, 25].

Починаючи з середини 80-х років минулого сторіччя, коли зусиллями Кері Мюлліса був розроблений метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), використання досягнень молекулярної генетики вже перестало бути чимось

винятковим і екзотичним, а навпаки, набуло рис фактично вже рутинної практики і стало мейнстрімом [26]. За декілька років завдяки результатам «наукового прориву» відбулося широкомасштабне впровадження ДНК-технологій у найрізноманітніші сфери тваринництва – починаючи від диференціальної діагностики різноманітних захворювань тварин і закінчуючи забезпеченням проведення ефективної племінної роботи [27-29]. Завдяки високому рівню ефективності, що виражається, в першу чергу, в економічних показниках, селекція з використанням молекулярно-генетичних маркерів стала вже обов'язковим інструментом у тваринництві, що дало змогу досягнути суттєвого прогресу в результатах племінної роботи з птицею, великою рогатою худобою, свинями, кроликами та іншими видами сільськогосподарських тварин [30-34].

Основне завдання практичної генетики в селекції, в даному контексті, полягає в способі оцінки продуктивного потенціалу окремих особин та в їх подальшому відборі для розведення. Аналіз алельного стану функціональних генів, який здійснюється за використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів, на рівні безпосередньо ДНК, дозволяє уникнути різного роду помилок, які притаманні класичним методам відбору, та з недосяжною раніше точністю і відтворюваністю дає можливість для відбору певних особин, які є носіями відповідних алельних варіантів за цілим комплексом поліморфних локусів [35, 36]. Відбір найбільш цінних, з точки зору дослідників, особин, дає, у свою чергу, можливість проводити спрямовану селекційну роботу й отримувати експериментальні лінії тварин з точно встановленими комплексними генотипами.

Загальний план проведення селекції за допомогою маркерів можна умовно розділити на кілька етапів (у деяких випадках використовують і додатковий інструментарій) [37, 38]. На першому етапі проводять первинний добір обраних мішеней (генів, окремих мутацій); на наступному – аналізують особливості генетичної структури дослідних популяцій тварин за обраними локусами (у тому числі проводять аналіз груп зчеплення) [39]. Далі проводять дослідження

асоціацій виявлених поліморфних локусів з продуктивними ознаками тварин. У свою чергу, вивчення генетико-популяційних параметрів дослідних груп належить до найважливіших кроків у всій стратегії племінної роботи з використанням MAS. Саме від особливостей розподілу частот алелів і генотипів залежить можливість відбору особин, які, крім генотипу за заданим локусом, повинні також повністю відповідати стандартним вимогам (бонітування). Аналіз продуктивних якостей особин з різними генотипами також необхідний, навіть в умовах підтвердженого ефекту (від комплексу генів або окремого маркера) на іншій популяції тварин, внаслідок феномена «породної специфічності» [40]. Породна специфічність, а в деяких випадках і «популяційна специфічність», ґрунтується на відмінностях в експресії продуктивних ознак у різних популяціях тварин через різницю у загальному генному фоні, формування якого відрізняється залежно від використовуваних програм розведення. Та, в решті решт, на фінальній стадії можна приступати до формування експериментальних ліній.

Розглянемо деякі з ключових стадій більш детально.

1.2. Пошук новий об'єктів досліджень – основа стратегії MAS

В Україні питання вивчення можливості використання досягнень сучасної генетики для вирішення окремих завдань селекції різних видів сільськогосподарських тварин вивчалось різними авторами. Так, наприклад, проаналізовано генетико-популяційну структуру та продуктивні якості особин з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами для різних порід великої рогатої худоби [41-43], кроликів [44, 45], свиней [46-48]. Також проведено роботу з визначення параметрів генетичної мінливості в популяціях бджіл [49, 50], коней [51, 52] та птиці [53, 54]. Як ми бачимо за кількістю досліджень, питання використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів у тваринництві стоїть на порядку денному в нашій країні.

Незважаючи на наявність достатньої кількості робіт із застосуванням сучасних технологій у тваринництві більша частка з них спрямована на визначення поліморфізму локусів, що є достатньо широко дослідженими у роботах наших зарубіжних колег [55-57]. Рано чи пізно, використання для генетико-популяційного аналізу лише “класичних маркерів” стане дуже вузьким питанням, що обмежене лише відбором певних окремих популяцій або породних груп тварин. Тому, єдиний, на наш погляд, вихід – це пошук нових маркерних систем, які, на цей час, практично не досліджено, але використання яких забезпечено певним фізіологічним обґрунтуванням у контексті потенційного впливу на низку продуктивних якостей. При цьому (у контексті дисертаційної роботи), акцент потрібно робити саме на ВРХ української селекції, як представників генофондних порід. Унікальність генофондних порід полягає в декількох аспектах, що і роблять їх перспективною метою для генетико-популяційних і селекційних досліджень.

По-перше, наявність унікальних алелів та їх комплексів [58, 59]. Як правило, локальні популяції різних генофондних порід характеризуються вищим рівнем генетичної мінливості порівняно зі своїми аналогами (комерційними лініями і породами). Це зумовлено відмінностями в інтенсивності дії відбору, що й віддзеркалюється на особливостях генетико-популяційної структури дослідних порід. Значна дія відбору, особливо у випадку використання молекулярно-генетичних методичних підходів, здатна призвести до повного зникнення з популяції алелів, які, з точки зору загальної направленості селекційної роботи, відносяться до контрпродуктивних. Достатньо широке використання принципів MAS може призводити й до виникнення змін в алельних комплексах за цілою низкою локусів кількісних ознак, тобто призводячи від поліморфізму до мономорфності [60]. У локальних популяціях, вираженого впливу, що може призводити до мономорфного характеру локусу, майже не відбувається. Більше того, в Україні селекційна робота у різних галузях тваринництва, як вже було відмічено, носить характер «фенотипічної», що не змінює генетичної структури порід на рівні окремих генів та їх комплексів [61]. Дане явище, не дивлячись на

всі його мінуси з точки зору ефективності селекційної роботи, призводить до збереження генофонду, тобто до підтримання в популяції всіх варіацій генетичного матеріалу, які були б знищені під час проведення жорстких селекційних заходів. У свою чергу, вищий рівень генетичної мінливості не може слугувати гарантією наявності всіх можливих алельних варіантів локусу, так як генетична структура популяції обмежена й історією свого походження. Так, наприклад, у роботах різних вчених, показано відсутність поліморфізму в деяких локусах у різноманітних породах та популяціях великої рогатої худоби [62-64]. У той же час, ці локуси відносяться до поліморфних у популяціях ВРХ інших порід інших країн і регіонів світу. Крім того, за сукупністю різних локусів (пролактин, гормон росту, рецептор гормону росту, гіпофізарний фактор транскрипції, фактор некрозу пухлин та інші) виявлені різноманітні алельні варіанти, що вказує на перспективність використання молочних порід ВРХ для проведення подальших досліджень у напрямку ДНК-технологій [65-68]. Навіть аналіз одного десятка різних локусів кількісних ознак вже дає можливість розглядати локальні популяції ВРХ у якості джерела генетичного різноманіття, рівень якого, в деяких випадках, недосяжний для комерційних порід. Все вищевикладене відноситься також і до інших видів сільськогосподарських тварин [69, 70]. По друге, окрім окремих алелів мають значення і їх комбінації, комплексні генотипи і гаплотипи [71]. У першу чергу це стосується ознак, що пов'язані зі стійкістю тварин до несприятливих факторів – питання загальної і місцевої резистентності [72]. Як правило, місцеві, локальні породи відносяться до більш пристосованих до жорстких умов утримання [73]. Комерційні лінії можуть втрачати подібні якості внаслідок іншого напрямку селекційної роботи (отримання продукції тваринництва). Наявність подібних алельних комплексів і комплексних генотипів за сукупністю QTL – перспективний інструмент у загальній стратегії племінної роботи [74]. Наші дослідження повністю знаходяться у руслі даної стратегії й присвячені вивченню особливостей різних порід великої рогатої худоби української селекції за комплексом функціональних генів.

Таким чином, унікальність локальних порід і популяцій ВРХ (особливості генетичної структури), служить основою для проведення подальшої племінної роботи, що враховує перспективність використання унікального генного фону та наявності рідкісних комплексних генотипів, що забезпечує максимально можливий рівень пристосованості до конкретних умов утримання.

Поряд з важливістю використання генофондних порід додатковим, але не менш важливим фактором, є правильний вибір об'єкта досліджень – спектра молекулярно-генетичних маркерів або генів-кандидатів, на вивченні якого й буде зроблений відповідний акцент. З цієї точки зору, до найбільш цікавих відносяться локуси, стосовно яких практично відсутня детальна інформація як щодо генетико-популяційних характеристик, так і з аналізу асоціацій з показниками продуктивності тварин.

Гарним прикладом подібної стратегії є поява на порядку денному нового, практично не вивченого раніше об'єкта досліджень – бета-казеїну, алелі якого безпосередньо пов'язані з питаннями якості молочної продукції [75-78]. Окремої згадки заслуговує факт поступового освоєння даного напрямку в генетиці великої рогатої худоби саме української селекції, про що свідчить низка відповідних наукових публікацій [79-81].

У будь-якому випадку, слід зазначити, що основою маркер-асоційованої селекції є інструментарій молекулярно-генетичних маркерів, до більш детального розгляду якого ми й переходимо.

1.3. Технологія молекулярно-генетичних маркерів – основний інструмент сучасної селекції у тваринництві

У 1984 році сталася, по суті, наукова революція в світі практичної генетики – Кері Мюлліс розробив метод ПЛР (Полімеразна Ланцюгова Реакція) [82, 83]. До цього моменту вже були розроблені численні методи аналізу ДНК, в тому числі різні способи її секвенування. Однак, жоден з цих методів не відрізнявся простотою експлуатації і модульністю методичних підходів. Більш того, існуючі

методи аналізу ДНК вимагали використання складного обладнання і не могли бути пристосованими до вирішення різноманітніших завдань. Винахід ПЛР практично вирішив ці проблеми.

В основі ПЛР лежить можливість ампліфікації, тобто багаторазового збільшення кількості копій (більше декількох мільйонів фрагментів) аналізованої ділянки ДНК, що дає пряму можливість для її аналізу тим, чи іншим способом [84]. Важливим моментом є той факт, що всі реакції ампліфікації дослідного фрагменту, відбуваються в одній пробірці, що істотно заощаджує час та знижує матеріальні витрати на проведення досліджень.

Основна перевага ПЛР – можливість точного позиціонування дослідного фрагмента на матриці ДНК. Досягається це за допомогою використання праймерів – олігонуклеотидних затравок, які, за допомогою класичних уотсон-криковських взаємодій, гібридизуються з комплементарними ділянками ДНК-мішені. Таким чином, дані стосовно нуклеотидної структури дослідних фрагментів геному є основоположними для проведення досліджень. Однак, незважаючи на всі переваги даного підходу, метод ПЛР також дає можливість для аналізу і невідомого генетичного матеріалу (для якого нуклеотидна структура геному є невідомою), на чому ґрунтується використання окремих типів ДНК-маркерів (RAPD або інші) [85]. Розгляд цього типу молекулярно-генетичних маркерів лежить поза контексту дисертаційної роботи.

Величезну практичну допомогу для проведення генетичних досліджень різних видів сільськогосподарських тварин надають дані про повну, або часткову, в деяких випадках, нуклеотидну структуру геномів, бази даних яких постійно поповнюються (NCBI, Ensembl). З використанням сучасних інструментів біоінформаційного аналізу можна підібрати відповідну праймерну систему практично для будь-якого об'єкта геному, що дає можливість ампліфікувати фрагмент ДНК в достатній кількості для його подальшого аналізу (пошуку мутацій, секвенування і т.д.).

Для вирішення проблеми генотипування використовуються різні типи ДНК-маркерів – полілокусні або мультилокусні, які мають множинну

локалізацію в геномі (RAPD, ISSR) та монолокусні, що характеризують певну ділянку геному (SSR, PCR-RFLP, Indel, SNP) [86]. Використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів дозволяє оцінювати генетичну мінливість не за фенотипом, а безпосередньо на рівні спадкового матеріалу, що й призвело до поширеного розповсюдження ДНК-технологій у практичній роботі генетичних лабораторій по всьому світу [87]. Застосування молекулярно-генетичних маркерів на підставі методів сучасної популяційної генетики у сукупності з оцінкою класичних селекційних ознак допомагає у вирішенні цілої низки практичних задач генетики та селекції тварин і птиці, таких як визначення загальних параметрів генетичної мінливості популяцій, продуктивного потенціалу та адаптаційних якостей тварин, контролю селекційної роботи, паспортизації тварин, порід та ліній тощо [88, 89].

Залежно від того, який тип поліморфізму досліджується та за допомогою якого додаткового до ПЛР інструментарію використовують різні типи молекулярно-генетичних маркерів, до опису найбільш розповсюджених із них, ми й перейдемо.

Indel. На перший погляд, Indel-маркери відносяться до найпростішого типу маркерів, що засновані на ПЛР. Indel позначає наявність/відсутність інсерції (вставка в один або декілька нуклеотидів) або делеції (втрата одного або декількох нуклеотидів) [90-92]. Інсерції/делеції можуть бути виявленими в самих різних частинах геному – від функціональних фрагментів генів до міжгенних ділянок ДНК, функції яких на даний момент ще не повністю вивчені. У будь-якому випадку, наявність Indel може призводити до самих різних функціональних наслідків для організму, тому що потенційно може змінюватися характер експресії гену (промоторний фрагмент), або, в разі їх наявності в екзонних ділянках – структури кодованого білка [93-95]. Особливо критичний варіант подій може розвиватися за результатами зміни рамки зчитування, що, потенційно, може призводити до синтезу неактивної форми білкової молекули [96-97]. Відповідно, в даному випадку, це може бути причиною летальних

наслідків, що, вже само по собі, перешкоджає поширенню даної мутації в популяції.

З метою визначення різних алельних варіантів функціональних генів з використанням Indel-маркерів використовують стандартну ампліфікацію з подальшим розділенням ампліфікованих фрагментів в агарозному або поліакриламідному гелях. У разі, якщо відмінності в довжині фрагментів незначні (до 10 пар основ) використовують ПААГ, у всіх інших випадках – електрофорез в агарозному гелі.

Внаслідок своєї «простоти» відносно інших типів ДНК-маркерів, а також за потенційно вираженого ефекту на фенотип, даний тип маркерів знайшов достатньо широке застосування в самих різних галузях практичної генетики – від рослинництва до тваринництва [98-100].

PCR-RFLP. Маркери типу PCR-RFLP (Полімеразна Ланцюгова Реакція Поліморфізм Довжин Рестрикційних Фрагментів) відносяться до найбільш популярних інструментів визначення параметрів генетичної мінливості дослідних популяцій тварин [101]. Маркер PCR-RFLP представляє собою варіації у нуклеотидній послідовності сайту рестрикції для певної рестриктази [102]. Номінально, цей тип маркерів відноситься до одонуклеотидних поліморфізмів (SNP), проте має істотні відмінності. По-перше, за використання PCR-RFLP-маркерів неможливо точно встановити тип конкретної мутації (транзиція/ трансверсія), тому що заміна нуклеотиду може статися в будь-якій точці сайту рестрикції. Розмір сайту рестрикції для стандартних рестриктаз становить 4–6 п.н. і зміна в будь-якій точці обов'язково призведе до "зникнення" сайту, тобто до перетворення його з мономорфного в поліморфний. По-друге, до втрати сайту рестрикції може призводити не одна мутація, а декілька. Таким чином, загальна кількість актуальних, фактичних алелів може бути значно вищою, ніж показано за результатами PCR-RFLP. По-третє, заміна може бути на будь-який з альтернативних чотирьох нуклеотидів. Фактично, в даному випадку, в наявності буде чотири алелі, в той час як за результатами рестрикційного аналізу буде виявлено тільки два.

Незважаючи на вищезначені обмеження, PCR-RFLP-маркери займають лідируюче положення для завдань з аналізу особливостей генетичної структури популяцій тварин і пошуку зв'язку виявлених алельних варіантів поліморфних локусів з показниками продуктивності внаслідок своєї універсальності, відносної простоти використання та високого рівня відтворюваності результатів типування [103, 104].

SSCP. Сутність методу SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism; одноланцюговий конформаційний поліморфізм) полягає у визначенні відмінностей конформаційної структури одноланцюгових фрагментів ампліфікованої ДНК при використанні нативних поліакриламідних гелів. Відмінностей навіть у декілька нуклеотидів вже достатньо для ефективного виявлення SSCP алелів у різних особин на електрофореграмах [105-107]. Як правило, використовують фарбування нітратом срібла, оскільки інтеркалюючі барвники (етидіум бромід) мають низьку спорідненість до одноланцюгових фрагментів.

У найбільш поширеному варіанті метод SSCP використовують за наступною схемою [108, 109]. На першому етапі ампліфікують цільовий фрагмент геному (гену) від декількох особин. Далі проводять SSCP аналіз ампліфікованих фрагментів. У випадку виявлення поліморфних варіантів виконують секвенування дослідних зразків (різних SSCP алелів) для визначення конкретних мутацій (SNP). Після цього, за використання відповідного програмного забезпечення, будують рестрикційні карти. Якщо SNP розташований у сайті рестрикції для будь якого ферменту (ендонуклеази рестрикції), обирають рестриктазу, а також умови проведення реакції. Врешті решт отримують PCR-RFLP маркер, за допомогою якого й проводять подальше вивчення генетичної структури популяції за цим поліморфізмом. Таким чином, як слідує із усього вищевикладеного, SSCP маркери займають, свого роду, ключове положення в контексті пошуку мутацій (алелів) та представляють собою незамінний інструмент для визначення нових поліморфних варіантів різних генів (цільових фрагментів геному).

Загалом можна сказати, що метод SSCP є практично безальтернативним у ситуації, коли дослідні фрагменти геному не утримують сайтів рестрикції, або інсерції/делеції, що унеможлиблює визначення алельних варіантів певних генів за використання PCR RFLP або Indel маркерів. У цьому випадку є тільки два варіанти дій для визначення мінливості SSCP або секвенування дослідного фрагменту. У такому разі SSCP є більш привабливим, так як секвенування не завжди є доступним для стандартної генетичної лабораторії у нашій країні.

1.4. Перспективні локуси для вирішення завдань MAS у молочному скотарстві: *PRL, PL, LEP, GHR, TNF- α , MYF5*

До перспективних досліджень у контексті використання результатів у практичній селекційній роботі з великою рогатою худобою відносяться гени, продукти яких безпосередньо пов'язані з регулюванням великої кількості різних фізіологічних процесів організму тварин. У першу чергу, цю умову задовольняють гени гормонів, рецепторів для гормонів, а також різних регуляторних білків, що пов'язані не лише з продуктивними якостями, але й з функціонуванням імунної системи в цілому. Слід зазначити, що до «нових», маловивчених об'єктів можна відносити не тільки гени взагалі, а й окремі мутації (поліморфізми), які, на даний момент, недостатньо вивчені у популяціях та породах великої рогатої худоби української селекції. Також, до актуальних моментів відноситься дослідження нових об'єктів на тлі так званих «класичних маркерів» з метою отримання результатів, що мають максимальну практичну цінність для комплексної селекційної роботи.

Перейдемо безпосередньо до розгляду низки актуальних локусів і мутацій для досліджень у популяціях великої рогатої худоби молочного напрямку продуктивності.

1.4.1. Ген пролактину (*PRL*)

Пролактин – пептидний гормон, що складається з 229 амінокислотних залишків. Вперше був описаний в 1933 році. На відміну від багатьох інших гормонів синтезується в самих різних тканинах організму хребетних, проте основна залоза, яка регулює рівень його секреції, це аденогіпофіз [110].

Характеризується мультифункціональними властивостями – у представників різних видів тварин приймає участь у більш ніж 300 регуляторних функціях [111, 112]. За своєю функціональною активністю входить до родини пролактин/гормон росту/плацентарний лактоген (PRL/GH/PL).

Основна роль пролактину в організмі ссавців – регуляція росту і розвитку молочних залоз, а також стимуляція синтезу молока (лактогенез) [113].

Ген пролактину великої рогатої худоби (Bovine Prolactin gene, *bPRL*, *PRL*) складається з п'яти екзонів та чотирьох інтронів, містить у своєму складі 8,90 тис. п.н. (рис. 1.1). Розташований на 23 хромосомі.

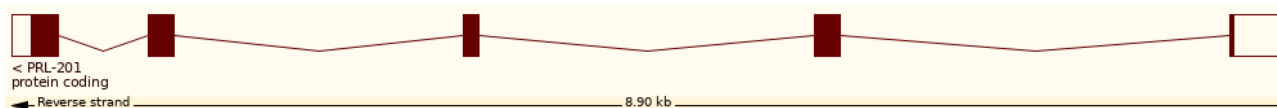


Рис. 1.1 Структура гену пролактину великої рогатої худоби.
ENSBTAG00000015274

(https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000015274;r=23:35332705-35341607;t=ENSBTAT00000020313)

Для гена пролактину великої рогатої худоби, згідно даним ENSEMBL, встановлено 715 алельних варіантів у самих різних фрагментах, що потенційно, свідчить про перспективи пошуку різних функціональних мутацій, що пов'язані з проявом продуктивних ознак.

Так, виявлено RsaI-поліморфізм у третьому екзоні гена пролактину в популяціях корів різних порід Польщі, Росії, у Монбельярдській породі корів, в індійської нативної худоби [114-117]. Також вивчено генетичну структуру та встановлено асоціації різних алельних варіантів пролактину за цією мутацією (RsaI-поліморфізм) з параметрами молочної продуктивності швицької породи корів, фризської худоби, буйволів, локальних пакистанських популяцій, нативних індійських і турецьких порід і т.д. [118-123]. За кількістю проведених досліджень можна сміливо стверджувати, що даний поліморфізм відноситься до

однієї з найбільш вивчених мутацій у локусі пролактину в генетиці великої рогатої худоби.

Також проводяться дослідження з аналізу комплексних генотипів пролактину з іншими генами, такими як гіпофізарний фактор транскрипції 1 (*PIT1*), каппа-казеїн (*CSN3*) і т.д. [124, 125]. У цьому випадку дослідження ґрунтуються на особливостях широкого спектру функціональної активності і фізіологічних регуляторних зв'язків пролактину з іншими ефекторними молекулами.

Крім досліджень з вивчення цього поліморфізму відзначено перспективні результати з аналізу нерівноваги за зчепленням між цією мутацією та іншими поліморфними сайтами різних генів [126].

Поряд з вищеописаним поліморфізмом також активно проводяться дослідження з пошуку нових поліморфних сайтів – проаналізовані мутації у промоторних фрагментах гену (-1043A/G, -402A/G), у першому інтроні (+2723C/T) та четвертому екзоні (+8398G/A) в популяціях комерційних порід Китаю [127].

Таким чином, аналізуючи як виражену фізіологічну значимість функціонування пролактину для жуйних тварин, а також результати численних проведених досліджень, даний локус можна розглядати фактично як маркер молочної продуктивності корів враховуючи, при цьому, конкретні мутації [128].

1.4.2. Ген плацентарного лактогену (*PL*)

Плацентарний лактоген (placental lactogen, *PL*), також відомий як хоріонічний соматомаммотропний гормон (chorionic somatomammotropin hormone, *CSH*) – пептидний гормон, який синтезується плацентою під час вагітності [129, 130]. За своєю амінокислотною структурою близький до пролактину і гормону росту [131]. Входить до складу сімейства гормон росту/пролактин (*GH/PRL*). Відповідно має цілу низку подібних функцій [132]. Відіграє значну роль у забезпеченні фізіологічних і морфологічних змін, асоційованих з протіканням вагітності [133]. У молочної худоби бере участь в забезпеченні лактації за допомогою регуляції розвитку альвеол молочних залоз

[134]. За своїми функціональними особливостями бере участь в забезпеченні і доповненні функцій пролактину і гормону росту, відноситься до біомаркерів розвитку плода [135].

Ген плацентарного лактогену великої рогатої худоби (placental lactogen gene, *bPL*) складається з трьох екзонів та двох інтронів, містить у своєму складі 5,28 тис. п.н. (рис. 1.2). Розташований на 23 хромосомі. Характеризується декількома альтернативними варіантами сплайсінгу первинних транскриптів [136].

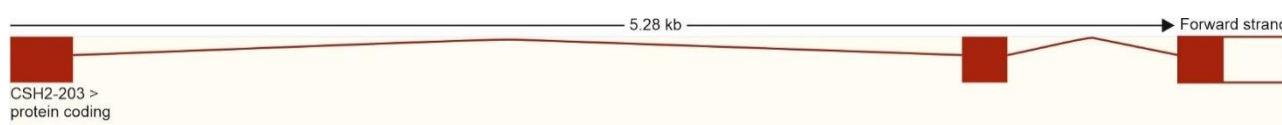


Рис. 1.2 Структура гену плацентарного лактогену великої рогатої худоби. ENSBTAG00000006761

(https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000006761;r=23:35287369-35299843;t=ENSBTAT00000008897)

Згідно даним ENSEMBL, для гена плацентарного лактогена великої рогатої худоби, виявлено 579 алельних варіантів.

На відміну від пролактину ген плацентарного лактогену вивчений значно менше і на меншій кількості порід, однак і в цьому випадку, з огляду на широкий спектр фізіологічних функцій PL встановлені різні перспективні мутації і алельні варіанти для великої рогатої худоби. Так, наприклад, мутація NT7409 (T-C) у другому екзоні гена асоційована з показниками надою та вмісту молочного білка у голштинських корів [137]. Також виявлені асоціації різних алельних варіантів *PL* з показником вмісту молочного жиру у голштинських корів іранської селекції [138]. В Україні дослідження особливостей генетичної структури популяцій різних порід великої рогатої худоби за локусом плацентарного лактогену представлені поодинокими випадками, що додатково підкреслює новизну запланованих досліджень [139]. У будь-якому випадку, розмах фізіологічних функцій плацентарного лактогену та його активність щодо регуляції лактації

надають всі необхідні підстави для подальшого дослідження в якості потенційного кандидата в маркери молочної продуктивності великої рогатої худоби української селекції.

1.4.3. Ген лептину (*LEP*)

Лептин (leptin, *LEP*) – пептидний гормон, складається з 167 амінокислотних залишків, синтезується, головним чином, у жировій тканині [140]. За своєю біологічною активністю лептин відноситься до регуляторів багатьох фізіологічних функцій, до найважливіших з яких відноситься регуляція жирового та енергетичного обміну. Функціональна активність лептину здійснюється за допомогою зв'язування зі своїм рецептором (*LEPR*), активація генів-мішеней (ген проопіомеланокортину) призводить, через ряд проміжних посередників, до стимуляції синтезу меланокортинів, що, в свою чергу, вказує на широкий спектр фізіологічних функцій *LEP* [141].

Ген лептину (*Leptin gene, LEP*) складається з трьох екзонів та двох інтронів, містить у своєму складі 16730 п.н. (рис. 1.3). Розташований на 4 хромосомі.

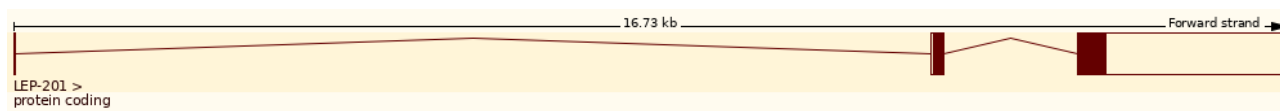


Рис. 1.3 Структура гену лептину великої рогатої худоби.
ENSBTAG00000014911

(http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000014911;r=4:92436922-92453653;t=ENSBTAT00000019853)

Згідно бази даних ENSEMBL має 1381 алельних варіантів. Розуміння особливостей фізіологічних функцій лептину в регуляції жирового і енергетичного обмінів призвело до активного вивчення його різних алельних варіантів в якості потенційних кандидатів в маркери, в першу чергу, м'ясної продуктивності тварин [142, 143]. Проводяться дослідження як на комерційних,

так і на локальних (аборигенних) породах великої рогатої худоби різних регіонів світу [144-147]. Поряд з параметрами м'ясної продуктивності активно проводяться дослідження асоціацій окремих алелів і генотипів *LEP* з параметрами надою, вмістом жиру і білка в молоці корів [148, 149]. Окремої згадки заслуговують дослідження асоціацій різних алельних варіантів лептину з показником вмісту соматичних клітин в молоці – як індикатори раннього клінічного прояву маститу у великої рогатої худоби [150, 151]. З точки зору практичної генетики ВРХ в контексті проблеми маститів у корів до перспективних напрямків відноситься моніторинг мутації A59V, зв'язок якої з показниками прояву цього захворювання і продуктивними якостями тварин був вивчений на різних популяціях молочної худоби низкою зарубіжних дослідників [152, 153]. Поряд з SNP і PCR-RFLP маркерами для вивчення поліморфізму гена лептину активно використовуються також і SSCP [154, 155].

1.4.4. Ген рецептору гормону росту (*GHR*)

Рецептор гормону росту (growth hormone receptor, *GHR*) – рецепторний білок, відноситься до суперродини трансмембранних білків, що включає, також, й рецептор пролактину та цитокінові рецептори [156]. При взаємодії гормону з рецептором відбувається активація янус-кіназного сигнального трансдуктору з подальшою активацією білка STAT. У клітинах печінки активація *GHR* призводить до ініціювання синтезу та секреції інсуліноподібного ростового фактору I, функціональна активність якого, як це відомо, й визначає соматотропні функції безпосередньо гормону росту [157, 158]. Таким чином, функціональна активність *GHR* ставить його практично у центральну позицію регулятора чисельних фізіологічних функцій організму. Основна фізіологічна функція *GHR* полягає в забезпеченні відповіді клітин-мішеней на дію безпосередньо гормону росту. Саме функціонування рецептора гормону росту й визначає чутливість і специфічність відповіді клітини-мішені на стимуляцію безпосередньо соматотропіном.

Приймаючи до уваги весь спектр функціональної активності GHR не викликає подиву факт пильного інтересу до нього з позицій маркер-асоційованої селекції в тваринництві.

Ген рецептора гормону росту (Growth Hormone Receptor gene, *GHR*) – складається з десяти екзонів та дев'яти інтронів, розташований на 20 хромосомі, містить у своєму складі 175,22 тис. п.н. (рис. 1.4). Кодує білок, розміром у 634 амінокислотних залишків.

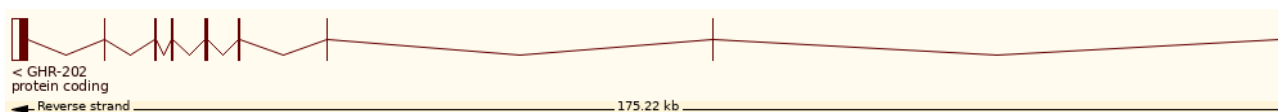


Рис. 1.4 Структура гену рецептору гормону росту великої рогатої худоби. ENSBTAG00000001335

(https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000001335;r=20:31868624-32178311;t=ENSBTAT000000083218)

Згідно бази даних ENSEMBL локус рецептору гормону росту має 6557 алельних варіантів.

Дослідження, в напрямку вивчення різних алельних варіантів *GHR* та їх зв'язку з параметрами продуктивності великої рогатої худоби проводяться в різних країнах і на різних породах і породних групах. Виходячи з особливостей фізіологічної активності GHR, а також його безпосередній зв'язок з гормоном росту, в першу чергу дослідження сконцентровані на м'ясних якість великої рогатої худоби [159-161]. У той же час активно проводяться дослідження з вивчення асоціацій різних алельних варіантів гена рецептора гормону росту з показниками молочної продуктивності різних порід в різних регіонах світу [162-165]. В цілому, результати досліджень дали можливість віднести *GHR* до генів-кандидатів у маркери молочної продуктивності BPX [166]. Додатково до всього проводяться дослідження з аналізу зв'язку виявлених алельних варіантів *GHR* з показником кількості соматичних клітин у молоці, що може вказувати на

потенційний зв'язок даного локусу з резистентністю/чутливістю до маститу [167-169].

Також цікаві дослідження проводять з вивчення комплексних генотипів з різними генними комбінаціями – *GHR* і рецептор пролактину *PRLR*; *GHR* і ген бутірофіліна *BTN*; в комплексі з гормоном росту *GH* й іншими локусами [170-172]. Результати проведених досліджень дають можливість використовувати методичні підходи маркер-асоційованої селекції за допомогою створення «пірамід генів» (Gene Pyramiding) в племінній роботі з великою рогатою худобою.

1.4.5. Ген фактору некрозу пухлини- α (*TNF- α*)

Фактор некрозу пухлини альфа (Tumor Necrosis Factor alpha, *TNF- α*) – запальний цитокін, який координує систематичну відповідь на інфекційний вплив та різного роду ушкодження тканин організму. Широкий спектр варіацій фізіологічної відповіді на дію *TNF- α* визначається типом рецепторів на клітинах-мішенях (рецептори типу I і II) [173, 174]. Являє собою білок, що продукується різними типами клітин – макрофагами, моноцитами, нейтрофілами і т.д. Відноситься до одного з основних індукторів апоптозу, внаслідок чого виконує ключову роль в регуляції багатьох клітинних процесів – проліферації, диференціації та росту [175].

Ген фактору некрозу пухлини- α (Tumor Necrosis Factor alpha gene, *TNF- α*) – складається з чотирьох екзонів та трьох інтронів, розташований на 23 хромосомі, містить у своєму складі 2,88 тис. п.н. (рис. 1.5).

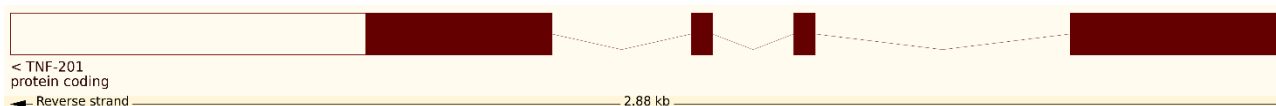


Рис. 1.5 Структура гену фактору некрозу пухлини- α великої рогатої худоби. ENSBTAG00000025471

(https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000025471;r=23:27716168-27719047;t=ENSBTAT00000035815)

Кодує білок, розміром у 333 амінокислотних залишків.

Згідно бази даних ENSEMBL має 1322 алельних варіантів, що, приймаючи до уваги його значну фізіологічну роль, робить його актуальним об'єктом для досліджень на тлі завдань маркер-асоційованої селекції ВРХ.

Поліморфізм *TNF-α* у великої рогатої худоби достатньо широко досліджуваний. Так, наприклад, проведено низку досліджень з питань особливостей генетичної структури різних популяцій корів від комерційних молочних порід до локальних та аборигенних молочних порід [176-179].

Приймаючи до уваги важливу фізіологічну роль, яку відіграє *TNF-α* у регуляції функціонування імунної системи, велика кількість досліджень акцентована на вивченні питань стосовно асоціації різних алельних варіантів *TNF-α* з показниками резистентності/чутливості корів до різних захворювань, в першу чергу до маститу та вірусного лейкозу ВРХ [180-185]. Поряд з цим, проводяться дослідження щодо зв'язку виявлених поліморфних варіантів *TNF-α* з параметрами молочної продуктивності тварин. Так, наприклад, показано, що мутація -824A/G у промоторному фрагменті гена асоційована з показником рівня молочного жиру у чорно-рябої молочної породи [186]. Також цей поліморфізм досліджували в контексті аналізу рівня експресії мРНК *TNF-α* в клітинах здорових та уражених вірусом лейкозу ВРХ тварин [187]. У той же час в іншому дослідженні показано, що різні алельні варіанти *TNF-α* за поліморфізмом у промоторних фрагментах асоційовані не тільки з параметрами функціонування імунної системи, а також і з репродуктивними функціями молочних корів [188].

1.4.6. Ген міогенного фактору 5 (*MYF5*)

Міогенний фактор 5 (Myogenic factor 5, *MYF5*) – білок, член родини міогенних регуляторних факторів. Відіграє ключову роль у регуляції процесів міогенезу, росту і диференціювання скелетної м'язової тканини [189, 190].

Ген міогенного фактору 5 (Myogenic Factor 5 gene, *MYF5*) – складається з трьох екзонів та двох інтронів, розташований на п'ятій хромосомі, містить у своєму складі 3,24 тис. п.н. (рис. 1.6).

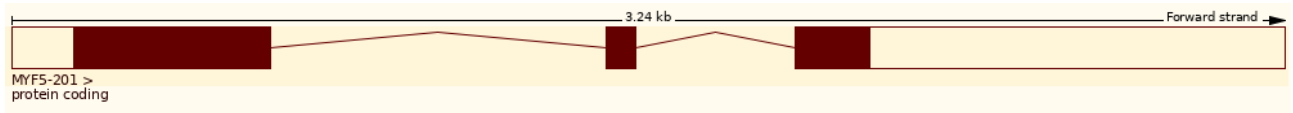


Рис. 1.6 Структура гену міогенного фактору 5 великої рогатої худоби.
 ENSBTAG00000026972
https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000026972;r=5:10284434-10287669;t=ENSBTAT00000038612)

Для гена міогенного фактору 5 у великої рогатої худоби згідно даним ENSEMBL встановлено 717 алельних варіантів у самих різних фрагментах гену.

Геномну структуру локусу міогенного фактору 5 досліджено досить докладно для різних видів хребетних [191]. З огляду на фізіологічну роль міогенного фактору 5 як безпосереднього регулятора розвитку скелетної мускулатури, переважна більшість досліджень сфокусовано на вивченні параметрів м'ясної продуктивності великої рогатої худоби різних порід з різними генотипами за цим локусом [192-195]. Так, наприклад, встановлений зв'язок поліморфізму в промоторному фрагменті гену (-723G/T) з показниками м'ясної продуктивності у голштино-фризької породи польської селекції [194]. Також відзначено зв'язок TaqI-поліморфізму в другому інтроні MYF5 з показниками приросту тварин швіцької і голштинської порід [195].

Ген MYF5 містить досить багато поліморфних сайтів, проте далеко не всі з них пов'язані з сайтами рестрикції для відповідних ендонуклеаз рестрикції. У зв'язку з цим, для вивчення поліморфізму міогенного фактору 5 досить широко використовують метод SSCP, за результатами якого, в деяких випадках, проводять секвенування і точне визначення типу поліморфізму (SNP) локусу [196-198].

Також проводяться дослідження зв'язку комплексних генотипів різних генів з міогенним фактором 5 у комерційних і аборигенних породах великої рогатої худоби. Вивчено питання аналізу продуктивних якостей тварин з різними комплексними генотипами – MYF5 і ген інсуліноподібного ростового фактору I

(*IGF1*) [199]; *MYF5* і міостатину (*MSTN*) [200, 201]; *MYF5*, гормону росту (*GH*) і лептину (*LEP*) [202]; *MYF5*, *GH* і гену сигналу трансдукції та активації транскрипції 5A (*STAT5A*) [203] і т.д. Як ми бачимо, всі ці, на перший погляд, різнопланові локуси, об'єднує виконання загальних, схожих фізіологічних функцій – ріст і диференціювання м'язової тканини. Слід зазначити, що використання саме комплексних генотипів дає змогу створювати "піраміди генів", що, у свою чергу, істотно прискорює прогрес селекційної роботи, спрямованої на поліпшення параметрів продуктивності тварин.

Крім аналізу м'ясних якостей тварин в останні роки проводяться дослідження й параметрів молочної продуктивності корів, у тому числі аналізується показник вмісту соматичних клітин у молоці, з різними генотипами за локусом *MYF5*, що додатково підкреслює перспективність досліджень цього локусу в напрямку можливості використання в MAS [202, 203] .

1.5. Обґрунтування напряму дисертаційних досліджень

Для отримання максимального ефекту від селекційної роботи необхідно використовувати загальний, комплексний підхід, що включає в себе як аналіз генетичної складової, так і паратипових факторів. Максимальна ефективність досягається шляхом досягнення оптимального взаємодоповнення факторів генетики і середовища. Порушення одного зі складових призводить до виражених наслідків для цілого.

Генетична складова, про яку йде мова в даній дисертаційній роботі, використовується на основі найсучасніших результатів генетики – як необхідного базису селекції і розведення тварин. Використанню методичних підходів відбору за допомогою маркерів (MAS), як основного інструменту, що дає можливість аналізу генотипу безпосередньо, практично без можливих помилок, в будь-якому віці, – відводиться чільне місце в сучасній селекції у тваринництві, найвищу ефективність якого ми спостерігаємо за показниками продуктивності порід і ліній зарубіжної селекції. Використання ДНК-технологій дає можливість "тонкої настройки" генетичної структури експериментальних

популяцій, отриманих за допомогою підбору відповідного племінного матеріалу. У цьому ключі, вивчення нових, практично не описаних на вітчизняних породах ВРХ таргетних мішеней у контексті проведення подальшого аналізу продуктивних якостей тварин з різними генотипами за виявленими поліморфними маркерами, належить до актуальних і перспективних завдань для досліджень.

У дисертаційній роботі зроблений акцент на дослідженні особливостей генетичної структури молочних порід великої рогатої худоби української селекції за локусами пролактину, плацентарного лактогену, рецептора гормону росту, лептину, фактору некрозу пухлини альфа і міогенного фактору росту 5. За результатами запланованих досліджень проведено аналіз параметрів молочної продуктивності корів з різними генотипами, що, потенційно, відкриває певні можливості для відбору особин з бажаними (асоційованими з кращими значеннями показників молочної продуктивності) генотипами для використання в подальшій селекційній роботі. Таким чином, актуальність поставлених на порядок денний завдань для створення необхідного фундаменту маркер-асоційованої селекції в молочному скотарстві й визначає загальну мету представлених дисертаційних досліджень.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Місце проведення і матеріали досліджень

Експериментальну частину досліджень проведено у період з 2019 по 2021 рр. на базі кафедри біології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України та лабораторії молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва Національної академії аграрних наук України.

Для проведення досліджень використовували наступні популяції корів молочних порід: Українська чорно-ряба молочна порода (популяція 1 – господарство 1, Харківська область, Вовчанський район; популяція 2 – господарство 2, Харківська область, Дергачівський район); Українська червоно-ряба молочна порода (Харківська область, Вовчанський район).

У якості об'єктів дослідження використовували гени пролактину (*PRL*), плацентарного лактогену (*PL*), рецептору гормону росту (*GHR*), лептину (*LEP*), фактору некрозу пухлини- α (*TNF- α*) та міогенного фактору 5 (*MYF5*).

На першому етапі досліджень проводили оптимізацію методів генотипування особин великої рогатої худоби за локусами кількісних ознак з використанням маркерів PCR-RFLP (Полімеразна Ланцюгова Реакція – Поліморфізм Довжини Рестрикційних Фрагментів) та SSCP (Одноланцюговий конформаційний поліморфізм).

На другому етапі з використанням оптимізованих методик досліджували поліморфізм локусів пролактину (*PRL*), плацентарного лактогену (*PL*), рецептору гормону росту (*GHR*), лептину (*LEP*), фактору некрозу пухлини- α (*TNF- α*) та міогенного фактору росту 5 (*MYF5*) в дослідних популяціях великої рогатої худоби.

На третьому етапі досліджень проводили аналіз наявної генетичної структури дослідних популяцій тварин. Також проводили порівняльний аналіз

особливостей генетико-популяційних параметрів двох різних популяцій корів (популяції з різних господарств) української чорно-рябої молочної породи за виявленими поліморфними локусами.

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

Загальну схему досліджень наведено на рис. 2.1.

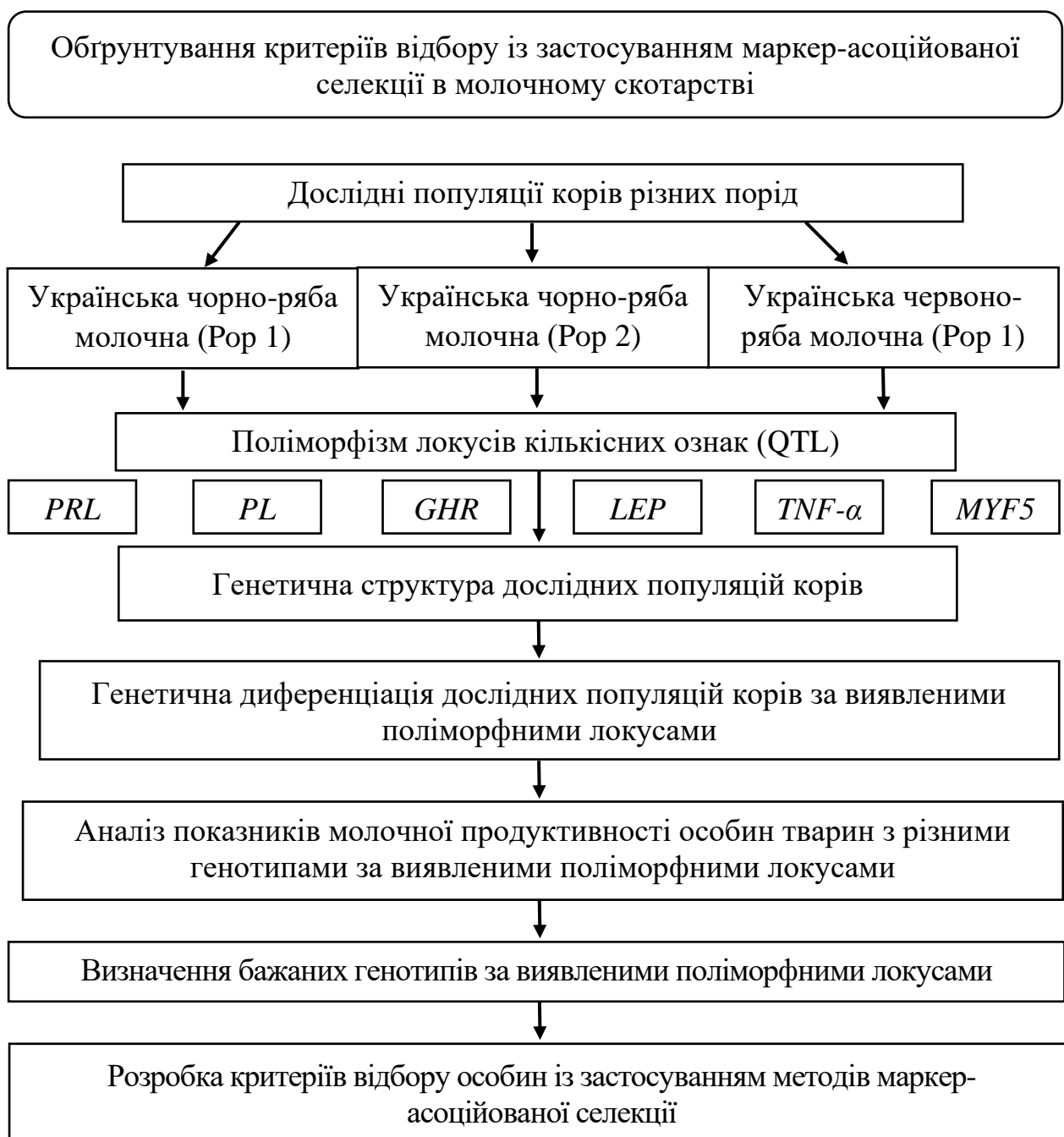


Рис. 2.1 Загальна схема досліджень

2.2. Перелік використаного обладнання

Для виконання досліджень використовували наступне обладнання:

1. Програмований термоциклер AMPLY 4 Biosom;
2. Твердотільний термостат;
3. Настільна мікроцентрифуга;
4. Мікроцентрифуга типу вортекс;
5. Автоматичні піпет-дозатори змінного об'єму;
6. Блок живлення для камери для горизонтального електрофорезу «ЕЛЬФ»;
7. Камера для горизонтального електрофорезу Helicon;
8. Камера для вертикального електрофорезу Cleaver Scientific max Omni (розмір гелю 20 × 20);
9. УФ-трансілюмінатор;
10. Холодильна камера NORD та Zanussi;
11. Цифрова дзеркальна фотокамера DSRL Sony α330.

2.3. Методи досліджень

У якості джерела ДНК використовували біологічний матеріал – волосяні цибулини від кожної особини. Біологічний матеріал від кожної особини окремо пакували та маркували. Виділення ДНК проводили з використанням комерційного набору реагентів ДНК-Сорб-В (AmpliSens, Російська Федерація) згідно з відповідним протоколом виробника (<https://interlabservice.ru/upload/iblock/318/DNA-sorb-B%20221217.pdf>).

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

У дисертаційній роботі досліджували наступні мутації в обраних генах:

- Ген пролактину (*PRL*) – RsaI-поліморфізм четвертого екзону (транзиція С/Т у положенні 35106206);
- Ген плацентарного лактогену (*PL*) – RsaI-поліморфізм у п'ятому екзоні (трансверсія С/А, місенс-мутація у положенні 35071890);
- Ген рецептору гормону росту (*GHR*) – AluI-поліморфізм промоторного фрагменту;
- Ген лептину (*LEP*) – HphI-поліморфізм у третьому екзоні (транзиція С/Т, що призводить до заміни аланіну на валін у кодованому білку, мутація А59V);
- Ген фактору некрозу пухлини- α (*TNF- α*) – SSCP поліморфізм у другому екзоні;
- Ген міогенного фактору 5 (*MYF5*) – TaqI-поліморфізм у другому інтроні.

Для ампліфікації дослідних фрагментів обраних генів використовували відповідні олігонуклеотиди (праймери) (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Нуклеотидні послідовності олігонуклеотидів

Локус	Нуклеотидна послідовність
<i>PRL</i>	gttcttgctttatgtaacaccg; taggtcaatcactctgagca [139]
<i>PL</i>	tttgggtgcttaggtcatcc; atcatcactaaccatctcaggac [139]
<i>GHR</i>	tgcgtgcacagcagctcaacc; agcaaccccactgctgggcat [159]
<i>LEP</i>	gggaagggcagaaagatag; tggcagactgttgaggatc [204]
<i>TNF-α</i>	tactgcttccatcccttgac; gagaagacaagacccatcag [205]
<i>MYF5</i>	gatagctggctgtgaatgat; ctggcaactggggagagaga [200]

ПЛР здійснювали за відповідними для кожного локусу програмами: 1 цикл: денатурація 94°C 5 хв; 35 циклів: денатурація 94°C 45 с, відпал 45 с (61°C – для *PRL*; 58°C – для *PL*; 66°C – для *GHR*; 60°C – для *MYF5*; 56°C – для *LEP*; 55°C – для *TNF- α*), елонгація 72°C 45 с; 1 цикл – фінальна елонгація 72°C 10 хв.

Об'єм кінцевої суміші становив 20 μL , концентрація праймерів – 0,2 μM у кожному випадку.

Обробку ампліфікованих фрагментів здійснювали відповідними ендонуклеазами рестрикції за стандартними методиками фірми виробника (Thermo Scientific).

Перелік та характеристику використаних ендонуклеаз рестрикції наведено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Характеристика ендонуклеаз рестрикції

№	Ендонуклеаза рестрикції	Сайт рестрикції
1	TaqI	T↓CGA
2	AluI	AG↓CT
3	RsaI	GT↓AC
4	HphI	GGTGAN ₈ ↓

Продукти ампліфікації/рестрикції розділяли в агарозних гелях різних концентрацій (1–4%), а також у нативних поліакриламідних гелях різних концентрацій (4–12%). Фарбування гелів здійснювали за використання бромистого етидію (агарозні гелі) або нітрату срібла (агарозні та поліакриламідні гелі). Розмір ампліфікованих/рестрикційних фрагментів визначали за використання маркерів молекулярних мас М-10, М-12, М-20, М-50, М-100 (Ізоген, Російська Федерація).

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

PRL – розмір ампліфікованого фрагменту складає 416 п.н. Алель С представлений фрагментами розміром 56 і 360 п.н., алель Т – 56, 165 і 195 п.н.

PL – розмір ампліфікованого фрагменту складає 239 п.н. Алель С представлений фрагментом в 239 п.н., алель А – 65 і 174 п.н.

GHR – розмір ампліфікованого фрагменту складає 836 п.н. Алель *AluI*+ представлений фрагментами довжиною 602, 145, 75 і 14 п.н.; *AluI*- – 747, 75 і 14 п.н.

LEP – розмір ампліфікованого фрагменту складає 331 п.н. Алель *C* представлений фрагментом розміром в 331 п.н., алель *T* – 311 і 20 п.н.

MYF5 – розмір ампліфікованого фрагменту складає 1190 п.н. Алель *TaqI*+ представлений фрагментами розміром 983 і 207 п.н.; *TaqI*- – 1190 п.н.

TNF-α – розмір ампліфікованого фрагменту складає 239 п.н. Генотипування за цим локусом було проведено з використанням методу SSCP.

Частоти зустрічальності генотипів за кожним з поліморфних локусів визначали за формулою 2.1:

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

P_{AA} – частота відповідного генотипу; n_{AA} – кількість особин з відповідним генотипом; N – загальна кількість особин (об'єм вибірки).

Частоти алелів визначали за формулами максимальної правдоподібності 2.2 та 2.3:

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

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

P_A , P_B – частоти відповідних алелів; n_{AA} , n_{BB} – кількість гомозиготних особин; n_{AB} – кількість гетерозиготних особин; $2N$ – кількість алелів (подвоєна кількість особин у дослідній групі) [206].

Помилку частот генотипів оцінювали за формулою 2.4:

$$S_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}} \quad (2.4)$$

де p – частота генотипу; N – об'єм вибірки.

Помилку частот алелів виявляли за формулою 2.5:

$$S_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{2N}} \quad (2.5)$$

де p – частота алеля; N – об'єм вибірки.

Вірогідність показників частот алелів визначали за використання стандартної похибки середньої арифметичної та t -критерію [206]. Відмінності вважали статистично вірогідними при $p < 0,05$.

Генетичну рівновагу встановлювали за формулою Харді-Вайнберга (2.6):

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad (2.6)$$

p і q – частоти відповідних алелів.

Відповідність рівноважного стану популяцій визначали з використанням критерію χ^2 за формулою (2.7):

$$\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E \quad (2.7)$$

O – фактично виявлена кількість особин відповідного генотипу; E – очікувана кількість особин відповідного генотипу.

Рівень очікуваної гетерозиготності (H_e) виявляли за формулою 2.8:

$$H_e = 2pq \quad (2.8)$$

Індекс фіксації Райта визначали за формулою 2.9:

$$F_{is} = \frac{H_s - H_i}{H_s} \quad (2.9)$$

F_{is} – коефіцієнт інбридингу особин у субпопуляції; H_i – фактична гетерозиготність у субпопуляціях; H_s – очікувана гетерозиготність [207].

Зв'язок різних генотипів тварин з показниками продуктивності аналізували з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) та критерію множинних порівнянь Тьюки-Крамеру в якості інструменту post-hoc тестування. Розрахунки проводили у Microsoft Excel з використанням Real Statistics Resource Pack (<http://www.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 [208].

Для аналізу параметрів молочної продуктивності тварин визначали наступні показники: надій за 305 днів лактації (кг); жирномолочність (%); вміст білка в молоці (%).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дослідження ефективності та апробація методів генотипування особин ВРХ за різними типами ДНК-маркерів

Для ефективного генотипування за використання технології ДНК-маркерів, що заснована на ПЛР, потрібно використовувати праймерні системи, які відповідають певним вимогам, що, у свою чергу, залежить від багатьох факторів. У випадку досить масштабного використання великою кількістю дослідників різних праймерних систем питання їх ефективності є практично вирішеним та впровадженим. Але у випадку, коли дизайни праймерів тільки розроблені дослідниками та пропонуються вперше, потрібна їх всебічна апробація, як із використанням методів біоінформатики (відповідного програмного забезпечення), так і за результатами практичної роботи у лабораторії (генотипування безпосередньо).

У цьому контексті є різні вимоги для різних молекулярно-генетичних маркерів (PCR-RFLP та SSCP). Для першого типу ключове питання – якість розроблених праймерів (дизайн праймерів), для другого типу – оптимізація параметрів електрофоретичного розділення ампліфікованих фрагментів (за умови ефективності використаних праймерів).

Розглянемо ці питання більш детально.

3.1.1. Визначення ефективності ампліфікації таргетних фрагментів локусів *PRL* та *PL* з метою подальшого генотипування за використання PCR-RFLP маркерів

Ефективність використання різних праймерних систем для ампліфікації дослідних фрагментів залежить від декількох факторів. По-перше, різниця між рестрикційними фрагментами повинна бути не менш ніж 20 п.н., так як це –

найменше значення, у практичному сенсі, яке може бути диференційовано за використання агарозних гелів. У свою чергу, для ефективного генотипування використання саме агарозних гелів – це безумовна вимога. По-друге, праймери повинні фланкувати фрагмент певного розміру, який дасть змогу отримувати патерн рестрикційних фрагментів, що достатньо відрізняються для візуальної детекції. Тобто розміри рестрикційних фрагментів не повинні бути меншими ніж 50 п.н., що в інакшому випадку може призвести до неможливості їх диференціювання в агарозних гелях. По-третє, бажано, щоб температура відпалу прямого та зворотного праймерів була максимально близькою за своїм значенням, що значно посилить ефективність ампліфікації таргетного фрагменту.

Лише за умов відповідності загальним вимогам можливо ефективно використовувати запропоновану праймерну систему з метою генотипування особин.

У рамках завдань дисертаційної роботи з використанням методів біоінформатики проаналізували запропоновані авторами праймери для ампліфікації певних фрагментів генів пролактину та плацентарного лактогену. Розглянемо більш детально результати по кожному з них.

Для дослідження RsaI-поліморфізму четвертого екзону гену *PRL*, викликаного транзицією С/Т у положенні 35106206, використовували праймери, що розроблені на основі аналізу нуклеотидних послідовностей в генбанку (NCBI, Ensembl) з використанням програм FastPCR v6.5.54, PerlPrimer v1.1.21.

Нуклеотидна структура праймерів для таргетного фрагменту *PRL*: GTTCTTGCTTTATGTAACACCG та TAGGTCAATCACTCTGAGCA [139]. Температура відпалу праймерів – 56°C. Розмір ампліфікаційного фрагменту – 416 п.н.

На рис. 3.1 наведено результати аналізу ефективності застосування обраних праймерів для фланкування четвертого екзону гену пролактину.

За результатами використання методичних підходів біоінформатики встановлено, що запропонована праймерна система дає змогу з високим ступенем точності фланкувати четвертий екзон гену пролактину з утворенням фрагменту, розміром 416 пар нуклеотидів. Використання нуклеотидних послідовностей кожного з праймерів у програмі Nucleotide BLAST дає змогу вірогідно встановити повну відповідність мішені (*Bos taurus prolactin precursor (PRL) gene, complete cds, AF426315.1*), що додатково підкреслює їх високу специфічність та можливість використання.

Для експериментальної перевірки результатів біоінформаційного аналізу провели ампліфікацію таргетного фрагменту гену пролактину за використання запропонованої праймерної системи в лабораторних умовах. Для проведення ампліфікації використовували геномну ДНК особин великої рогатої худоби української чорно-рябої молочної породи. Електрофореграму продуктів ампліфікації наведено на рис. 3.2.

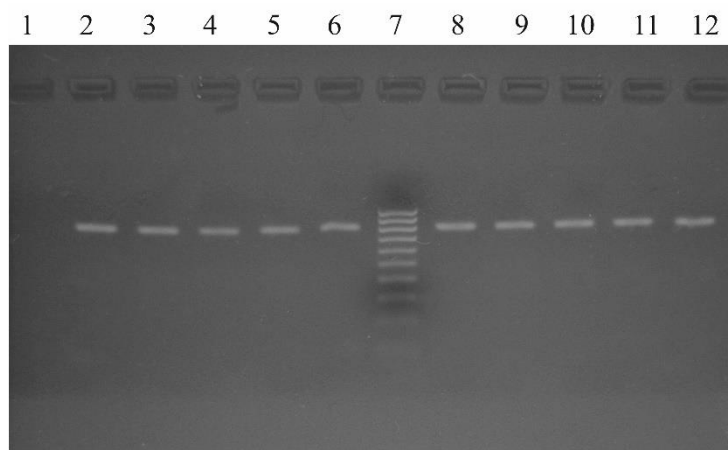


Рис. 3.2 Електрофореграма продуктів ампліфікації четвертого екзону гену пролактину. 1 – негативний контрольний зразок; 2-6, 8-12 – амплікон; 7 – маркер молекулярних мас (М-50).

За результатами досліджень встановлено повну відповідність фактичного матеріалу очікуваним розрахункам. Розмір ампліфікованого фрагменту знаходиться у межах 416 п.н., що відповідає результатам аналізу за використання Pick Primers (рис. 3.1).

Для дослідження *RsaI*-поліморфізму п'ятого екзону гену *PL*, викликаного трансверсією С/А (місенс-мутація) у положенні 35071890, використовували праймери, що розроблені на основі аналізу нуклеотидних послідовностей в генбанку (NCBI, Ensembl) з використанням програм FastPCR v6.5.54, PerlPrimer v1.1.21.

Нуклеотидна структура праймерів для таргетного фрагменту *PL*: TTTGGGTGCTTAGGTTTCATCC та ATCATCACTAACCATCTCAGGAC [139]. Температура відпалу праймерів – 58°C. Розмір ампліфікаційного фрагменту – 239 п.н.

На рис. 3.3 наведено результати аналізу ефективності застосування обраних праймерів для фланкування п'ятого екзону гену плацентарного лактогену.

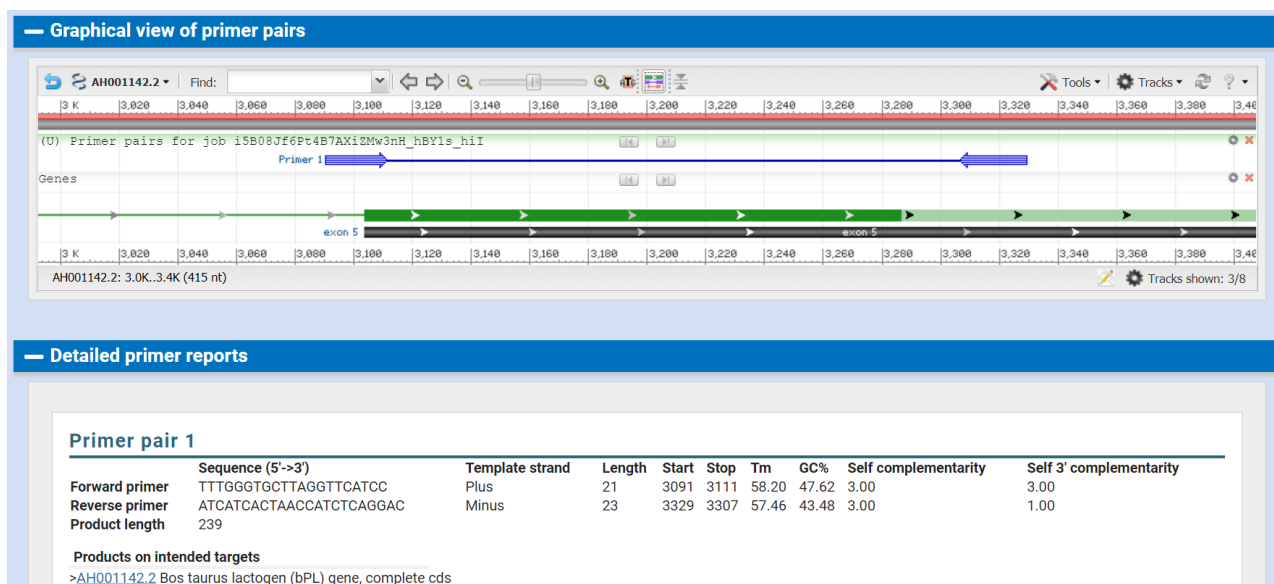


Рис. 3.3 Результати online підбору праймерів (Pick Primers) для фланкування п'ятого екзону гену плацентарного лактогену згідно бази даних NCBI

За результатами досліджень за використання методичних підходів біоінформатики встановлено, що запропонована праймерна система дає змогу з високим ступенем точності фланкувати п'ятий екзон гену плацентарного лактогену з утворенням фрагменту розміром 239 пар нуклеотидів. Використання нуклеотидних послідовностей кожного з праймерів у програмі Nucleotide BLAST дає змогу вірогідно встановити повну відповідність мішені (*Bos taurus lactogen (bPL)* gene, complete cds, AH001142.2), що додатково підкреслює їх високу специфічність та можливість використання.

Як і у випадку з попереднім локусом, для експериментальної перевірки результатів біоінформаційного аналізу провели ампліфікацію таргетного фрагменту гену плацентарного лактогену за використання запропонованої праймерної системи в лабораторних умовах. Для проведення ампліфікації використовували геномну ДНК особин великої рогатої худоби української чорно-рябої молочної породи. Електрофореграму продуктів ампліфікації наведено на рис. 3.4.

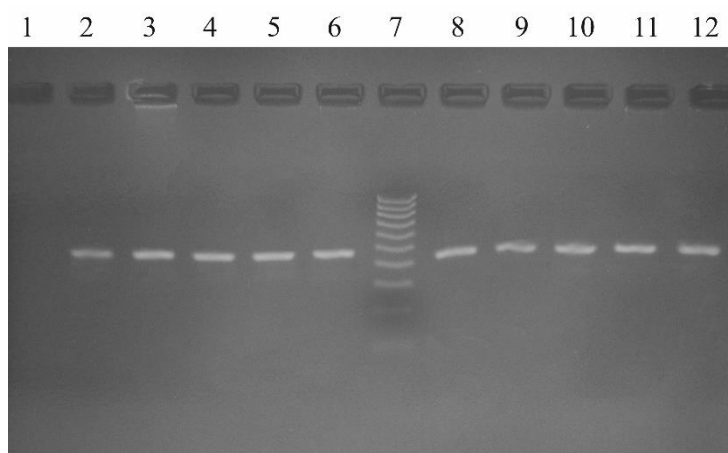


Рис. 3.4 Електрофореграма продуктів ампліфікації п'ятого екзону гену плацентарного лактогену. 1 – негативний контрольний зразок; 2-6, 8-12 – амплікон; 7 – маркер молекулярних мас (М-50).

За результатами досліджень встановлено повну відповідність фактичного матеріалу очікуваним розрахункам. Розмір ампліфікованого фрагменту знаходиться у межах 239 п.н., що відповідає результатам аналізу за використання Pick Primers (рис. 3.3).

Таким чином, запропоновані праймерні системи для ампліфікації дослідних фрагментів генів пролактину та плацентарного лактогену успішно пройшли апробацію, як за результатами аналізу з використанням методів біоінформатики, так і в лабораторних умовах, що дає змогу використовувати їх в подальших дисертаційних дослідженнях.

3.1.2. Оптимізація методу генотипування особин за SSCP-маркерами локусу *TNF-α*

Для визначення наявності варіабельності в нуклеотидній структурі дослідних фрагментів різних генів, у випадку відсутності даних стосовно їх алельного стану в конкретній позиції (SNP), практично безальтернативним

інструментом є метод SSCP. Мета дослідження конформаційного одноланцюгового поліморфізму ДНК – виявлення варіативності за відсутності інформації щодо точної нуклеотидної послідовності дослідного фрагменту, а також щодо поліморфних сайтів для відповідних ендонуклеаз рестрикції. Для ефективного використання методу необхідна оптимізація відповідної методики, що дає змогу ефективно диференціювати генотипи з використанням аналізу патернів, що виникають – аналіз розподілу фрагментів одноланцюгової ДНК на електрофореграммі. Згідно завдань дисертаційної роботи необхідно оптимізувати методику використання SSCP для дослідження поліморфізму другого екзону гена фактору некрозу пухлини альфа. В якості контролю (модельного об'єкту) ефективності проведення SSCP-аналізу використовували фрагмент п'ятого екзону гену рецептору пролактину курей (*PRLR*). Використання модельного об'єкту у цьому випадку є необхідним для врахування фактору впливу розміру амплікону, а також їх нуклеотидного складу на ефективність розділення фрагментів. Ампліфікований фрагмент гену *TNF- α* має розмір 239 п.н.; гену *PRLR* – 250 п.н. Обидва фрагменти повністю відповідають вимогам для ефективного розділення різноланцюгових фрагментів ДНК у нативних поліакриламідних гелях.

Для успішного генотипування особин на основі визначення SSCP у першу чергу необхідно оптимізувати низку параметрів електрофорезу для первинного розділення дволанцюгових та одноланцюгових фрагментів. У зв'язку з цим проведено дослідження у нативних поліакриламідних гелях різних концентрацій. Результати використання нативних поліакриламідних гелів різних концентрацій та співвідношень акриламід/бісакриламід (29/1 та 100/1) для диференціювання дволанцюгових та одноланцюгових фрагментів ампліфікованих ділянок генів *TNF- α* та *PRLR* наведено у таблиці 3.1. Для кожної з наведених схем використовували наступні параметри електрофорезу: 300-350 V протягом 2-4 годин.

Таблиця 3.1

Аналіз ефективності розділення дволанцюгових та одноланцюгових ампліфікованих фрагментів ДНК у нативних ПААГ різних концентрацій

ПААГ	Ефективності диференціювання дволанцюгових та одноланцюгових ампліфікованих фрагментів	
	<i>TNF-α</i>	<i>PRLR</i>
5-6%, 29/1	Без розділення	Слабке розділення
5-6%, 100/1	Без розділення	Слабке розділення
7-8%, 29/1	Слабке розділення	Слабке розділення
7-8%, 100/1	Слабке розділення	Слабке розділення
9-10%, 29/1	Слабке розділення	Фрагменти розділені
9-10%, 100/1	Фрагменти розділені	Фрагменти розділені
11-12%, 29/1	Фрагменти розділені	Оптимальна диференціація
11-12%, 100/1	Оптимальна диференціація	Оптимальна диференціація

У якості «оптимального» приймали таке розділення фрагментів, при якому можливо було точно диференціювати одноланцюгові (низька рухливість) від дволанцюгових (висока рухливість) фрагментів ДНК.

За результатами проведених досліджень з'ясовано, що для ефективного розділення одноланцюгових та дволанцюгових ампліфікованих фрагментів другого екзону гену *TNF-α* доцільно використовувати 12 % ПААГ зі співвідношенням акриламід/бісакриламід 100/1. У цьому випадку різниця в електрофоретичній рухливості дає змогу виділити достатньо великий розмір «поля» для наступної ідентифікації різних генотипів за патернами одноланцюгової ДНК.

На рис. 3.5 наведено фотографію електрофореграми продуктів ампліфікації другого екзону гену *TNF-α* з використанням методу SSCP (концентрація геля 12%, 100/1).

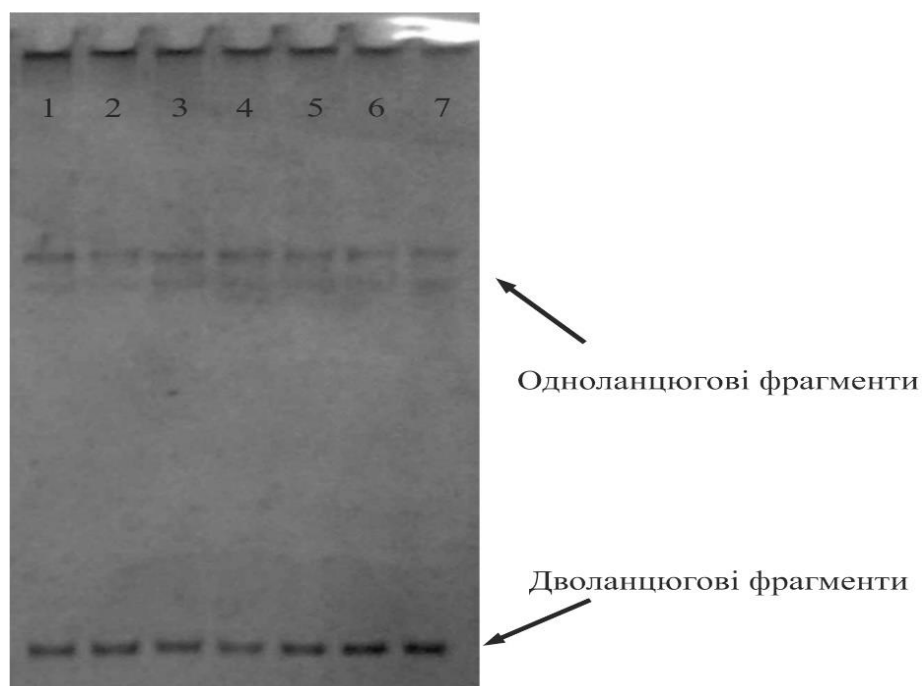


Рис. 3.5 Електрофореграма продуктів ампліфікації другого екзону гену *TNF- α* з використанням методу SSCP

Як слідує з наведеної електрофореграми одно- та дволанцюгові фрагменти дослідної ДНК чітко диференціюються один від одного, відстані між ними достатні для утримання різних SSCP-профілів, навіть таких, які максимально різняться.

Використання співвідношення акриламіду до бісакриламіду 100/1 (співвідношення відповідних концентрацій) є більш перспективним у контексті дисертаційних досліджень, так як дає змогу отримати більш чітку картинку електрофореграми та оптимально розділити фрагменти, що аналізуються. У подальшому будемо використовувати це співвідношення в якості стандартного для проведення досліджень.

Розділення одно- та дволанцюгових фрагментів ампліфікованої ДНК – це тільки перший крок до максимальної оптимізації методики. На наступному етапі проводили оптимізацію вмісту гліцерину у гелі, що дало змогу отримати більш чіткі, диференційовані профілі ДНК, що відповідають різним генотипам за SSCP-маркерам.

У таблиці 3.2 наведено інформацію стосовно використаних концентрацій гліцерину в гелі (ПААГ 12%, акриламід/бісакриламід 100/1).

Таблиця 3.2

Аналіз ефективності розділення SSCP-патернів у нативном ПААГ з різними концентраціями гліцерину

Гліцерин	Ефективність диференціювання різних генотипів на електрофореграмі	
	<i>TNF-α</i>	<i>PRLR</i>
1%	Варіювання розмірів	-
2%	Варіювання розмірів	-
3%	Низька відтворюваність	-
4%	Відтворюваність	-
5%	Висока відтворюваність	-
6%	Висока відтворюваність	-

За результатами досліджень з'ясовано, що диференціювання ампліфікованих фрагментів п'ятого екзону гену рецептора пролактину курей не відбувається, що підтверджують проведені раніше дослідження, а також результати гетеродуплексного аналізу, які проведені у лабораторії Інституту тваринництва НААН. Таким чином, у подальших дослідженнях дисертаційної роботи мономорфний фрагмент гену *PRLR* курей в якості еталонного фрагменту використовуватися не буде.

На рис. 3.6 наведено приклад отриманої електрофореграми продуктів ампліфікації другого екзону гену фактору некрозу пухлини альфа (в якості об'єкта досліджень використано особин великої рогатої худоби української чорно-рябої породи).

За результатами досліджень встановлено високу ефективність апробованих параметрів електрофоретичного розділення ампліфікованих

фрагментів ДНК локусу *TNF- α* , що дає змогу ефективно проводити генотипування особин дослідних популяцій великої рогатої худоби.

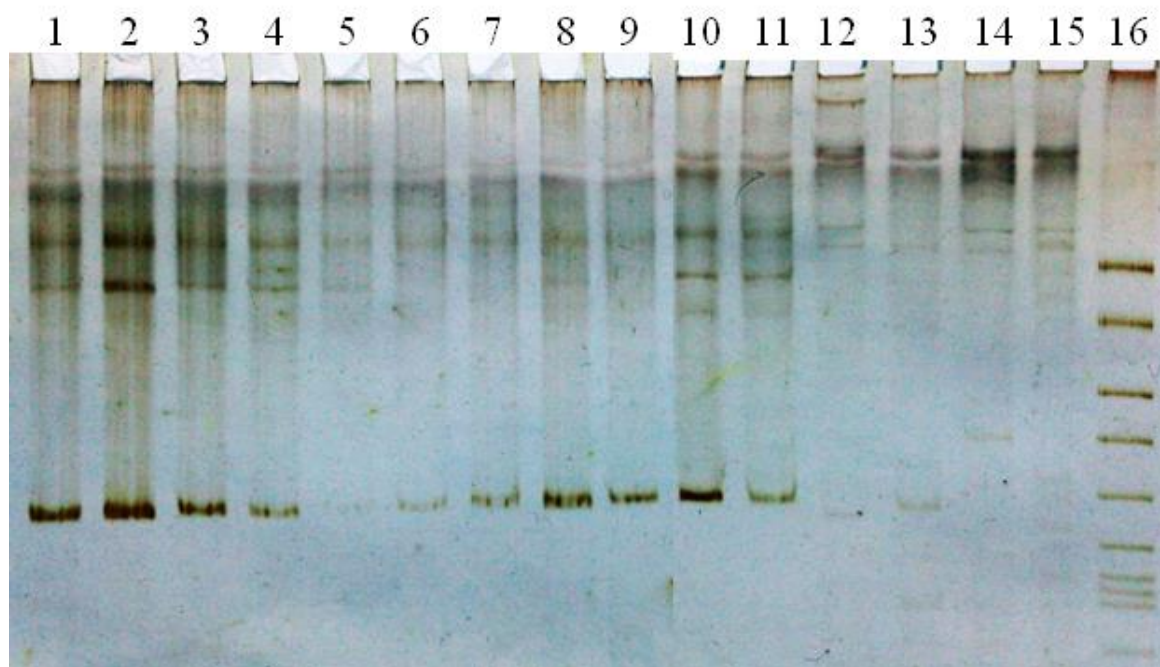


Рис. 3.6 SSCP-аналіз другого екзону гену *TNF- α* в дослідній популяції корів. 1-5, 8 – генотип A/F; 6, 7 – A/B; 9-11 – A/E; 12, 15 – A/C; 13, 14 – A/D; 16 – маркер молекулярних мас (pUC 19 DNA/MspI)

Оптимізовані та апробовані методики будуть використані для проведення подальших досліджень, результати яких будуть наведені у наступних розділах дисертаційної роботи (підрозділ 3.2.6).

Результати досліджень розділу опубліковано в роботі [209].

Висновки до розділу 3.1

1. За результатами досліджень встановлено, що використання запропонованої праймерної системи (GTTCTTGCTTTATGTAACACCG та TAGGTCAATCACTCTGAGCA) дає змогу ефективно ампліфікувати фрагмент четвертого екзону гену пролактину великої рогатої худоби, розміром у 416 п.н.

Ефективна температура відпалу праймерів складає 56°C. Результати досліджень за використання методів біоінформатики доведено експериментальними даними.

2. Встановлено, що використання запропонованої праймерної системи (TTTGGGTGCTTAGGTTTCATCC та ATCATCACTAACCATCTCAGGAC) дає змогу ефективно фланкувати та ампліфікувати фрагмент п'ятого екзону гену плацентарного лактогену, розміром у 239 п.н. Ефективна температура відпалу праймерів склала 58°C. Результати досліджень за використання методів біоінформатики доведено експериментальними даними.

3. Оптимізовано та апробовано методику електрофоретичного розділення ампліфікованих фрагментів другого екзону фактору некрозу пухлини альфа (SSCP-аналіз). Встановлено, що для ефективного генотипування необхідно використовувати 12% поліакриламідний гель зі співвідношенням акриламід/бісакриламід 100/1 та додаванням гліцерину до 5 % від загального об'єму гелю.

3.2. Поліморфізм локусів *PRL*, *PL*, *GHR*, *LEP*, *TNF-α* та *MYF5* у дослідних популяціях великої рогатої худоби

Дослідження поліморфізму функціональних генів – одна з найбільш актуальних завдань сучасного тваринництва. Багато в чому актуальність досліджень заснована на необхідності проведення популяційних досліджень з метою вивчення мікроеволюційних процесів у різних популяціях тварин. Однак, дослідження поліморфізму локусів кількісних ознак, поряд із завданнями з вивчення та збереження біорізноманіття тварин, вирішує, також, й завдання удосконалення методів добору та оцінки особин у контексті селекційної роботи, що проводиться. У дисертаційній роботі проводили дослідження поліморфізму генів пролактину, плацентарного лактогену, рецептору гормону росту, лептину та міогенного фактору 5 з використанням методу PCR-RFLP. Поліморфізм гену фактору некрозу пухлини-α досліджували із використанням методу SSCP. Всі

дослідження проведено за використання оптимізованих методичних підходів, викладених у розділі 3.1.

3.2.1. RsaI-поліморфізм четвертого екзону гену пролактину

Поліморфізм гену пролактину, в контексті дисертаційних досліджень, пов'язаний з транзицією цитозину в тимін у положенні 35106206, що, у свою чергу, призводить до виникнення сайту рестрикції для RsaI та, відповідно, до утворення двох алелів С та Т. Кодування алелів визначається наявністю цитозину або тиміну в сайті рестрикції для RsaI. Патерни рестрикції та відповідні алелі наведено на рис. 3.7.

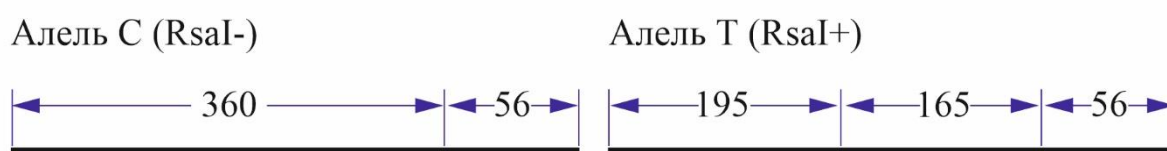


Рис. 3.7 Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу пролактину. Розмір алелів наведено в п.н.

Слід зазначити, що додатково до поліморфного сайту кожен з алелів містить у своєму складі мономорфний сайт рестрикції для RsaI. Наявність мономорфного сайту є перевагою у даному випадку з методологічної точки зору, так як це унеможливорює потенційну плутанину, що може створюватися внаслідок «неповної» активності ендонуклеази рестрикції. Таким чином, наявність мономорфного сайту – це одна з переваг запропонованої праймерної системи для визначення поліморфізму локусу пролактину (розділ 3.1).

Використання запропонованого методичного підходу дало змогу виявити поліморфізм у дослідному локусі. На рис. 3.8 наведено електрофореграму продуктів рестрикції четвертого екзону локусу пролактину в дослідних популяціях тварин.

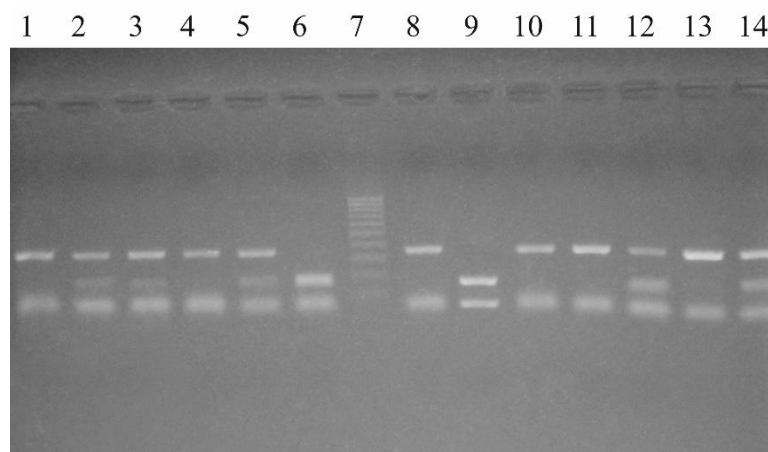


Рис. 3.8 Електрофореграма продуктів рестрикції четвертого екзону гену пролактину в дослідних популяціях корів. 1, 4, 8, 10, 11, 13 – генотип СС; 7 – маркер молекулярних мас М-50; 2, 3, 5, 12, 14 – СТ; 6, 9 – ТТ

В обох популяціях тварин виявлено особин всіх трьох можливих генотипів – СС, СТ та ТТ. Наявні патерни рестрикції повністю відповідають очікуванню, які наведені на рис. 3.7. Алель С представлений на електрофореграмі двома фрагментами, алель Т – трьома. Кожен з генотипів представлений відповідною комбінацією фрагментів – гомозиготи СС характеризуються фрагментами, довжиною 360 та 56 п.н.; гомозиготи ТТ – 195, 165 та 56 п.н.; гетерозиготи СТ – 360, 195, 165 та 56 п.н. відповідно.

Аналіз відповідності розподілу особин за різними генотипами у дослідних популяціях корів стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом наведено в таблиці 3.3.

За результатами досліджень встановлено, що популяція корів породи українська чорно-ряба молочна знаходиться в стані генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, в той час як популяція корів породи українська червоно-ряба демонструє наявне відхилення від рівноважного стану. Відхилення від рівноважного стану може бути викликано як тиском добору, внаслідок здійснення різних селекційних програм, так і феноменом дрейфу генів. У будь-якому випадку відсутність порушень рівноважного стану дослідної популяції дає

змогу прогнозувати частоти алелів та генотипів у наступних генераціях тварин, а також вказує на те, що селекційна робота, що здійснюється, не призводить до змін у значеннях частот алелів та свідчить про достатньо «стабільну» та «сформульовану» генетичну структуру дослідної популяції тварин.

Таблиця 3.3

Відповідність розподілу частот генотипів за локусом PRL стану генетичної рівноваги у дослідних популяціях корів

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	$(O-E)^2/E$	χ^2	О	Е	$(O-E)^2/E$	χ^2
СС	74	72,25	0,04	0,55	42	33,64	2,08	13,5
СТ	23	25,5	0,26		31	48,72	6,45	
ТТ	3	2,25	0,25		27	17,64	4,97	

Примітка: О – фактична кількість особин тварин певного генотипу; Е – очікувана кількість особин тварин певного генотипу

Незважаючи на деякі спільні риси за характеристикою домінуючого алелю (алель С в обох породах ВРХ) за розподілом частот алелів та генотипів встановлено статистично вірогідні відмінності між дослідними популяціями корів.

Частоти алелей та гомозиготних генотипів вірогідно ($p < 0,001$) різняться в дослідних групах тварин. Також для обох дослідних популяцій є характерним переважання частоти алеля С над Т, однак ступень вираженості цієї різниці не є однаковою. Так, популяція корів української чорно-рябої молочної породи у порівнянні з червоно-рябою молочною демонструє більш виражене домінування за значенням частоти алелю С над Т (0,85 проти 0,15 та 0,58 проти 0,42) (рис. 3.9).

Також суттєву різницю між показниками дослідних популяцій встановлено й для значень частоти “мінорного” алелю Т. У популяції корів чорно-рябої породи виявлено лише 3 особини з гомозиготним генотипом ТТ, у

той час як у популяції червоно-рябої породи – практично у 9 разів більше (27 особин). Відповідно для другої популяції є характерним більш низька частота зустрічальності “мажорного” генотипу *CC* (майже двократна різниця). Для другої популяції виявлено більшу кількість гетерозиготних особин.

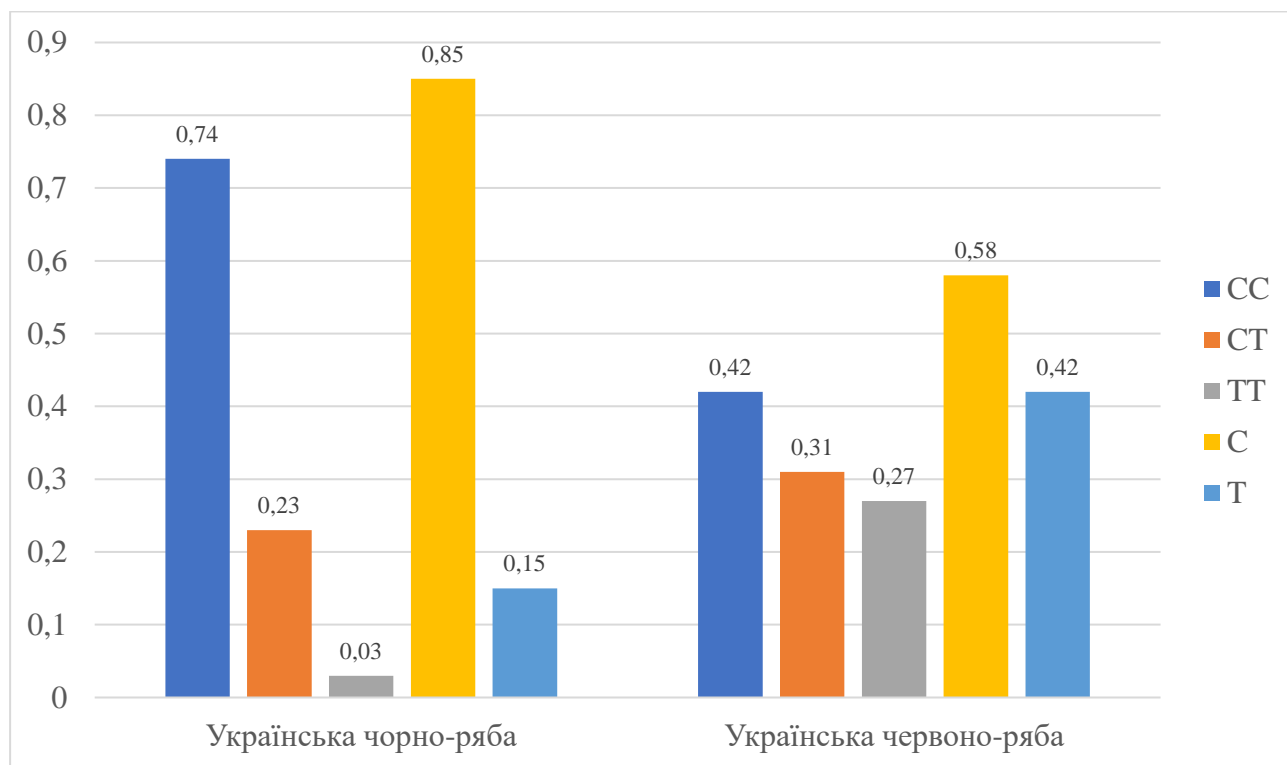


Рис. 3.9 Частоти генотипів та алелів за локусом *PRL* у дослідних популяціях корів

За значенням показника F_{is} у популяції корів червоно-рябої породи виявлено ексцес гомозиготних особин, що, на нашу думку, й призвело до відхилення від рівноважного стану (саме за рахунок гомозиготних особин).

У той же час, саме друга дослідна популяція демонструє майже максимальний рівень поліморфізму для двоалельних систем за значенням параметру ефективної кількості алелів (n_e).

Загальні генетико-популяційні параметри дослідних популяцій тварин наведено у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

**Основні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за
локусом пролактину**

Порода корів	Ca	n _e	H _o	H _e	F _{is}
Українська чорно-ряба молочна	0,75	1,33	0,23	0,25	0,08
Українська червоно- ряба молочна	0,51	1,96	0,31	0,49	0,37

У будь-якому випадку, розподіл особин за певними генотипами локусу пролактину дає всі передумови для проведення аналізу продуктивних якостей особин за окремими генотипами у наших наступних дослідженнях.

3.2.2. RsaI-поліморфізм у п'ятому екзоні гену плацентарного лактогену

Алельні варіанти локусу плацентарного лактогену у п'ятому екзоні виникають внаслідок виникнення сайту рестрикції для RsaI, що, у свою чергу, призводить до наявності двох патернів рестрикції, які відображені на рис. 3.10.



Рис. 3.10 Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу плацентарного лактогену. Розмір алелів наведено в п.н.

Використання апробованих праймерів для фланкування п'ятого екзону дало змогу успішно ампліфікувати дослідні фрагменти та провести їх подальший аналіз.

На рис. 3.11 наведено електрофореграму рестрикції ампліфікованих фрагментів гену *PL*.

За результатами проведених досліджень з'ясовано, що локус плацентарного лактогену за *RsaI*-поліморфізмом у п'ятому екзоні є мономорфним в популяціях обох порід корів. У наявності лише особини з генотипом CC (*RsaI*-/*RsaI*-).

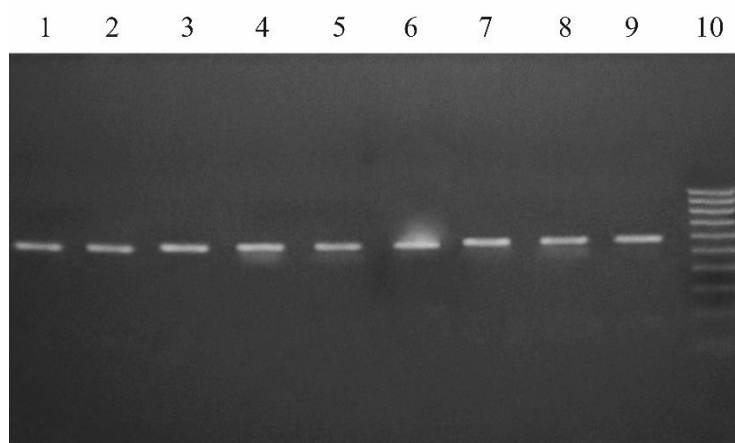


Рис. 3.11 Електрофореграма продуктів рестрикції п'ятого екзону гену плацентарного лактогена у дослідних популяціях корів.

1-9 – генотип CC (*RsaI*-/*RsaI*-); 10 – маркер молекулярних мас М-50

На електрофореграмі присутні лише бенди розміром у 239 п.н. Визначений патерн рестрикції повністю відповідає теоретично очікуваному, структуру якого наведено на рис. 3.10., та який характеризується відсутністю сайту рестрикції для *RsaI* та, відповідно, наявністю фрагменту, який за розміром є ідентичним первинному амплікону. Зі всього масиву проаналізованих тварин жодної особини з іншим генотипом, як гетерозиготним, так і гомозиготним, не виявлено.

З урахуванням отриманих даних (мономорфного характеру локусу плацентарного лактогену) генетична структура дослідних популяцій тварин є абсолютно однорідною та характеризується повною відсутністю варіабельності та мінливості (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Відповідність розподілу частот генотипів за локусом *PL* стану генетичної рівноваги у дослідних популяціях корів

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	$(O-E)^2/E$	χ^2	О	Е	$(O-E)^2/E$	χ^2
СС	100	-	-	-	100	-	-	-
СТ	0	-	-		0	-	-	
ТТ	0	-	-		0	-	-	

Відповідно всьому вищевикладеному дослідні популяції тварин за розподілом частот генотипів за локусом плацентарного лактогену є ідентичними, жодних відмінностей не виявлено, що й відображено на рис. 3.12.

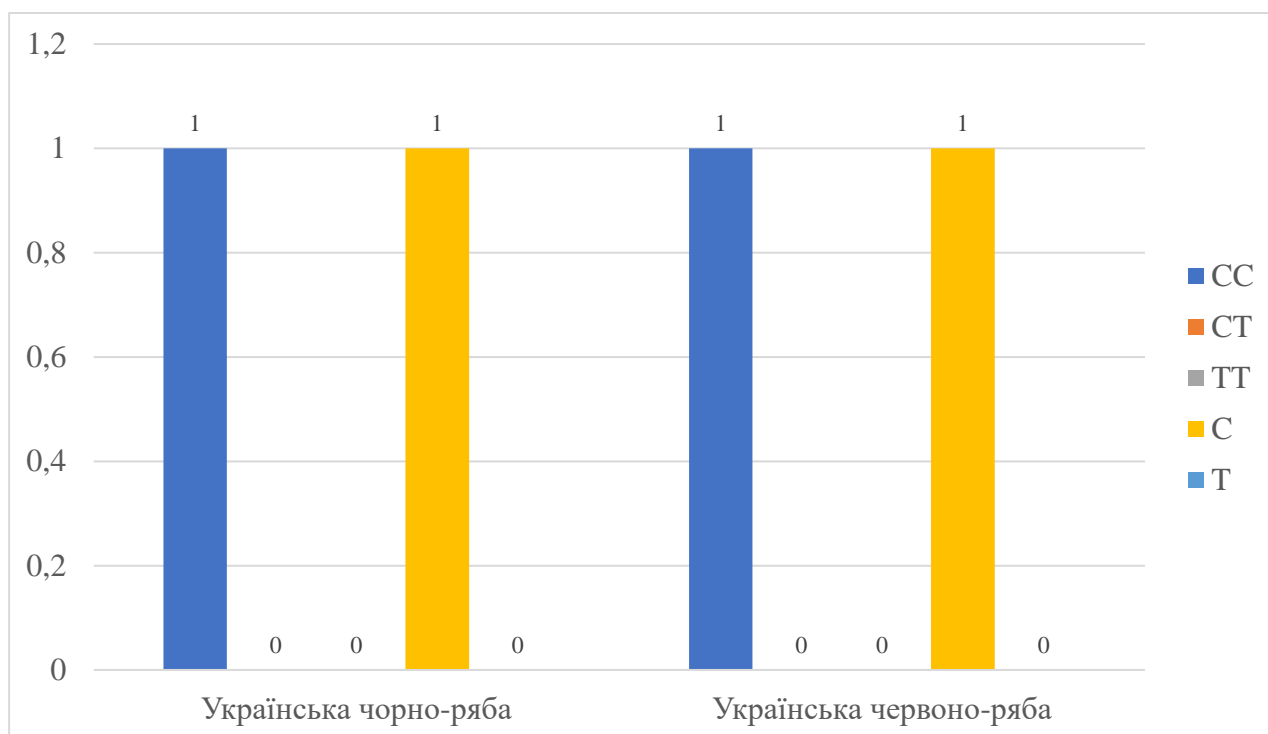


Рис. 3.12 Частоти генотипів та алелів за локусом *PL* у дослідних популяціях корів

Мономорфний стан локусу плацентарного лактогену за RsaI-поліморфізмом у п'ятому екзоні призводить до певних відмінностей (від інших проаналізованих у дисертаційній роботі локусів) у значеннях загальних генетико-популяційних параметрів дослідних груп тварин (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

**Основні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за
локусом плацентарного лактогену**

Порода корів	Ca	n _e	H _o	H _e	F _{is}
Українська чорно-ряба молочна	1	1	0	0	-
Українська червоно-ряба молочна	1	1	0	0	-

В обох популяціях відсутні гетерозиготні особини, що призводить до неможливості визначення значень H_o, H_e та F_{is}. Коефіцієнт гомозиготності дорівнює одиниці. У випадку, що спостерігається, значення ефективного числа алелів дорівнює одиниці, що додатково свідчить про відсутність будь-якої варіативності за цим поліморфізмом.

Мономорфність локусу плацентарного лактогену за RsaI-поліморфізмом у п'ятому екзоні, поряд з показниками генетико-популяційної структури, призводить до неможливості проведення аналізу асоціативного зв'язку різних алельних варіантів та генотипів з продуктивними ознаками тварин та, відповідно, обґрунтовує виключення локусу *PL* (за конкретним поліморфізмом) з потенційних програм маркер-асоційованої селекції корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід. Однак слід зазначити, що в інших популяціях корів як чорно-рябої, так і червоно-рябої молочної породи, локус плацентарного лактогену за зазначеним поліморфізмом може бути поліморфним, що додатково до всіх інших факторів вказує на необхідність

проведення аналізу особливостей генетичної структури окремо для кожного випадку.

3.2.3. AluI-поліморфізм промоторного фрагменту гену рецептору гормону росту

AluI-поліморфізм у промоторному фрагменті гену рецептору гормону росту призводить до виникнення двох алельних варіантів – AluI⁺ та AluI⁻, в яких, відповідно, наявний або відсутній сайт рестрикції. Схема патернів рестрикції та відповідні алелі наведено на рис. 3.13.

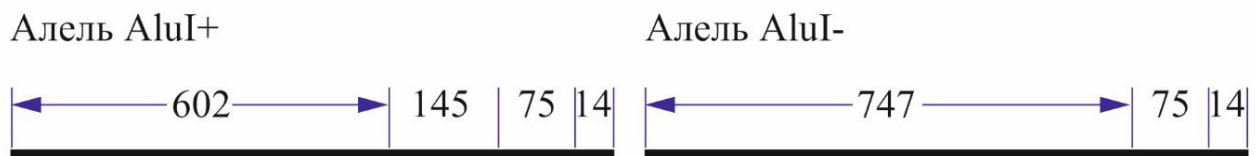


Рис. 3.13 Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу рецептору гормону росту. Розмір алелів наведено в п.н.

Алель AluI⁻ позначено умовно, лише за рахунок відсутності поліморфного сайту, так як він містить два мономорфних сайти, що присутні також і в алелі AluI⁺. У свою чергу, алель AluI⁺ містить додатковий сайт для AluI, що й визначає загальне кодування алелів.

За використання рестрикційного аналізу виявлено AluI-поліморфізм у промоторному фрагменті гену рецептору гормону росту.

За результатами проведених досліджень встановлено, що в межах обох дослідних популяцій корів наявні особини зі всіма можливими варіантами генотипів – AluI⁺/AluI⁺, AluI⁺/AluI⁻ та AluI⁻/AluI⁻.

Наявні патерни рестрикції повністю відповідають очікуваним, які наведені на рис. 3.13. Алель AluI⁺ представлений на електрофореграмі чотирма фрагментами, алель AluI⁻ – трьома. В обох випадках найлегші фрагменти на

електрофореграми практично відсутні внаслідок дифузії ДНК в гелі при заданих умовах розділення рестрикційних фрагментів.

На рис. 3.14 наведено електрофореграму продуктів рестрикції локусу рецептору гормону росту в дослідних популяціях тварин.

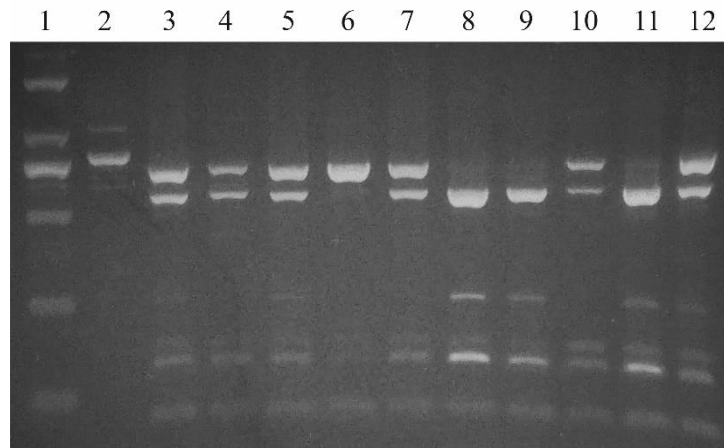


Рис. 3.14 Поліморфізм гену рецептору гормону росту (AluI-поліморфізм промоторного фрагменту) у дослідних популяціях корів. 1 – маркер молекулярних мас DL2000; 2 – первинний амплікон; 3-5, 7, 10, 12 – генотип AluI+/AluI-; 6 – генотип AluI-/AluI-; 8, 9, 11 – генотип AluI+/AluI+.

Слід відмітити, що внаслідок особливостей розмірів рестрикційних фрагментів генотипи особин за дослідним поліморфізмом можна успішно визначати аналізуючи лише найбільш важкі бенди (фрагменти ДНК на електрофореграмі) розміром 747 та 602 п.н. У такому випадку (за розподілом важких фрагментів), генотип AluI+/AluI+ представлений одним бендом, розміром 602 п.н.; генотип AluI+/AluI- – двома бендами, розміром 747 та 602 п.н.; AluI-/AluI- – одним бендом, розміром 747 п.н.

За результатами досліджень встановлено, що за AluI-поліморфізмом промоторного фрагменту гену рецептора гормону росту обидві популяції тварин знаходяться у стані генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом (значення кількості особин за певними генотипами практично співпадає з теоретично очікуваною кількістю), що свідчить про відсутність тиску добору за цим локусом.

Розрахунки фактичних та теоретичних значень кількості особин та відповідності стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом за використання методу χ^2 наведено у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

Відповідність розподілу частот генотипів за локусом GHR стану генетичної рівноваги у дослідних популяціях корів

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	(О-Е) ² /Е	χ^2	О	Е	(О-Е) ² /Е	χ^2
СС	35	37,21	0,13	0,86	27	29,16	0,16	0,76
СТ	52	47,58	0,41		54	49,68	0,38	
ТТ	13	15,21	0,32		19	21,16	0,22	

Незважаючи на рівноважний стан обох порід тварин за співвідношенням частот генотипів та алелів за дослідним локусом популяції дещо різняться між собою (рис. 3.15).

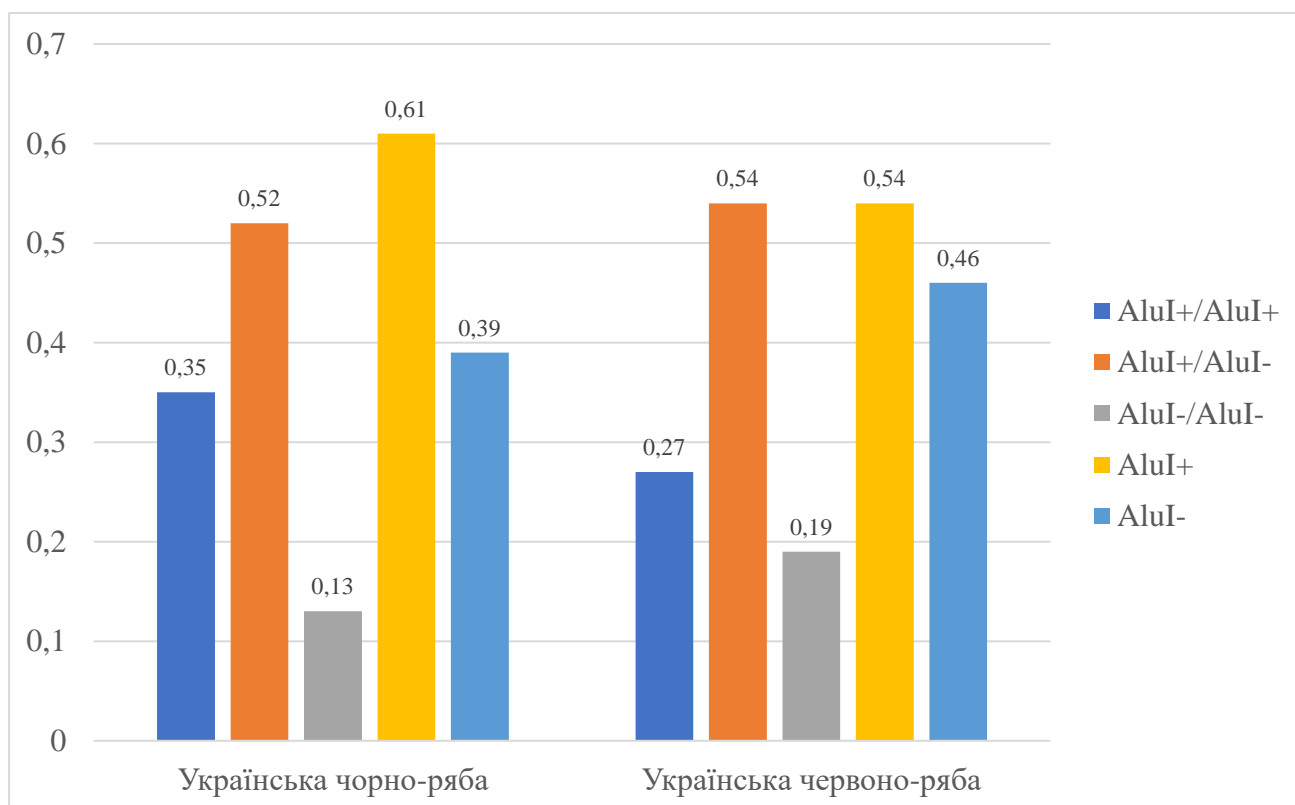


Рис. 3.15 Частоти генотипів та алелів за локусом GHR у дослідних популяціях корів

У популяції української чорно-рябої породи виявлено превалювання частоти зустрічальності алеля $AluI^+$ на 56% від $AluI^-$, в той час як у популяції корів червоно-рябої породи частота алелю $AluI^+$ також вища, але лише на 17%. Незважаючи на виявлені відмінності різниця за значенням частот алелів між двома групами тварин не є статистично вірогідною. Більш рівні значення частот алелів у другій популяції тварин виникають внаслідок більш «збалансованої» структури за частотами відповідних генотипів – у порівнянні з першою групою виявлено меншу кількість відмінностей за значенням частот гомозиготних особин $AluI^+/AluI^+$ та $AluI^-/AluI^-$.

За значенням основних генетико-популяційних параметрів дослідні породи корів демонструють дуже велику подібність.

Так, наприклад, значення коефіцієнту фіксації Райту в обох популяціях майже однакові (-0,08) та свідчать про незначний ексцес гетерозиготних особин, який майже не впливає на стан генетичної рівноваги. Також у дослідних популяціях дуже схожі параметри фактичної та очікуваної гетерозиготності.

Загальні генетико-популяційні параметри дослідних популяцій тварин за локусом *GHR* наведено у таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

**Основні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за
локусом рецептору гормону росту**

Порода корів	S_a	n_e	H_o	H_e	F_{is}
Українська чорно-ряба молочна	0,52	1,92	0,52	0,48	-0,08
Українська червоно- ряба молочна	0,50	2	0,54	0,50	-0,08

Стосовно параметру ефективного числа алелів – обидві популяції характеризуються практично максимальним (1,92 та 2) значенням цього

показнику, що вказує на дуже високий для класичних двохалельних систем рівень поліморфності локусу, що, у свою чергу, дає можливість у подальшому прогнозувати розподіл алельних частот у популяціях наступних генерацій.

3.2.4. HphI-поліморфізм у третьому екзоні гену лептину (мутація A59V)

Алельні варіанти гену лептину (мутація A59V) виникають внаслідок HphI-поліморфізму в третьому екзоні гену, що, у свою чергу, призводить до появи рестрикційних фрагментів певного розміру. Схема патернів рестрикції та відповідних алелів наведена на рис. 3.16.



Рис. 3.16 Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу лептину. Розмір алелів наведено в п.н.

Використання рестрикційного аналізу дало змогу виявити варіабельність гену лептину у дослідних популяціях тварин. Отримані патерни рестрикції повністю відповідають очікуванам.

Як свідчать результати досліджень, локус лептину є поліморфним в обох дослідних популяціях. У кожній популяції корів наявні особини за всіма можливими генотипами (СС, СТ, ТТ).

На рис. 3.17 представлено електрофореграму продуктів рестрикції третього екзону гену лептину.

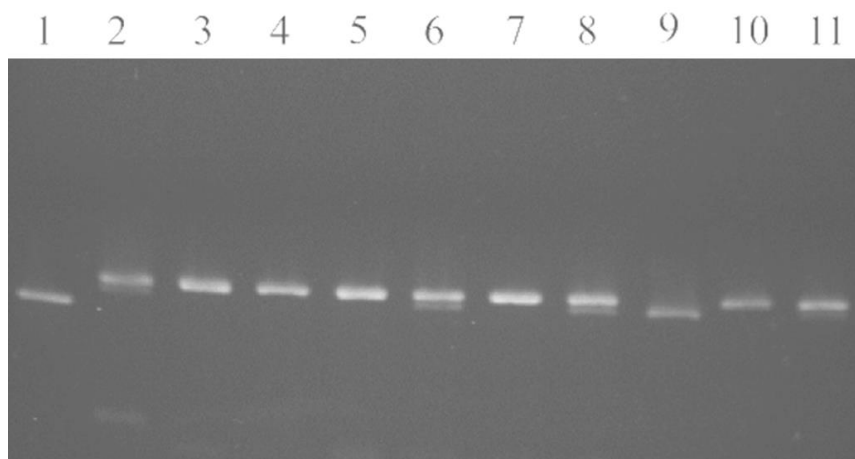


Рис. 3.17 Поліморфізм гену лептину (мутація A59V) у дослідних популяціях корів. 1 – маркер молекулярних мас (284 п.н.); 2, 6, 8, 11 – генотип СТ; 3-5, 7, 10 – СС; 9 – ТТ

За результатами досліджень проведено аналіз відповідності розподілу особин за різними виявленими генотипами (СС, СТ та ТТ) у дослідних популяціях корів різних порід. Дані, стосовно відповідності стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом за локусом лептину, наведено в таблиці 3.9.

Таблиця 3.9

Відповідність розподілу частот генотипів за локусом LEP стану генетичної рівноваги у дослідних популяціях корів

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	$(O-E)^2/E$	χ^2	О	Е	$(O-E)^2/E$	χ^2
СС	64	59,29	0,374	4,97	48	51,84	0,284	2,42
СТ	27	35,42	2,002		47	40,32	1,107	
ТТ	9	5,29	2,602		5	7,84	1,029	

За результатами досліджень встановлено, що популяція української червоно-рябої породи знаходиться у стані генетичної рівноваги, в той час як популяція української чорно-рябої породи – демонструє істотне відхилення.

За співвідношенням частот генотипів лептину дослідні популяції суттєво різняться між собою (рис. 3.18).

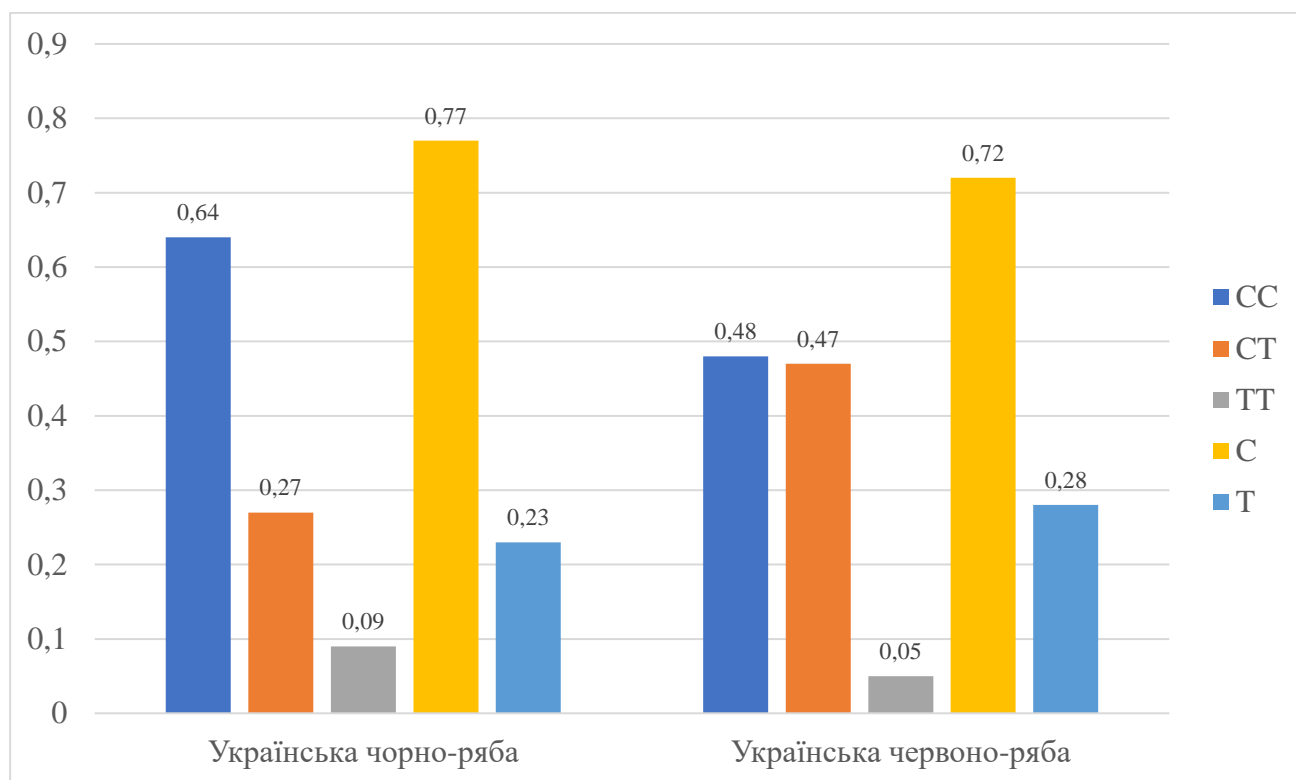


Рис. 3.18 Частоти генотипів та алелів за локусом LEP у дослідних популяціях корів

Популяція української чорно-рябої породи характеризується значним переваженням кількості особин з генотипом CC, в той час як у популяції української червоно-рябої такої закономірності не виявлено. За значенням частот генотипів CC та CT у різних групах тварин відмінності вірогідні при $p < 0,05$ та $p < 0,01$ відповідно. У популяції корів української чорно-рябої породи частота алеля C (HphI-) склала 0,77; алеля T (HphI+) – 0,23 проти 0,72 та 0,28 відповідно. Незважаючи на отримані дані стосовно статистичної значимості відмінностей

частот генотипів між різними популяціями різниця у частотах алелів не є вірогідною.

Результати вищенаведених досліджень свідчать про те, що обидві популяції корів характеризуються підвищеними значеннями частоти алеля С, що, приймаючи до уваги спільну спрямованість напряму продуктивності тварин дослідних порід, може бути пов'язаним із селективним тиском у напямку збільшення параметрів молочної продуктивності. Зв'язок алеля С з показниками молочної продуктивності корів буде проаналізований та детально розглянутий у наступних розділах дисертаційної роботи.

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

Таблиця 3.10

Основні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за локусом лептину

Порода корів	Ca	n _e	H _o	H _e	F _{is}
Українська чорно-ряба	0,65	1,54	0,27	0,35	0,23
Українська червоно-ряба	0,60	1,66	0,47	0,40	-0,18

За показником фактичної та очікуваної гетерозиготності дослідні популяції корів суттєво відрізняються, цей показник досягає свого максимального значення для параметру H_o. У популяції корів чорно-рябої молочної породи індекс фіксації Райта склав 0,23; що вказує на значний ексцес гомозиготних особин (що й призвело в решті решт до відхилення популяції від рівноважного стану, $\chi^2=4,97$; $p<0,05$).

У свою чергу, у популяції корів червоно-рябої молочної породи індекс фіксації Райта дорівнює -0,18; що вказує на виражений ексцес кількості гетерозиготних особин, що, однак, не призвело до відхилення від рівноважного стану за Харді-Вайнбергом.

За показником ефективного числа алелів популяція червоно-рябої породи характеризується декілька більшим значенням – 1,66 проти 1,54 у чорно-рябої.

Результати, що отримані у дисертаційних дослідженнях за значенням частот алелів гену лептину (мутація A59V), відповідають результатам інших авторів. Так, наприклад, значне перевищення частоти зустрічальності алеля С над Т у популяціях молочних корів різних порід встановлено в роботах Liefers S.C. et al. (2003) для Голштино-Фризької худоби; Clempson A.M. et al. (2011) для Голштинської. Подібну закономірність виявлено також і низкою авторів для локальних/аборигенних порід та породних груп великої рогатої худоби: Yazdani H. et al. (2010) для Іранської худоби; Silva R.C.G. et al. (2012) – в індійських популяціях. Abbas N. et al. (2019) і Maletic M. et al. (2019) відзначають переважання частоти алеля С до мономорфного стану у Пакистанських та Балканських корів. На нашу думку, закономірності, що спостерігаються, цілком можливо пояснити впливом напряму та інтенсивності селекційної роботи, що спрямована на підвищення показників молочної продуктивності тварин, а також стохастичними генетичними факторами (дрейф генів).

3.2.5. TaqI-поліморфізм у другому інтроні гену міогенного фактору 5

TaqI-поліморфізм у другому інтроні гену міогенного фактору 5 призводить до виникнення двох алельних варіантів – TaqI⁺ та TaqI⁻. Патерни рестрикції та відповідні алелі наведено на рис. 3.19.

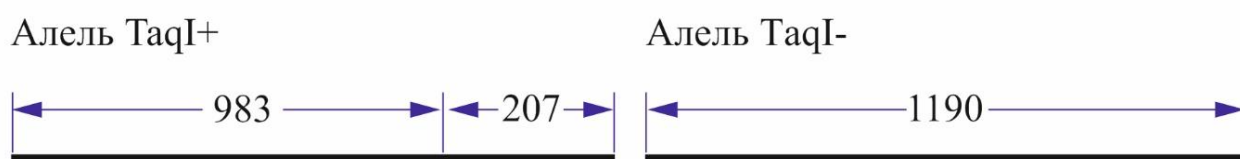


Рис. 3.19 Патерни рестрикції та відповідні алелі для локусу міогенного фактору 5. Розмір алелів наведено в п.н.

На відміну від інших розглянутих нами локусів у цьому випадку ампліфіковані фрагменти гену не містять у своєму складі мономорфного сайту для відповідної ендонуклеази рестрикції. Також слід відмітити, що у TaqI⁺ алелю різниця між рестрикційними фрагментами є дуже великою, що дає змогу генотипувати особин лише за аналізом розподілу найважчих бендів на електрофореграмі.

На рис. 3.20 наведено електрофореграму продуктів рестрикції локусу міогенного фактору 5 у дослідних популяціях тварин.

За результатами проведених досліджень встановлено, що локус *MYF5* в обох дослідних популяціях корів є поліморфним – у кожній групі тварин виявлено особин зі всіма можливими генотипами.

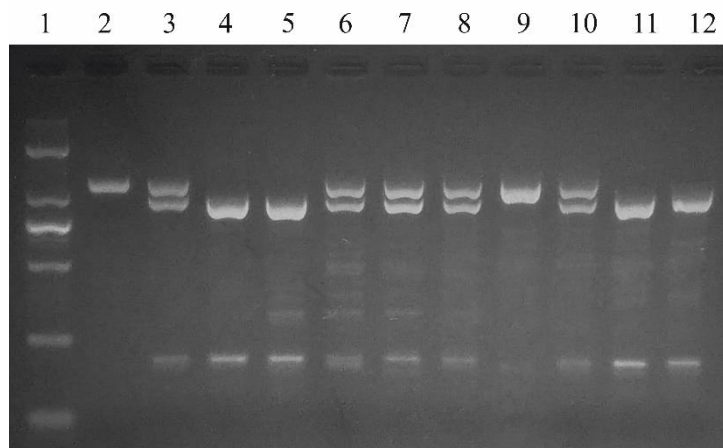


Рис. 3.20 Поліморфізм гену міогенного фактору 5 (TaqI-поліморфізм у другому інтроні) у дослідних популяціях корів. 1 – маркер молекулярних мас DL2000; 2 – первинний амплікон; 3, 6-8, 10 – генотип TaqI⁺/TaqI⁻; 4, 5, 11, 12 – генотип TaqI⁺/TaqI⁺; 9 – генотип TaqI⁻/TaqI⁻.

Наявні патерни рестрикції повністю відповідають очікуваним. Генотип TaqI⁺/TaqI⁺ представлений на електрофореграмі у вигляді двох фрагментів розміром 983 та 207 п.н.; генотип TaqI⁻/TaqI⁻ – одним, що за розміром співпадає з ампліконом (1190 п.н.); гетерозиготи TaqI⁺/TaqI⁻ – трьома фрагментами розміром 1190, 983 та 207 п.н. (рис. 3.19).

Аналіз відповідності розподілу особин за різними генотипами *MYF5* у дослідній популяції корів стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом наведено в таблиці 3.11.

Таблиця 3.11

Відповідність розподілу частот генотипів за локусом MYF5 стану генетичної рівноваги у дослідних популяціях корів

Генотип	Порода ВРХ							
	Українська чорно-ряба молочна				Українська червоно-ряба молочна			
	О	Е	$(O-E)^2/E$	χ^2	О	Е	$(O-E)^2/E$	χ^2
TaqI+/TaqI+	41	42,25	0,04	0,1	36	40,96	0,6	3,54
TaqI+/TaqI-	47	45,5	0,05		55	46,08	1,73	
TaqI-/TaqI-	12	12,25	0,01		9	12,96	1,21	

За результатами досліджень встановлено, що генетична структура дослідних популяцій тварин на перший погляд є дуже подібною. Так, в обох популяціях присутні особини зі всіма можливими за цим локусом генотипами. У червоно-рябої молочної породи наявна чотирьохкратна різниця між кількістю гомозиготних особин. У той же час у популяції корів чорно-рябої породи різниця також значна, але дещо менш виражена (41 проти 12) внаслідок більшої кількості гомозиготних особин TaqI-/TaqI-.

У першій популяції кількість гетерозиготних особин лише на 6 голів перевершує кількість домінуючих гомозигот TaqI+/TaqI+, у той час як у другій популяції ця різниця досягає 19 особин. Слід звернути увагу, що у популяції тварин червоно-рябої молочної породи наявна кількість певних генотипів фактично призвела до межових критичних значень за критерієм χ^2 (3,54) стосовно стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом (критичне значення для двофазових систем дорівнює 3,84). У першій групі тварин такої тенденції не виявлено.

Розглянемо більш детально дослідні популяції тварин за співвідношенням частот генотипів та алелів за локусом *MYF5* (рис. 3.21).

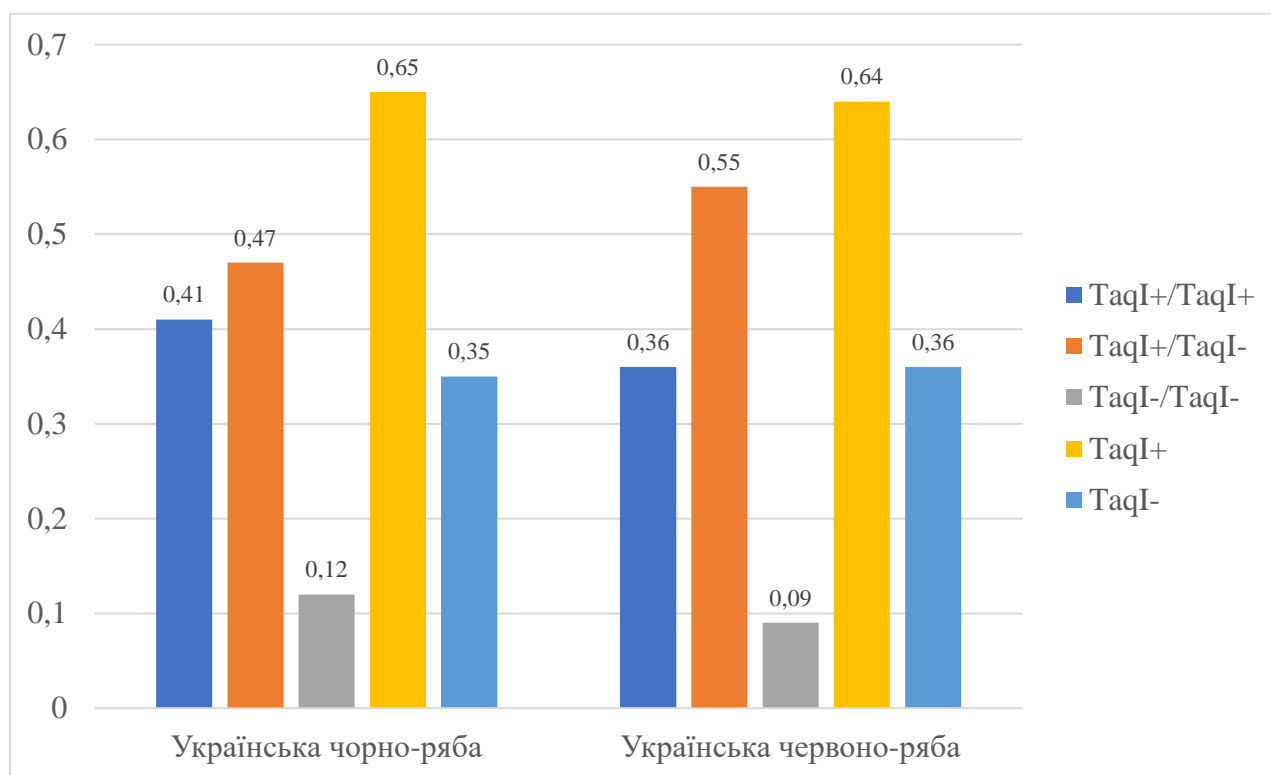


Рис. 3.21 Частоти генотипів та алелів за локусом *MYF5* у дослідних популяціях корів

У популяції корів червоно-рябої молочної породи дещо вища частота гетерозиготних особин за рахунок зменшення кількості гомозигот (особливо TaqI+/TaqI+). Але різниця у значеннях частот відповідних генотипів не є вірогідною. Також обидві популяції корів мають практично однакові значення частот алелів, та в обох випадках демонструють суттєве переваження частоти зустрічальності алеля TaqI+, що, у свою чергу, може свідчити як про особливості генетичної структури корів молочного напрямку продуктивності, так і виникати внаслідок стохастичних коливань частоти алелів (дрейф генів).

Загальні генетико-популяційні характеристики дослідних груп корів наведено у таблиці 3.12.

Таблиця 3.12

**Основні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за
локусом міогенного фактору 5**

Порода корів	Ca	n _e	H _o	H _e	F _{is}
Українська чорно-ряба молочна	0,54	1,86	0,47	0,46	-0,02
Українська червоно-ряба молочна	0,54	1,86	0,55	0,46	-0,20

Як слідує з результатів досліджень обидві популяції тварин демонструють майже співпадаючі значення показників генетичної мінливості. Виняток складають показники фактичної гетерозиготності та, як безпосередньо пов'язаний з ним, індекс фіксації. Згідно значенням індексу фіксації у популяції корів української червоно-рябої породи наявний ексцес гетерозиготних особин (20%), що, ймовірно, й послужило причиною тенденції у направленні відхилення від стану генетичної рівноваги (котра, однак, не була порушена).

3.2.6. SSCP поліморфізм у другому екзоні гену фактору некрозу пухлини- α

На відміну від інших локусів, варіативність яких проаналізовано у дисертаційній роботі, поліморфізм гену фактору некрозу пухлини- α розглянемо за іншим типом молекулярно-генетичних маркерів – SSCP. Результати досліджень особливостей генетичної структури дослідних популяцій тварин проведено на основі оптимізованих методичних підходів до генотипування особин за SSCP-поліморфізмом у другому екзоні гену *TNF- α* , що викладені у розділі 3.2.

За результатами досліджень встановлено поліморфізм другого екзону гену *TNF- α* . Електрофореграму продуктів ампліфікації наведено на рис. 3.22.

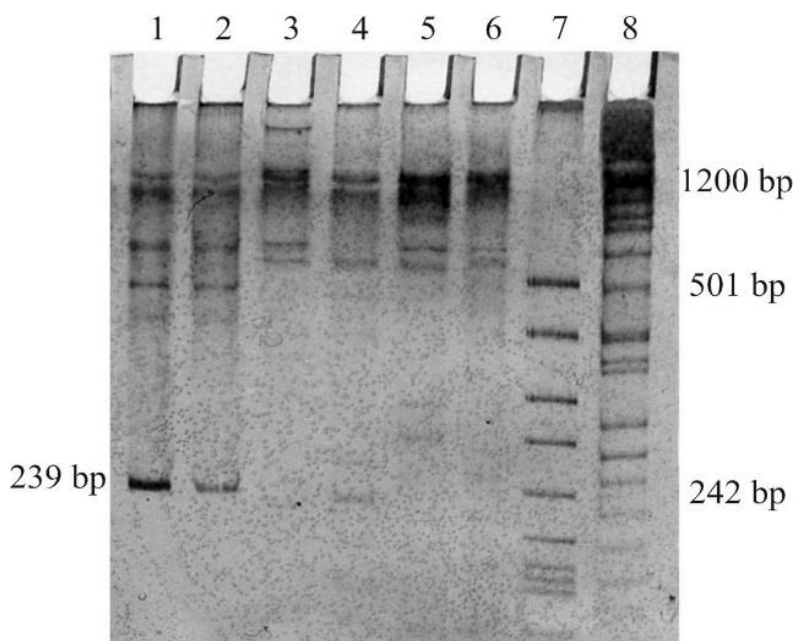


Рис. 3.22 Поліморфізм гену фактору некрозу пухлини- α (SSCP-поліморфізм у другому екзоні) у дослідних популяціях корів. 1 – генотип АЕ; 2 – АF; 3 – АВ; 4 – АС; 5 – АД; 6 – АВ; 7 – маркер молекулярних мас (pUC 19 DNA/MspI); 8 – маркер молекулярних мас (DL2000).

Слід відмітити, що на відміну від інших дослідних маркерів, у цьому випадку для розділення ампліфікованих фрагментів ДНК використовували поліакриламідний гель та фарбування сріблом.

У кожній групі тварин виявлено особин із різними генотипами за локусом *TNF- α* . За результатами аналізу одноланцюгових фрагментів ДНК виявлено 6 алелів, розміром 450-1200 п.н. Виявлено алелі А, В та F у популяції чорно-рябої та А, В, С, D, E та F – у популяції червоно-рябої молочної породи.

Аналіз відповідності розподілу особин за різними генотипами *TNF- α* у дослідній популяції корів стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом свідчить, що обидві дослідні популяції корів демонструють відхилення від стану генетичної рівноваги, що, у даному випадку, не є дивним внаслідок великої кількості алелів та відповідних генотипів у порівнянні з іншими розглянутими системами, які, як правило, обмежуються лише двома алелями.

За співвідношенням частот генотипів та алелів фактору некрозу пухлини- α дослідні популяції суттєво різняться між собою (рис. 3.23).

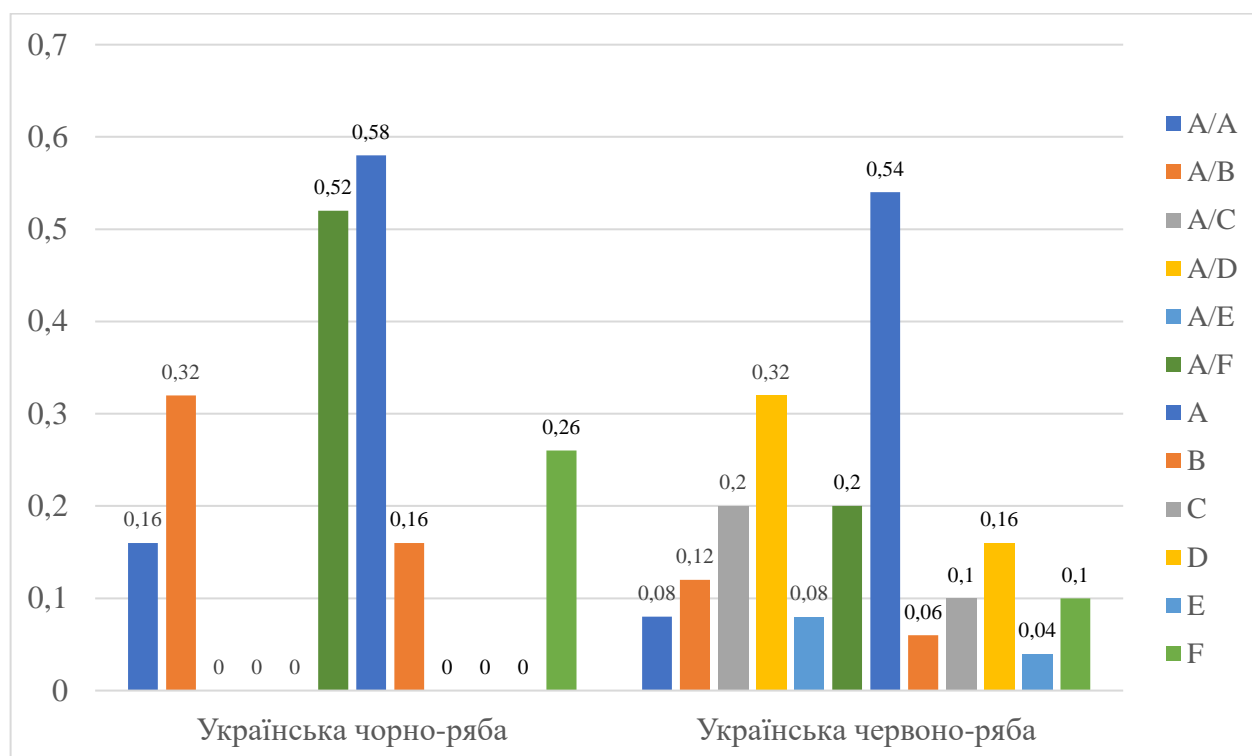


Рис. 3.23 Частоти генотипів та алелів за локусом *TNF-α* у дослідних популяціях корів

У генотипах обох порід встановлено переважання частоти зустрічальності алелю А (0,58 та 0,54 відповідно). Алелі С, D та Е мали низьку частоту зустрічальності (0,04-0,16) та були виявлені лише у популяції червоно-рябої породи корів. Гомозиготні генотипи в обох популяціях є характерними лише для алелю А.

Як свідчать результати досліджень, українська червоно-ряба молочна порода корів, у цьому випадку, демонструє суттєво більший рівень поліморфізму локусу *TNF-α* за кількістю виявлених алелів та відповідних генотипів. Однак, незважаючи на різницю в кількості алелів та генотипів значення частоти найбільш переважаючого алелю в обох популяціях практично співпадає – 0,58 проти 0,54 відповідно, що може бути наслідком загального напрямку селекційної роботи на підвищення показників молочної продуктивності.

Загальні генетико-популяційні характеристики дослідних груп корів наведено у таблиці 3.13.

Таблиця 3.13

**Основні генетико-популяційні характеристики різних порід корів за
локусом фактору некрозу пухлини- α**

Порода корів	Ca	n_e	H_o	H_e	F_{is}
Українська чорно-ряба молочна	0,43	2,33	0,84	0,57	-0,47
Українська червоно-ряба молочна	0,34	2,94	0,92	0,66	-0,39

Виходячи з результатів з аналізу отриманих даних, обидві популяції корів демонструють дуже великі значення показників гетерозиготності, як фактичної (H_o), так і теоретичної (H_e). Наявні розбіжності між показниками призводять до від'ємних значень індексу фіксації (F_{is}), що додатково свідчить про суттєвий ексцес гетерозиготних особин у дослідних популяціях, що особливо виражено для чорно-рябої молочної породи – 47 та 39% відповідно.

У свою чергу, за показником ефективної чисельності алелів популяція корів чорно-рябої молочної породи характеризується більшим рівнем поліморфізму на відміну від черво-рябої, незважаючи на дещо менші значення абсолютного показника n_e – 2,33 та 2,94 відповідно. Парадоксальна, на перший погляд, ситуація пояснюється різною кількістю алелів у дослідних групах тварин – 3 та 6. Для генетико-популяційної системи, що складається з трьох алелів, максимальне значення n_e дорівнює трьом, а для шести – дорівнює шести. Тому порівняння цих показників для обох популяцій свідчить про більш високий рівень поліморфізму саме для української чорно-рябої молочної породи.

Приймаючи до уваги високий рівень поліморфізму цього локусу, а також його потенційні можливості в бік регуляції функціонування імунної системи організму перспективними є подальші дослідження зв'язку різних алельних варіантів *TNF- α* з господарсько-корисними ознаками корів дослідних порід.

Результати досліджень розділу опубліковано в роботах [210-214].

Висновки до розділу 3.2

1. За результатами проведених досліджень встановлено, що в обох дослідних популяціях корів молочних порід локуси *PRL*, *GHR*, *LEP*, *MYF5* та *TNF-α* є поліморфними. Локус *PL* (за *RsaI*-поліморфізмом у п'ятому екзоні) є мономорфним в обох популяціях.

2. За *RsaI*-поліморфізмом у четвертому екзоні гену пролактину частота алеля С склала 0,85; алеля Т – 0,15 у популяції чорно-рябої молочної породи та 0,58 і 0,42 у популяції червоно-рябої молочної породи відповідно. У популяції корів української червоно-рябої молочної породи встановлено відхилення від стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом.

3. За *AluI*-поліморфізмом промоторного фрагменту гену рецептору гормону росту частота алеля *AluI*⁺ склала 0,61; алеля *AluI*⁻ – 0,39 у популяції чорно-рябої молочної породи та 0,54 і 0,46 у популяції червоно-рябої молочної породи відповідно. Дослідні групи корів знаходяться в стані генетичної рівноваги.

4. За *NphI*-поліморфізм у третьому екзоні гену лептину (мутація A59V) частота алеля С склала 0,77; алеля Т – 0,23 у популяції чорно-рябої молочної породи та 0,72 і 0,28 у популяції червоно-рябої молочної породи відповідно. У популяції корів української чорно-рябої молочної породи встановлено відхилення від стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом.

5. За *TaqI*-поліморфізм у другому інтроні гену міогенного фактору росту 5 частота алеля *TaqI*⁺ склала 0,65; алеля *TaqI*⁻ – 0,35 у популяції чорно-рябої молочної породи та 0,64 і 0,36 у популяції червоно-рябої молочної породи відповідно. Обидві групи корів знаходяться в стані генетичної рівноваги.

6. За *SSCP* поліморфізмом у другому екзоні ген фактору некрозу пухлини-α у популяції корів чорно-рябої породи частота алеля А склала 0,58; алеля В – 0,16; алеля F – 0,26; у популяції червоно-рябої породи частота алеля А склала 0,54; алеля В – 0,06; алеля С – 0,1; алеля D – 0,16; алеля Е – 0,04 та алеля

$F = 0,1$ відповідно. Для обох дослідних порід тварин встановлено відхилення від стану генетичної рівноваги.

3.3. Аналіз особливостей генетичної структури різних популяцій корів української чорно-рябої молочної породи за локусами кількісних ознак

З метою проведення порівняльного аналізу генетичної структури різних популяцій (Por 1 та Por 2) української чорно-рябої молочної породи відбирали біологічний матеріал у різних господарствах Харківської області. У цьому підрозділі дисертаційної роботи наведемо результати досліджень (у вигляді цифрових значень відповідних показників) для другої популяції тварин. Відповідні значення для першої популяції, а також детальний аналіз поліморфізму досліджуваних локусів наведено у підрозділі 3.2.

Для проведення досліджень визначали поліморфізм локусів *PRL*, *PL*, *TNF- α* та *LEP*.

За результатами досліджень встановлено поліморфізм за трьома з чотирьох локусів у дослідній популяції тварин.

Локус плацентарного лактогену у дослідній популяції (Por 2) за *RsaI*-поліморфізмом у п'ятому екзоні виявився мономорфним, як і в першій популяції (Por 1). В наявності лише особини з генотипом CC (*RsaI*/*RsaI*).

За іншими локусами ситуація суттєво відрізняється. У другій дослідній популяції локуси *PRL*, *TNF- α* та *LEP* виявилися поліморфними.

За локусом пролактину у другій популяції виявлено всі можливі варіанти генотипів (CC, CT и TT). Виявлені патерни рестрикції повністю відповідають очікуванім.

Дані з особливостей генетичної структури двох популяцій (Por 1 і Por 2) корів української чорно-рябої молочної породи наведено на рис. 3.24.

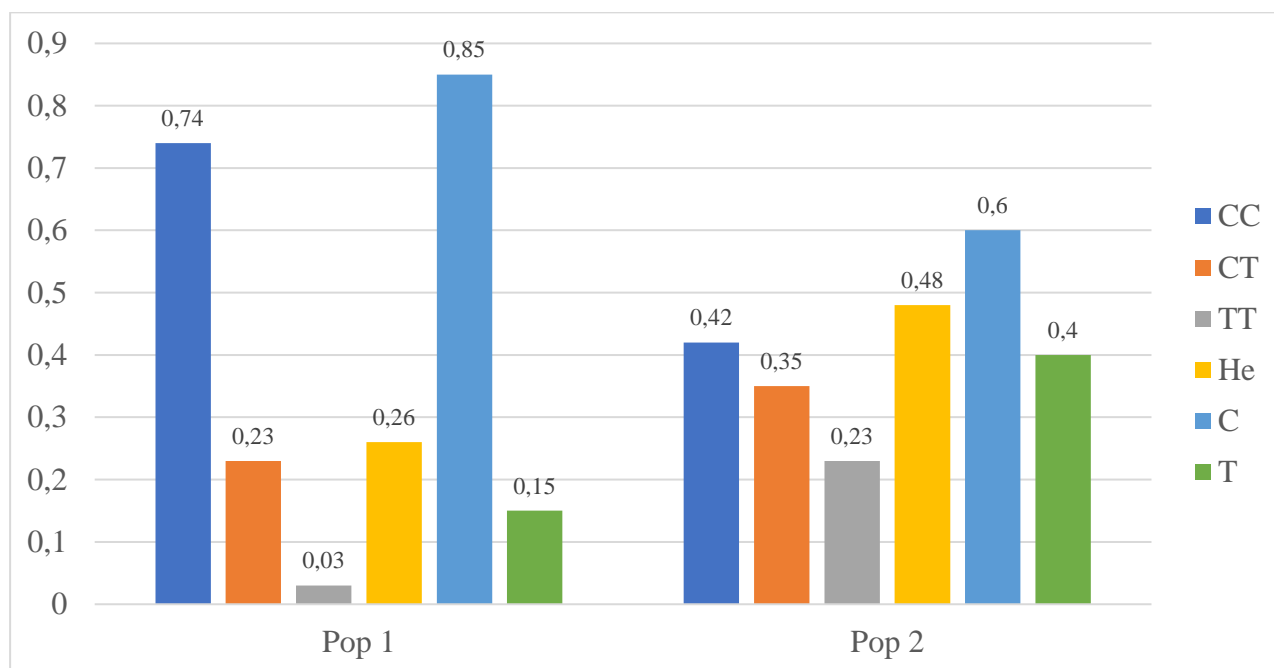


Рис. 3.24 Особливості генетичної структури двох популяцій корів української чорно-рябої молочної породи за локусом *PRL* (транзиція С/Т у положенні 35106206)

Для обох дослідних популяцій корів не встановлено відхилення від стану генетичної рівноваги (підрозділ 3.2). Незважаючи на рівноважний стан дві популяції тварин суттєво відрізняються одна від одної. Загальним для обох популяцій є превалювання частоти алеля С – 0,85 та 0,6 відповідно. Групи тварин різняться за параметрами очікуваної гетерозиготності (H_e) – 0,26 проти 0,48; що, у свою чергу, відображається на значеннях індексу фіксації Райта – 0,1 та 0,27. Але в обох випадках значення F_{is} вказують на ексцес гомозиготних особин (інбридинг), що є особливо вираженим у другій популяції.

За локусом *LEP* у популяції виявлено всі можливі варіанти генотипів (СС, СТ и ТТ). Встановлені патерни рестрикції повністю співпадають з очікуваними.

Дані з особливостей генетичної структури двох популяцій корів української чорно-рябої молочної породи наведено на рис. 3.25.

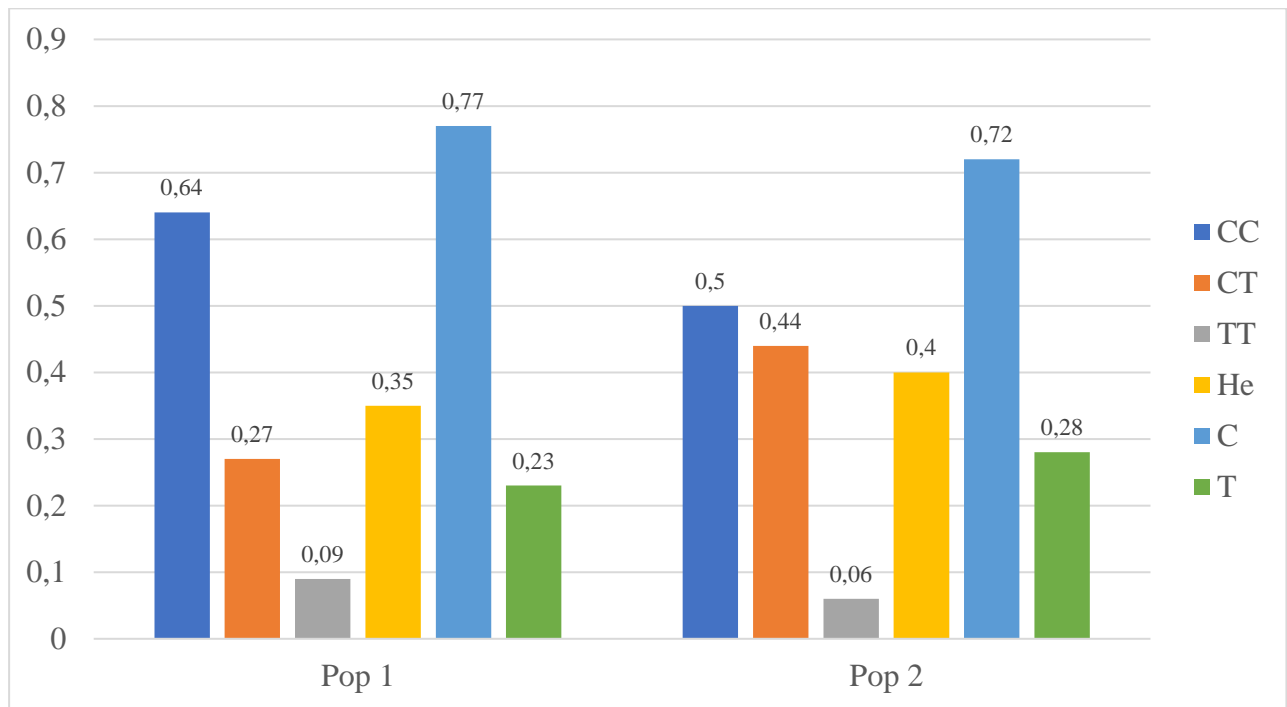


Рис. 3.25 Особливості генетичної структури двох популяцій корів української чорно-рябої молочної породи за локусом LEP (A59V, Nrhl-1 поліморфізм третього екзону)

У випадку, що розглядається, слід відмітити, що для першої популяції (Pop 1) виявлено порушення стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом (Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE) ($\chi^2 = 4,97$), у той час як для другої популяції (Pop 2) відмінностей від рівноважного стану не визначено ($\chi^2 = 0,84$). Ситуація, яку ми спостерігаємо, обумовлена, в першу чергу, відсутністю панміксії в дослідних популяціях (Pop 2), яка є основою підтримання HWE. Не зважаючи на відсутність спрямованої селекції за досліджуваним локусом, використовувані в господарствах схеми селекційно-плеємної роботи з обмеженою кількістю плідників істотно впливають на розподіл частот алелів і генотипів в невеликих за розміром штучних популяціях.

Як ми бачимо на наведеній діаграмі кількість гетерозиготних особин у другій популяції практично досягає половини вибірки, в той час як у першій популяції – лише однієї четвертої її частини. Незважаючи на подібний розподіл

частот генотипів, частоти алелів у різних популяціях різняться менш виражено. Для обох популяцій характерним є суттєве перевищення частоти зустрічаємості алелю С, що підтверджують дані інших авторів стосовно підвищеної частоти зустрічаємості цього алелю у популяціях та породах корів молочного напрямку продуктивності. Різниця у значеннях параметрів фактичної та очікуваної гетерозиготності призвела до істотних відмінностей у значеннях коефіцієнту інбридингу – індексу фіксації Райта F_{is} (0,23 проти -0,1 відповідно). Значення F_{is} є зручним параметром оцінки відхилення від HWE, а величина χ^2 між розподілом фактичних і розрахункових частот генотипів слугує критерієм достовірності цього відхилення.

У випадку з *TNF- α* ситуація ще більше різниться внаслідок особливостей SSCP-маркерів. За результатами досліджень у другій популяції тварин виявлено різні SSCP-патерни, що співпадають за структурою з отриманими раніше для першої популяції, які, при цьому, відрізняються за значенням частот зустрічаємості (рис. 3.26).

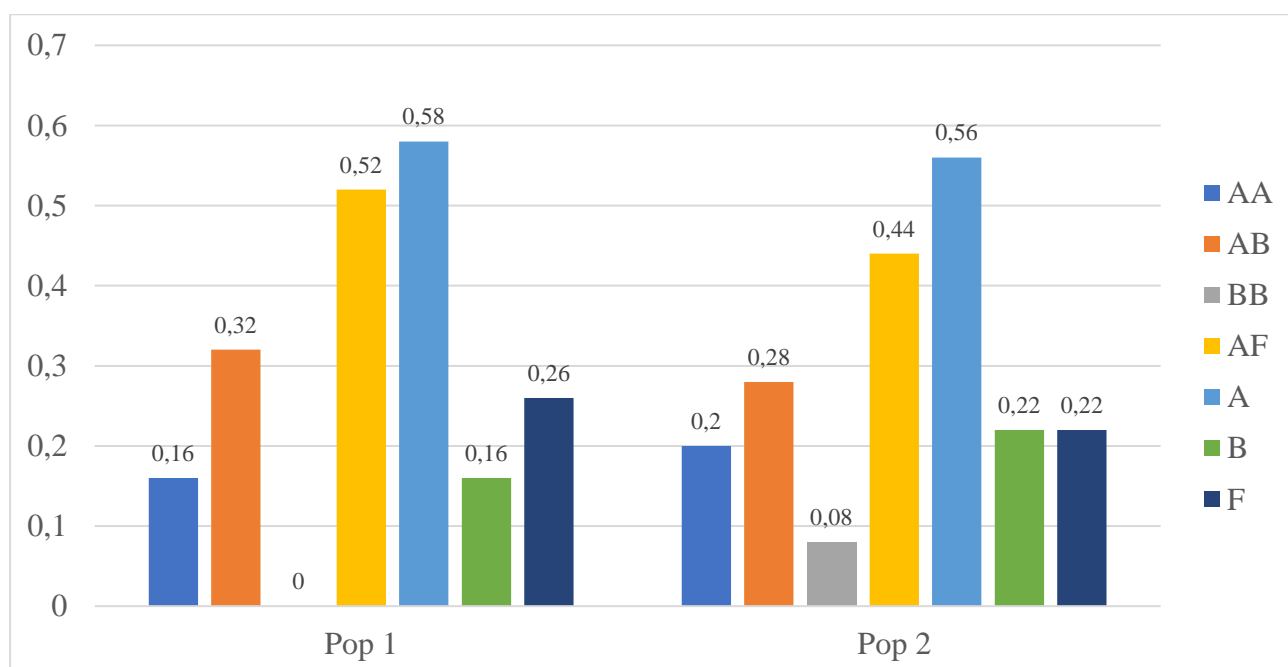


Рис. 3.26 Особливості генетичної структури двох популяцій корів української чорно-рябої молочної породи за локусом *TNF- α* (PCR-SSCP)

У дослідній популяції (Pop 2) також виявлено три алелі (як і в популяції 1) – А, В та F, однак за розподілом частот генотипів картина виглядає дещо інакше.

У другій популяції тварин виявлено алель В у гомозиготному стані (ВВ), у першій популяції цей генотип відсутній. Незважаючи на різницю у кількості виявлених генотипів та їх частоти за значенням частот алелів, дослідні популяції дуже схожі. В обох випадках переважаючим за частотою зустрічаємості є алель А. Частоти інших алелів демонструють суттєво нижчі значення.

Для першої популяції значення фактичної (H_o) та очікуваної (H_e) гетерозиготності склали 0,84 та 0,49; для другої популяції – 0,72 та 0,49 відповідно. Значення індексу фіксації Райта у першому випадку -0,71 – що вказує на досить виражений ексцес гетерозиготних особин. У другій популяції $F_{is} = -0,47$; що також свідчить про ексцес гетерозигот, який, однак, суттєво менший ніж у першій популяції.

Як слідує з досліджень, порівняння популяцій за значенням частот алелів вказує на схожі результати. В обох популяціях у кожному з випадків виявлено подібні значення частот переважаючих алелів. У той же час за аналізом частот генотипів виникають виражені відмінності, які досягають свого максимального значення у параметрах гетерозиготності (H_o). Між двома популяціями для двох локусів виявлені відмінності як за показниками очікуваної, так і фактичної гетерозиготності. При цьому, за аналізом індексу фіксації Райта виявлено перевагу гомозиготних особин у першій популяції за локусом *LEP* та значний ексцес гетерозигот за *TNF- α* . У другій популяції у кожному випадку наявний ексцес гетерозигот.

Певні поправки до результатів аналізу генетичної структури може надати той факт, що у випадку з першою популяцією вибірка складала 100 голів, а для другої – 50. Однак, у будь-якому випадку, кількість тварин, що були використані для проведення досліджень перевищує порогове значення (30 голів) чисельності популяції для малих вибірок, тому порівняння груп є коректним і об'єктивно відображає закономірності, що спостерігаються в досліджуваних популяціях ВРХ.

У свою чергу, особливості генетичної структури, на нашу думку, відображають селекційну роботу з тваринами у кожному з господарств. Мета роботи в обох випадках – максимальна реалізація продуктивного потенціалу тварин у напрямі молочної продуктивності. Однак, за умовами добору, фактор генотипу за дослідними локусами не враховувався внаслідок використання саме класичних селекційних методів (не MAS), що й призвело до картини генетичної структури, яка спостерігається у даному випадку. Варіації особливостей генетичної структури дослідних популяцій ВРХ викликані переважно відмінностями у вихідному племінному матеріалі, а також можливим дрейфом генів на фоні застосовування штучного добору в малочисельних штучних популяціях. Проте, слід зазначити, що превалювання частоти зустрічальності певних алелів обох локусів вказує на «супутній» відбір мутантних варіантів, за допомогою проведення класичних селекційних заходів. У цьому випадку закріплення «бажаного» алелю у популяції відбувається за допомогою його асоціації з показниками продуктивності тварин (молочна продуктивність у першу чергу). Альтернативні алельні варіанти закріплюються в популяції за допомогою їх "маскування" в гетерозиготному стані або в результаті мінорного ефекту на прояв кількісної ознаки. Подібні механізми не визначаються за допомогою аналізу за фенотипом, що й призводить до спостерігаємої картини та до необхідності використання молекулярно-генетичних методів досліджень.

Таким чином, за результатами досліджень при порівнянні особливостей генетичної структури двох дослідних популяцій корів української селекції за низкою локусів кількісних ознак виявлено наступні закономірності: мономорфний характер локусу *PL* в обох дослідних популяціях; превалювання частот зустрічальності «домінуючих алелів» за різними локусами (С над Т за локусом *PRL*, С над Т за локусом *LEP*, А над В и F за локусом *TNF-α*) в обох групах тварин; виражені відмінності у значеннях частот зустрічальності різних генотипів за кожним з локусів; суттєві відмінності у показниках фактичної та очікуваної гетерозиготності (відповідно і в рівні генетичної мінливості популяцій); суттєві відмінності у значенні індексу фіксації Райта (у кожній

популяції виявлено відмінності за значенням ексцесу гетерозиготних та гомозиготних особин). Відповідно, незважаючи на подібність за значенням частот алелів, різні популяції корів української чорно-рябої молочної породи суттєво відрізняються за загальними показниками генетичної мінливості.

Відмінності між значеннями частот алелів і генотипів відбуваються в результаті дії штучного добору у процесі селекційної роботи (на етапі становлення лінії чи породи). Тиск добору, зазвичай, призводить до порушення генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, що, у свою чергу, безпосередньо відображається на генетико-популяційних параметрах дослідних груп. У деяких випадках, особливо успішних, зміщення генетичної рівноваги призводить до втрати поліморфності локусу – отриманню наступної генерації, в якій досліджуваний локус знаходиться у повністю мономорфному стані (у наших дослідженнях це локус плацентарного лактогену). Інваріантність може бути бажаним бонусом, так як мономорфний характер генів або їх комплексів сприяє максимальній реалізації продуктивного потенціалу тварин в умовах сталої селекційної програми. Проте, цей факт і призводить до погіршення параметрів породи (популяції) у випадку зміни парадигми селекційної роботи або технології утримання тварин, так як повністю вичерпується безпосередній матеріал для будь-якої форми добору – генетичної мінливості. Відсутність мінливості, інваріантність, призводить до неможливості використання локусу (або будьякої іншої ознаки) у племінній роботі з тваринами.

Альтернативним варіантом виникнення відмінностей у генетичній структурі популяцій тварин однієї породи є феномен дрейфу генів – варіативності, внаслідок стохастичних факторів. В умовах сучасної генетики дрейф генів – це один з головних чинників варіацій у селекційній роботі, який заснований на оцінці та доборі особин за фенотипом. Фенотипічний добір, у більшості випадків, призводить до змін генетико-популяційної структури за результатом: наявності міцного вираженого зв'язку між різними алельними варіантами окремих генів та показниками продуктивності; феномену зчеплення генів; безпосередньо дрейфу генів, результативність якого суттєво збільшується

у малочисельних популяціях. Цей момент, варіативність генетичної структури за локусами кількісних ознак, активно підтримується на відповідному рівні саме за рахунок використання виключно фенотипових методів оцінки особин.

У свою чергу, використання методичних підходів маркер-асоційованої селекції (MAS), генно-асоційованої селекції (GAS) та методології пірамід генів (Gene Pyramiding) надає можливості для спрямованої племінної роботи у руслі створення популяцій, що характеризуються сукупністю «бажаних» генотипів, пов'язаних з проявом будь-яких кількісних ознак (показників молочної продуктивності, адаптаційних якостей та інше). За використання всього інструментарію маркер-асоційованої селекції можливо досягнути максимального індивідуального контролю та абсолютної точності генотипування на основі прямого аналізу спадкового матеріалу. Таким чином, у даному випадку, ефектом стохастичних змін частот алелів у генераціях можливо знехтувати. Однак, в умовах країн, що розвиваються, та господарств, що, з тих чи інших причин, не проводять племінну роботу на основі MAS, фактор випадкового розподілу частот алелів обраних локусів має місце бути, що ми й спостерігаємо за результатами проведених досліджень.

Результати досліджень розділу опубліковано в роботах [215–217].

Висновки до розділу 3.3

1. За результатами проведених досліджень з'ясовано, що різні популяції корів української чорно-рябої молочної породи характеризуються превалюванням «домінуючих» алелей за локусами *PRL*, *LEP* та *TNF- α* , проте вираженими відмінностями у значеннях частот генотипів та загальних параметрів генетичної мінливості.

2. Варіювання показників генетичної мінливості (H_e) залежить від маркера, який використовується, – у випадку з SSCP значення цього показника суттєво вище, ніж його ж за використання PCR-RFLP.

3. В умовах відсутності використання спрямованого добору за генотипом (MAS, геномна селекція) популяції відрізняються одна від одної за окремими локусами внаслідок відмінностей у вихідному племінному матеріалі, а також можливого впливу таких мікроеволюційних факторів, як добір та дрейф генів.

4. Отримані результати вказують на необхідність індивідуального аналізу параметрів генетичної структури у випадку з окремими популяціями однієї породи корів (на прикладі української чорно-рябої молочної породи).

3.4. Аналіз зв'язку виявлених алельних варіантів поліморфних локусів з показниками молочної продуктивності корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід

Поряд з результатами з питань популяційної біології, важливе значення набуває наступний етап досліджень – аналіз продуктивних якостей особин великої рогатої худоби різних порід з різними генотипами за виявленими поліморфними маркерами. Визначення зв'язку різних алельних варіантів з показниками продуктивності є важливим питанням у контексті маркер-асоційованої селекції тварин, так як дає змогу безпосередньо використовувати виявлені особливості генетичної структури дослідних популяцій для вирішення проблем селекційної роботи та відкриває прямий шлях до можливості максимальної реалізації продуктивного потенціалу тварин.

За результатами проведених дисертаційних досліджень для визначення параметрів продуктивності особин обрано наступні поліморфні локуси – *PRL*, *GHR*, *LEP*, *MYF5* та *TNF- α* . У кожному окремому випадку аналізували показники молочної продуктивності лише в разі наявності необхідної для статистичного аналізу кількості особин із різними генотипами за кожним поліморфним локусом.

У таблиці 3.14 наведено дані стосовно загальних середніх значень дослідних показників у популяції корів української чорно-рябої молочної породи без розділення на групи за генотипами.

Таблиця 3.14

**Середні значення показників молочної продуктивності корів породи
українська чорно-ряба**

Показник					
Надій, 305 днів, кг	C_v , %	Жир, 305 днів, %	C_v , %	Білок, 305 днів, %	C_v , %
Перша лактація					
5851,9±98,42	10,09	3,75±0,018	2,85	3,43±0,009	1,66
Друга лактація					
6730,7±100,99	9,00	3,63±0,017	2,86	3,36±0,011	1,99
Третя лактація					
7619,3±120,20	9,47	3,58±0,018	3,04	3,30±0,009	1,76

До загальної групи відбирали клінічно здорових тварин (селекційне ядро), що демонстрували стабільні показники протягом перших трьох лактацій. Особин, що проявляли ознаки клінічних захворювань (мастит та інші) виключали з групи з метою мінімізації впливу додаткових факторів, які, так чи інакше, можуть впливати на прояв ознаки.

За результатами аналізу встановлено, що збільшення кількостей лактацій (продуктивного віку) корелює зі збільшенням параметрів надою за 305 днів та зі зменшенням вмісту жиру в молоці корів, що повністю відповідає картині «нормальної» лактаційної активності тварин.

Дані стосовно загальних середніх значень дослідних показників у популяції корів української червоно-рябої породи без розділення на групи за генотипами наведено у таблиці 3.15.

Таблиця 3.15

**Середні значення показників молочної продуктивності корів породи
українська червоно-ряба**

Показник					
Надій, 305 днів, кг	C_v , %	Жир, 305 днів, %	C_v , %	Білок, 305 днів, %	C_v , %
Перша лактація					
5249,0±129,45	15,59	3,86±0,014	2,38	3,31±0,017	3,31
Друга лактація					
6046,9±128,17	13,41	3,76±0,012	2,07	3,25±0,018	3,51
Третя лактація					
6671,4±110,99	10,52	3,69±0,011	1,82	3,17±0,019	3,88

Як і у вищенаведеному випадку, для аналізу продуктивних якостей корів української червоно-рябої породи відбирали клінічно здорових тварин (селекційне ядро), що демонстрували стабільні показники протягом перших трьох лактацій. Особин, що проявляли ознаки клінічних захворювань, виключали з групи (проводили постійний ветеринарний моніторинг стану тварин).

У подальшому генотипували обраних тварин і визначали їх продуктивні якості. У кожній групі за окремими генотипами за виявленими поліморфними локусами проводили перевірку на нормальність розподілу даних за використання тесту Шапіро-Уїлка. У випадку, якщо розподіл відповідає нормальному аналізували показники із використанням однофакторного дисперсійного аналізу, а також за критерієм Тьюки-Крамеру. У випадку, якщо розподіл вірогідно відрізнявся від нормального, використовували непараметричний U-критерій Манна-Уїтні.

3.4.1. Продуктивні якості корів молочних порід за різними генотипами локусу пролактину

За результатами індивідуальних типувальних дослідних особин тварин дослідних популяцій за локусом пролактину визначено параметри продуктивності за кожним з наявних генотипів – СС, СТ та ТТ. Значення параметрів продуктивності особин за дослідними показниками наведено у таблиці 3.16.

Таблиця 3.16

Показники молочної продуктивності корів породи українська чорно-ряба з різними генотипами за локусом пролактину

Показник	Генотип		
	СС	СТ	ТТ
Перша лактація			
Надій, 305 днів, кг	6072,8±115,95 ^a	5778,1±159,80 ^a	5116±163,99 ^b
C_v , %	8,10	10,35	6,41
Жир, 305 днів, %	3,75±0,022 ^a	3,74±0,034 ^a	3,81±0,047 ^a
C_v , %	2,48	3,42	2,47
Білок, 305 днів, %	3,44±0,015 ^a	3,43±0,016 ^a	3,43±0,006 ^a
C_v , %	1,80	1,72	0,36
Друга лактація			
Надій, 305 днів, кг	6903,1±146,07 ^a	6700,8±130,27 ^a	6059,8±271,39 ^b
C_v , %	8,98	7,27	8,96
Жир, 305 днів, %	3,65±0,020 ^a	3,59±0,026 ^a	3,69±0,086 ^a
C_v , %	2,33	2,73	4,69
Білок, 305 днів, %	3,35±0,014 ^a	3,37±0,018 ^a	3,31±0,039 ^a
C_v , %	1,82	2,05	2,36
Третя лактація			
Надій, 305 днів, кг	7660,6±182,74 ^a	7763,1±176,95 ^a	6930,3±75,55 ^a
C_v , %	10,12	8,53	2,18
Жир, 305 днів, %	3,59±0,026 ^a	3,53±0,022 ^a	3,67±0,074 ^a
C_v , %	3,01	2,32	4,01
Білок, 305 днів, %	3,31±0,012 ^a	3,30±0,018 ^a	3,31±0,033 ^a
C_v , %	1,54	2,06	1,99

Примітка: різні індекси (^a, ^b) вказують на вірогідність різниці ($p < 0,05$)

За результатами проведених досліджень встановлено, що для особин з генотипом СС характерним є підвищення значення надоїв за 305 днів лактації у порівнянні з особинами із генотипом ТТ. Вірогідні відмінності у значенні надоїв встановлено для перших двох лактацій. Значення параметру надоїв за 305 днів лактації для гетерозиготних особин наближено до значень гомозигот за алелем С, таким чином, що для перших двох лактацій різниця між гетерозиготними особинами та гомозиготами ТТ є вірогідною. Для третьої лактації вірогідних відмінностей не встановлено, але тенденція до більших значень показнику надою для особин із генотипами СС та СТ залишається. У даному випадку, відсутність статистично значущої різниці між особинами з різними генотипами може бути викликана невеликою кількістю тварин із генотипом ТТ ($n = 4$), що призвело до збільшення значення стандартної похибки середньої величини та, що цілком можливо, до відсутності вірогідної різниці.

Слід відмітити, що за параметрами концентрацій жиру та білка в молоці корів вірогідних відмінностей між тваринами української чорно-рябої породи не виявлено.

Для встановлення значення сили впливу фактору (генотипу) на параметри молочної продуктивності провели однофакторний дисперсійний аналіз, в першу чергу для показників, за якими встановлено вірогідні відмінності між особинами з різними генотипами. Для дослідного локусу вплив генотипу становив від 26% для першої лактації, до 18% для другої від загальної варіативності ознаки, що, у свою чергу, свідчить про достатньо виражений зв'язок фактору з показником.

Дещо іншу картину встановлено за результатами досліджень з аналізу продуктивних якостей корів з різними генотипами породи українська червоно-ряба молочна.

За результатами проведених досліджень також встановлено вплив алельних варіантів гену пролактину на показник надою, але, на відміну від корів української чорно-рябої породи, зв'язок з підвищеним показником молочної продуктивності продемонстровано для протилежного генотипу (табл. 3.17).

Таблиця 3.17

**Показники молочної продуктивності корів породи українська
червоно-ряба з різними генотипами за локусом пролактину**

Показник	Генотип		
	СС	СТ	ТТ
Перша лактація			
Надій, 305 днів, кг	5040,2±181,99 ^a	4938,0±177,97 ^b	5724,5±245,80 ^b
C_v , %	13,51	12,48	16,07
Жир, 305 днів, %	3,84±0,026 ^a	3,89±0,019 ^a	3,85±0,027 ^a
C_v , %	2,53	1,75	2,61
Білок, 305 днів, %	3,36±0,038 ^a	3,30±0,024 ^a	3,29±0,023 ^a
C_v , %	4,20	2,58	2,67
Друга лактація			
Надій, 305 днів, кг	5831,6±186,24 ^a	5896,5±152,72 ^a	6391,3±273,89 ^a
C_v , %	11,95	8,97	16,03
Жир, 305 днів, %	3,76±0,017 ^a	3,78±0,019 ^a	3,75±0,026 ^a
C_v , %	1,73	1,75	2,61
Білок, 305 днів, %	3,30±0,043 ^a	3,24±0,025 ^a	3,22±0,014 ^a
C_v , %	4,85	2,65	1,65
Третя лактація			
Надій, 305 днів, кг	6505,9±179,98 ^a	6473,2±132,33 ^a	7006,9±217,12 ^a
C_v , %	10,35	70,08	11,59
Жир, 305 днів, %	3,70±0,017 ^a	3,70±0,015 ^a	3,68±0,022 ^a
C_v , %	1,73	1,35	2,26
Білок, 305 днів, %	3,23±0,042 ^a	3,15±0,032 ^a	3,12±0,019 ^a
C_v , %	4,64	3,46	2,24

У цілому за 305 днів першої лактації тварини з генотипом ТТ мали кращі показники за надоем порівняно з особинами з генотипом СС ($p < 0,05$). Для гетерозиготних особин зафіксовано найнижче значення показнику надою. У другу та третю лактацію вірогідної різниці між показниками не виявлено, але тенденція до превалювання показників надою у тварин із генотипом ТТ підтверджується, причому різниця між показниками досягає майже 500 кг на другу лактацію та 330 кг на третю. Продуктивність гетерозиготних особин дещо перевищує показник надою для гомозигот за алелем С та на третю лактацію демонструє найнижче значення у дослідній популяції.

За значеннями показників вмісту жиру та білка в молоці дослідна популяція тварин не відрізняється від популяції корів чорно-рябої породи – вірогідних відмінностей між показниками особин з різними генотипами не виявлено. При цьому, розподіл значень для вмісту білка в молоці корів для всіх трьох лактацій не мав характеру нормального розподілу згідно критерію Шапіро-Уїлка, що призвело до необхідності використання непараметричного методу Мана-Уїтні для аналізу вірогідності різниці між показниками особин з різними генотипами.

Значення сили впливу фактору (генотипу) для першої лактації за показником надою досягає майже 20 відсотків (18,9%), що підкреслює перспективність використання локусу пролактину за цим поліморфізмом у селекційних програмах (маркер-асоційована селекція) української червоно-рябої породи корів.

3.4.2. Продуктивні якості корів молочних порід за різними генотипами локусу рецептору гормону росту

Особливості розподілу частот генотипів у дослідних популяціях тварин за локусом рецептору гормону росту дали змогу проаналізувати продуктивні якості тварин з різними генотипами ($AluI^{+}/AluI^{+}$, $AluI^{+}/AluI^{-}$ та $AluI^{-}/AluI^{-}$) для обох дослідних популяцій тварин.

За результатами досліджень встановлено, що для корів породи українська чорно-ряба є характерною вірогідна різниця за показником вмісту жиру в молоці для тварин із різними генотипами за локусом рецептору гормону росту (табл. 3.18).

За цим показником встановлено максимальне значення для гомозиготних за алелем $AluI^{+}$ тварин у порівнянні з тваринами з іншими генотипами. Слід відмітити, що зафіксовані параметри (більш високі значення вмісту жиру) спостерігаються протягом всіх трьох лактацій.

Таблиця 3.18

Показники молочної продуктивності корів породи українська чорно-ряба з різними генотипами за локусом рецептору гормону росту

Показник	Генотип		
	AluI+/AluI+	AluI+/AluI-	AluI-/AluI-
Перша лактація			
Надій, 305 днів, кг	5585,1±224,37 ^a	5900,3±145,92 ^a	5999,6±152,30 ^a
C _v , %	12,05	9,89	8,42
Жир, 305 днів, %	3,89±0,015 ^a	3,75±0,014 ^b	3,65±0,022 ^c
C _v , %	1,14	1,55	1,95
Білок, 305 днів, %	3,43±0,012 ^a	3,44±0,014 ^a	3,43±0,023 ^a
C _v , %	1,08	1,60	2,19
Друга лактація			
Надій, 305 днів, кг	6570,8±219,77 ^a	6801,8±162,30 ^a	6758,3±157,58 ^a
C _v , %	10,03	9,54	7,73
Жир, 305 днів, %	3,72±0,039 ^a	3,63±0,019 ^{ab}	3,57±0,025 ^b
C _v , %	3,15	2,12	2,35
Білок, 305 днів, %	3,32±0,023 ^a	3,36±0,016 ^a	3,37±0,021 ^a
C _v , %	2,07	1,91	1,99
Третя лактація			
Надій, 305 днів, кг	7751,3±260,78 ^a	7749,5±186,30 ^a	7322,0±180,35 ^a
C _v , %	10,09	9,62	8,17
Жир, 305 днів, %	3,64±0,038 ^a	3,59±0,024 ^{ab}	3,51±0,028 ^b
C _v , %	3,13	2,70	2,65
Білок, 305 днів, %	3,30±0,018 ^a	3,30±0,016 ^a	3,30±0,017 ^a
C _v , %	1,67	1,94	1,67

Найменші значення вмісту жиру є характерними для особин, гомозиготних за алелем AluI- (AluI-/AluI-). Гетерозиготні особини (AluI+/AluI-) займають проміжне положення протягом всіх лактацій, але за першою лактацією різниця за вмістом жиру в молоці є вірогідною між всіма дослідними групами тварин ($p < 0,05$).

За значеннями параметрів надоїв за 305 днів лактації та концентрацією білка в молоці корів дослідних груп вірогідних відмінностей між показниками тварин із різними генотипами не виявлено.

Аналіз сили впливу фактору (генотипу) на параметри вмісту жиру в молоці (що демонструють вірогідні відмінності між особинами з різними генотипами) показав, що значення сили впливу варіювало від 70% на першу лактацію до 28% на другу, та 22% на третю. Таким чином, згідно отриманих даних, значення факторіальної дисперсії досить значні (особливо на першу лактацію), що й призводить до виявлених значень сили впливу генотипу (генетичної складової) на ознаку.

За результатами досліджень проаналізували продуктивні якості тварин української червоно-рябої молочної породи з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами.

Також слід відмітити, що за результатами проведених досліджень встановлено вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками особин з гомозиготним за алелем *AluI*⁺ генотипом та середніми значеннями у загальній популяції за показником вмісту жиру в молоці на першу та другу лактацію. На першу лактацію різниця між значеннями показників досягала 3,6%; на другу – 2,5%.

На відміну від корів чорно-рябої молочної породи для особин червоно-рябої породи суттєвої різниці за кожним з показників продуктивності тварин не встановлено.

Порівняльним аналізом молочної продуктивності корів різних генотипів за геном рецептору гормону росту показано, що значення надою за 305 днів для перших трьох лактацій групи корів з гетерозиготним генотипом превалює над гомозиготними (відмінності не вірогідні). За другими показниками значення параметрів майже співпадають.

Показники молочної продуктивності корів дослідної породи за різними генотипами наведено у таблиці 3.19.

Таблиця 3.19

**Показники молочної продуктивності корів породи українська
червоно-ряба з різними генотипами за локусом рецептору гормону росту**

Показник	Генотип		
	AluI+/AluI+	AluI+/AluI-	AluI-/AluI-
Перша лактація			
Надій, 305 днів, кг	5240,0±243,11 ^a	5397,6±191,63 ^a	4911,4±232,99 ^a
<i>C_v</i> , %	14,67	16,27	14,23
Жир, 305 днів, %	3,86±0,039 ^a	3,86±0,019 ^a	3,88±0,022 ^a
<i>C_v</i> , %	3,24	2,20	1,72
Білок, 305 днів, %	3,30±0,023 ^a	3,32±0,029 ^a	3,34±0,028 ^a
<i>C_v</i> , %	2,24	3,92	2,51
Друга лактація			
Надій, 305 днів, кг	6090,0±225,84 ^a	6157,6±188,52 ^a	5741,0±263,28 ^a
<i>C_v</i> , %	11,73	14,03	13,76
Жир, 305 днів, %	3,75±0,034 ^a	3,77±0,016 ^a	3,76±0,015 ^a
<i>C_v</i> , %	2,85	1,96	1,22
Білок, 305 днів, %	3,19±0,025 ^a	3,28±0,027 ^a	3,27±0,035 ^a
<i>C_v</i> , %	2,45	3,85	3,15
Третя лактація			
Надій, 305 днів, кг	6678,2±186,32 ^a	6802,9±172,65 ^a	6357,0±179,55 ^a
<i>C_v</i> , %	8,82	11,63	8,47
Жир, 305 днів, %	3,68±0,022 ^a	3,70±0,015 ^a	3,69±0,021 ^a
<i>C_v</i> , %	1,80	1,86	1,68
Білок, 305 днів, %	3,12±0,027 ^a	3,19±0,030 ^a	3,18±0,041 ^a
<i>C_v</i> , %	2,69	4,23	4,10

Слід відмітити, що за деякими параметрами молочної продуктивності у дослідних групах тварин відмічено відхилення від нормального характеру розподілу, що призвело до необхідності використання непараметричного критерію для проведення аналізу.

3.4.3. Продуктивні якості корів молочних порід за різними генотипами локусу лептину

За локусом лептину особливості розподілу генотипів у дослідних

популяціях тварин дали змогу проаналізувати параметри молочної продуктивності корів зі всіма можливими генотипами – СС, СТ та ТТ.

За результатами проведених досліджень встановлено, що тварини з генотипом СС у порівнянні з гетерозиготами СТ та гомозиготами ТТ, мали вірогідно більші значення надою за 305 днів лактації (перша лактація) (табл. 3.20).

Таблиця 3.20

Показники молочної продуктивності корів породи українська чорно-ряба з різними генотипами за локусом лептину

Показник	Генотип		
	СС	СТ	ТТ
Перша лактація			
Надій, 305 днів, кг	6209,5±100,39 ^a	5578,9±108,67 ^b	5021,6±111,95 ^c
C_v , %	7,23	6,46	4,98
Жир, 305 днів, %	3,71±0,024 ^a	3,78±0,026 ^{ab}	3,84±0,042 ^b
C_v , %	2,83	2,28	2,41
Білок, 305 днів, %	3,43±0,014 ^a	3,44±0,019 ^a	3,42±0,011 ^a
C_v , %	1,78	1,79	0,70
Друга лактація			
Надій, 305 днів, кг	6917,1±152,54 ^a	6526,1±151,34 ^a	6592,0±211,10 ^a
C_v , %	9,36	8,36	7,16
Жир, 305 днів, %	3,61±0,023 ^a	3,68±0,026 ^a	3,62±0,059 ^a
C_v , %	2,69	2,5	3,87
Білок, 305 днів, %	3,36±0,013 ^a	3,36±0,024 ^a	3,34±0,026 ^a
C_v , %	1,61	2,62	1,74
Третя лактація			
Надій, 305 днів, кг	7606,0±158,61 ^a	7629,0±213,42 ^a	7642,2±411,95 ^a
C_v , %	8,85	10,09	12,05
Жир, 305 днів, %	3,55±0,027 ^a	3,62±0,028 ^a	3,58±0,046 ^a
C_v , %	3,19	2,82	2,99
Білок, 305 днів, %	3,30±0,014 ^a	3,31±0,017 ^a	3,30±0,021 ^a
C_v , %	1,83	1,87	1,43

Для другої лактації тенденція превалювання показнику надою для особин з генотипом СС зберігалась, але значення були не вірогідними. Для третьої

лактації значення надоїв для тварин всіх трьох груп практично не відрізнялися (у межах долі відсотку).

Для першої лактації параметри надою гетерозиготних особин вірогідно відрізнялися від двох інших груп тварин (гомозиготних за С та Т алелями).

Також встановлено вірогідну різницю за показником вмісту жиру в молоці між дослідними групами тварин. Для тварин з генотипом ТТ є характерним превалювання значень цього показнику, у той час як тварини з генотипом СС демонструють найнижчі значення. Гетерозиготи займають проміжне значення. На другу та третю лактацію вірогідних відмінностей за вмістом жиру в молоці не виявлено, різниця у значеннях показників знаходиться у межах статистичної похибки.

За показником вмісту білка в молоці вірогідної різниці між групами тварин не виявлено.

Рівень факторіальної дисперсії за дослідним локусом у випадку зі значенням надою за першу лактацію (наявності вірогідних відмінностей) є досить високим, про що свідчить значення параметру сили впливу фактору (генотипу) на загальну мінливість ознаки ($\eta^2 = 55\%$). Велике значення параметру сили впливу фактору додатково робить дослідний локус (мутація А59V у локусі лептину) перспективним для вирішення завдань маркер-асоційованій селекції у тваринництві.

Також встановлено вірогідні відмінності між значеннями показнику надою за 305 днів між особинами з генотипом СС та середнім значенням в загальній популяції тварин. Різниця за цим показником на першу лактацію склала 5,8 % (у межах 357,6 кг.).

На відміну від чорно-рябої молочної породи у популяції корів червоно-рябої молочної породи виявлено дещо інші закономірності.

Як і в першому випадку (чорно-ряба молочна порода), для особин із генотипом СС є характерними переважаючі значення показнику надою за 305 днів лактації. Різниця за цим показником складає 19,7% (у межах 1139,4 кг.) на першу лактацію, 16,7% (у межах 1087,1 кг) на другу лактацію та 13,5% (у межах

953,8 кг) на третю. Також встановлено вірогідні відмінності в значеннях показників гомозиготних за алелем С особин та гетерозигот. Вірогідних відмінностей між показниками гетерозиготних СТ та гомозиготних за алелем Т особин не виявлено (табл. 3.21).

Таблиця 3.21

Показники молочної продуктивності корів породи українська червоно-ряба з різними генотипами за локусом лептину

Показник	Генотип		
	СС	СТ	ТТ
Перша лактація			
Надій, 305 днів, кг	5744,2±164,75 ^a	4933,6±174,37 ^b	4604,8±260,98 ^b
C_v , %	12,17	14,14	13,88
Жир, 305 днів, %	3,82±0,020 ^a	3,91±0,021 ^b	3,86±0,038 ^{ab}
C_v , %	2,20	2,12	2,38
Білок, 305 днів, %	3,32±0,019 ^a	3,29±0,022 ^a	3,40±0,079 ^a
C_v , %	2,51	2,71	5,60
Друга лактація			
Надій, 305 днів, кг	6478,9±183,34 ^a	5806,6±158,72 ^b	5391,8±284,98 ^b
C_v , %	12,01	10,93	12,95
Жир, 305 днів, %	3,72±0,017 ^a	3,80±0,018 ^b	3,78±0,025 ^{ab}
C_v , %	1,96	1,97	1,59
Білок, 305 днів, %	3,24±0,024 ^a	3,24±0,022 ^a	3,31±0,081 ^a
C_v , %	3,09	2,72	5,74
Третя лактація			
Надій, 305 днів, кг	7074,8±164,99 ^a	6424,1±131,09 ^b	6121,0±186,03 ^b
C_v , %	9,89	8,16	7,44
Жир, 305 днів, %	3,66±0,017 ^a	3,72±0,013 ^b	3,72±0,023 ^{ab}
C_v , %	1,94	1,37	1,53
Білок, 305 днів, %	3,14±0,021 ^a	3,16±0,028 ^a	3,26±0,082 ^a
C_v , %	2,83	3,48	6,20

У свою чергу, за показником вмісту жиру в молоці також встановлені вірогідні відмінності між показниками особин з різними генотипами – для особин із генотипом СС є характерними менші значення цього показнику в порівнянні з тваринами з іншими генотипами (СТ та ТТ). Закономірності, що

спостерігаються за співвідношенням показників надою за 305 днів лактації та вмістом жиру в молоці корів (більші значення надоїв корелюють з меншими значеннями вмісту молочного жиру), повністю відповідають загальним тенденціям та є відображенням особливостей фізіологічного функціонування організму тварин.

За значенням показників вмісту білка в молоці корів вірогідних відмінностей між дослідними групами тварин з різними генотипами не виявлено.

За аналізом співвідношення факторіальної дисперсії до загальної встановлено, що за показником середнього надою сила впливу фактору (генотипу) досягала 32,4% на першу, 26,7% на другу та 29,8% на третю лактацію. У свою чергу за показником вмісту молочного жиру сила впливу фактору (генотипу) досягала 19,0% на першу, 20,3% на другу та 19,1% на третю лактацію, що свідчить про досить виражений вплив генотипу на варіативність досліджуваної ознаки.

Слід зазначити, що за показником середнього надою встановлено вірогідні відмінності між особинами з генотипом СС та середнім значенням цього параметру в загальній популяції тварин на першу та третю лактацію ($p < 0,05$). За показником вмісту жиру в молоці вірогідної різниці між кожною з дослідних груп та середнім значенням у загальній популяції не виявлено.

3.4.4. Продуктивні якості корів молочних порід за різними генотипами локусу міогенного фактору 5

За локусом міогенного фактору 5 також проаналізовано параметри продуктивності тварин зі всіма можливими генотипами – TaqI+/TaqI+, TaqI+/TaqI- та TaqI-/TaqI- (аналіз різних груп тварин можливий за умови особливостей розподілу частот генотипів у дослідних популяціях).

Для популяції корів української чорно-рябої молочної породи встановлені значення показників продуктивності для кожної з дослідних груп (табл. 3.22).

За результатами досліджень з аналізу молочної продуктивності також відмічено більші значення надоїв молока за 305 днів лактації для корів з генотипом TaqI+/TaqI+ та TaqI+/TaqI- для перших двох лактацій.

Таблиця 3.22

Показники молочної продуктивності корів породи українська чорно-ряба з різними генотипами за локусом міогенного фактору 5

Показник	Генотип		
	TaqI+/TaqI+	TaqI+/TaqI-	TaqI-/TaqI-
Перша лактація			
Надій, 305 днів, кг	5786,5±121,75 ^a	6250,9±132,43 ^b	5198,7±138,72 ^c
C _v , %	8,15	7,93	6,54
Жир, 305 днів, %	3,75±0,029 ^a	3,75±0,030 ^a	3,74±0,036 ^a
C _v , %	3,01	2,93	2,38
Білок, 305 днів, %	3,43±0,014 ^a	3,44±0,017 ^a	3,43±0,023 ^a
C _v , %	1,57	1,83	16,62
Друга лактація			
Надій, 305 днів, кг	6645,9±118,49 ^{ab}	7097,9±150,64 ^b	6100,2±179,06 ^a
C _v , %	7,13	7,94	7,19
Жир, 305 днів, %	3,67±0,024 ^a	3,61±0,029 ^a	3,60±0,044 ^a
C _v , %	2,64	2,96	2,94
Білок, 305 днів, %	3,36±0,017 ^a	3,35±0,014 ^a	3,34±0,041 ^a
C _v , %	1,99	1,58	3,02
Третя лактація			
Надій, 305 днів, кг	7517,8±185,58 ^a	7883,6±167,31 ^a	7273,3±315,32 ^a
C _v , %	9,87	7,94	10,62
Жир, 305 днів, %	3,59±0,028 ^a	3,56±0,029 ^a	3,57±0,046 ^a
C _v , %	3,15	3,06	3,19
Білок, 305 днів, %	3,32±0,012 ^a	3,29±0,019 ^a	3,29±0,022 ^a
C _v , %	1,40	2,16	1,61

На відміну від інших проаналізованих локусів у випадку з *MYF5* найбільші значення надоїв зафіксовано саме для особин з гетерозиготними генотипами (TaqI+/TaqI-). При чому, для першої лактації встановлено вірогідні відмінності за показниками надоїв між всіма дослідними групами тварин – гомозиготними особинами за алелями TaqI+ та TaqI-, а також гетерозиготами. На другу лактацію вірогідні відмінності між гетерозиготними особинами та гомозиготами за алелем

TaqI⁺ відсутні, але тенденція до максимальних значень молочної продуктивності (надою за 305 днів лактації) зберігається. Різниця між значенням надою на другу лактацію між гетерозиготами та гомозиготами за алелем TaqI⁻ досягає майже однієї тисячі кілограм, що свідчить про перспективність проведення подальших досліджень продуктивних якостей корів різних порід з різними генотипами за локусом *MYF5*.

Слід відмітити, що, як і у вищенаведених випадках з іншими локусами, відсутність вірогідних відмінностей між дослідними параметрами тварин з різними генотипами на тлі виявленої тенденції до превалювання значень показників корів із гетерозиготним генотипом, може бути викликано низькою чисельністю особин певного типу, що й призводить до великого значення стандартної похибки середньої арифметичної для гомозиготних за алелем TaqI⁻ особин.

За результатами однофакторного дисперсійного аналізу встановлено рівень факторіальної дисперсії для параметрів надою тварин. З'ясовано, що сила впливу фактору (генотипу) на мінливість молочної продуктивності (надій за 305 днів лактації) для першої лактації становить 41%, для другої – 34%, що також є додатковим фактором, що підкреслює важливість проведення подальших досліджень з можливості використання поліморфних варіантів локусу міогеного фактору в програмах маркер-асоційованої селекції.

За параметрами вмісту жиру та білка в молоці корів вірогідних відмінностей за показниками тварин з різними генотипами не виявлено.

Також за параметром надою за 305 днів встановлені вірогідні відмінності між значеннями цього показнику для гетерозиготних особин та середнім значенням у загальній популяції ($p < 0,05$) на першу лактацію. Різниця досягала майже 6,4% (у межах 400 кг).

У свою чергу, для популяції корів української червоно-рябої молочної породи спостерігаються декілька інші закономірності, які, при цьому, не є досить вираженими.

За всіма дослідними параметрами молочної продуктивності корів між середніми значеннями кожної з груп тварин із різними генотипами вірогідних відмінностей між показниками не виявлено (табл. 3.23).

Таблиця 3.23

Показники молочної продуктивності корів породи українська червоно-ряба з різними генотипами за локусом міогенного фактору 5

Показник	Генотип		
	TaqI+/TaqI+	TaqI+/TaqI-	TaqI-/TaqI-
Перша лактація			
Надій, 305 днів, кг	5106,1±251,87 ^a	5261,8±154,23 ^a	5502,2±523,64 ^a
C _v , %	16,36	14,36	21,28
Жир, 305 днів, %	3,86±0,032 ^a	3,86±0,017 ^a	3,86±0,051 ^a
C _v , %	2,72	2,18	2,95
Білок, 305 днів, %	3,31±0,023 ^a	3,32±0,026 ^a	3,34±0,043 ^a
C _v , %	2,30	3,83	2,87
Друга лактація			
Надій, 305 днів, кг	5813,8±236,70 ^a	6096,4±159,20 ^a	6322,6±470,93 ^a
C _v , %	13,50	12,79	16,66
Жир, 305 днів, %	3,76±0,024 ^a	3,76±0,016 ^a	3,77±0,043 ^a
C _v , %	2,07	2,05	2,55
Білок, 305 днів, %	3,26±0,032 ^a	3,26±0,025 ^a	3,23±0,038 ^a
C _v , %	3,28	3,83	2,66
Третя лактація			
Надій, 305 днів, кг	6432,7±148,72 ^a	6671,6±141,59 ^a	7195,8±431,09 ^a
C _v , %	7,66	10,40	13,40
Жир, 305 днів, %	3,69±0,023 ^a	3,69±0,013 ^a	3,70±0,028 ^a
C _v , %	2,10	1,76	1,68
Білок, 305 днів, %	3,19±0,040 ^a	3,17±0,024 ^a	3,13±0,062 ^a
C _v , %	4,14	3,80	4,44

За параметром надою для особин з генотипом TaqI-/TaqI- відмічено превалювання значень у порівнянні з тваринами інших генотипів. Виявлена тенденція продовжується включно до третьої лактації. Однак, незважаючи на виявлену тенденцію встановлені відмінності не є вірогідними, що, можливо, викликано значним розмахом варіації (коефіцієнт варіації досягає майже 22%)

внаслідок особливостей розподілу генотипів у популяції. Для аналізу продуктивних якостей тварин використовували лише шість особин, що, вірогідно, й вплинуло на результати розподілу значень показника. Продуктивні параметри особин з гетерозиготним генотипом займали проміжне положення (табл. 3.23).

3.4.5. Продуктивні якості корів молочних порід за різними генотипами гену фактору некрозу пухлини- α

Локус фактору некрозу пухлини- α суттєво відрізняється від об'єктів, які розглянули раніше. У першу чергу це пов'язано з кількістю алелів на локус – на відміну від розглянутих PCR-RFLP маркерів, *TNF- α* , дослідні поліморфні варіанти якого відносяться до SSCP-маркерів, має три алеля у популяції корів української чорно-рябої молочної породи та шість – у червоно-рябої. Додатково до всього, розподіл частот генотипів та алелей в обох дослідних популяціях не є рівномірним (підрозділ 3.2.6.). Все це призвело до неможливості проаналізувати продуктивні якості особин зі всіма можливими генотипами та, в решті решт, до картини, яка спостерігається.

У популяції корів української чорно-рябої молочної породи проаналізовано особин трьох генотипів з шести можливих – проводили порівняльний аналіз тварин з генотипами AA, AB та AF.

За результатами проведених досліджень встановлено, що починаючи з першої лактації гетерозиготні особини з генотипом AF мали деяку перевагу над особинами з іншими генотипами за показником надою. Незважаючи на це, до третьої лактації значення показника надою між групами тварин з різними генотипами значно вирівнялись. У той же час, особини, що є гомозиготними за алелем A, демонструють більші значення показнику вмісту жиру в молоці, причому цю тенденцію зафіксовано протягом всіх трьох лактацій. Незважаючи на це вірогідних відмінностей у значеннях показнику для кожної з дослідних груп не виявлено.

Показники молочної продуктивності тварин чорно-рябої породи наведено у таблиці 3.24.

Таблиця 3.24

Показники молочної продуктивності корів породи українська чорно-ряба з різними генотипами за локусом фактору некрозу пухлини- α

Показник	Генотип		
	AA	AB	AF
Перша лактація			
Надій, 305 днів, кг	5617,4 \pm 259,98 ^a	5866,1 \pm 113,59 ^a	6009,9 \pm 170,38 ^a
C_v , %	13,88	7,50	9,82
Жир, 305 днів, %	3,82 \pm 0,022 ^a	3,74 \pm 0,021 ^a	3,72 \pm 0,040 ^a
C_v , %	1,75	2,19	3,74
Білок, 305 днів, %	3,41 \pm 0,014 ^a	3,46 \pm 0,011 ^a	3,41 \pm 0,019 ^a
C_v , %	1,20	1,24	1,90
Друга лактація			
Надій, 305 днів, кг	6793,2 \pm 295,60 ^a	6577,5 \pm 133,35 ^a	6875,3 \pm 128,70 ^a
C_v , %	13,05	7,85	6,48
Жир, 305 днів, %	3,70 \pm 0,025 ^a	3,61 \pm 0,025 ^a	3,62 \pm 0,033 ^a
C_v , %	2,00	2,69	3,18
Білок, 305 днів, %	3,33 \pm 0,027 ^a	3,38 \pm 0,017 ^a	3,35 \pm 0,015 ^a
C_v , %	2,43	1,95	1,58
Третя лактація			
Надій, 305 днів, кг	7655,6 \pm 283,50 ^a	7656,4 \pm 187,15 ^a	7545,8 \pm 193,95 ^a
C_v , %	11,11	9,47	8,90
Жир, 305 днів, %	3,65 \pm 0,024 ^a	3,54 \pm 0,025 ^a	3,57 \pm 0,036 ^a
C_v , %	1,95	2,71	3,64
Білок, 305 днів, %	3,29 \pm 0,016 ^a	3,32 \pm 0,014 ^a	3,29 \pm 0,019 ^a
C_v , %	1,39	1,66	2,07

За вмістом білка в молоці корів також вірогідних відмінностей у показниках особин з різними генотипами не зафіксовано.

У свою чергу, завдяки особливостям розподілу генотипів у популяціях тварин, для української червоно-рябої породи також виявилося можливим проаналізувати продуктивні якості особин з трьома можливими генотипами із 21 теоретично можливого. У випадку, якщо чисельність особин з певним генотипом була меншою ніж 3, – тварини не аналізувалися.

Показники молочної продуктивності корів породи українська червоно-ряба з різними генотипами за дослідним маркером наведено у таблиці 3.25.

Таблиця 3.25

Показники молочної продуктивності корів породи українська червоно-ряба з різними генотипами за локусом фактору некрозу пухлини- α

Показник	Генотип		
	АС	AD	AF
Перша лактація			
Надій, 305 днів, кг	5324,7 \pm 359,6 ^a	5305,3 \pm 179,35 ^a	5176,1 \pm 244,46 ^a
C_v , %	21,36	10,69	15,66
Жир, 305 днів, %	3,85 \pm 0,035 ^a	3,87 \pm 0,034 ^a	3,87 \pm 0,023 ^a
C_v , %	2,89	2,74	1,94
Білок, 305 днів, %	3,38 \pm 0,042 ^a	3,32 \pm 0,039 ^a	3,27 \pm 0,017 ^a
C_v , %	3,85	3,73	1,71
Друга лактація			
Надій, 305 днів, кг	6275,1 \pm 369,04 ^a	6021,4 \pm 178,35 ^a	5905,0 \pm 230,07 ^a
C_v , %	18,59	9,37	12,92
Жир, 305 днів, %	3,73 \pm 0,029 ^a	3,77 \pm 0,022 ^a	3,77 \pm 0,023 ^a
C_v , %	2,47	1,80	2,07
Білок, 305 днів, %	3,30 \pm 0,050 ^a	3,23 \pm 0,037 ^a	3,24 \pm 0,033 ^a
C_v , %	4,85	3,28	3,40
Третя лактація			
Надій, 305 днів, кг	6821,6 \pm 253,31 ^a	6664,8 \pm 227,81 ^a	6487,9 \pm 198,95 ^a
C_v , %	11,74	10,81	10,17
Жир, 305 днів, %	3,68 \pm 0,028 ^a	3,71 \pm 0,016 ^a	3,70 \pm 0,021 ^a
C_v , %	2,36	1,40	1,92
Білок, 305 днів, %	3,21 \pm 0,053 ^a	3,14 \pm 0,031 ^a	3,17 \pm 0,038 ^a
C_v , %	5,25	3,09	3,94

За результатами проведених досліджень встановлено відсутність вірогідних відмінностей за кожним з проаналізованих показників для особин з різними генотипами (АС, AD та AF). У порівняльному аспекті дещо вищі значення надою за 305 днів лактації зафіксовано для особин з генотипом АС; найнижчі – для особин з генотипом AF. Виявлена тенденція спостерігається протягом всіх трьох лактацій.

Слід зазначити, що в дослідних популяціях корів виявлені особини і з іншими генотипами, але, приймаючи до уваги необхідність аналізувати тільки сукупність особин за всіма трьома лактаціями, виявити достатню для статистичного аналізу кількість цих особин не вдалося (що додатково вказує на необхідність розширення вибірки у випадку з поліморфними локусами, що мають велику кількість алелів).

3.4.6. Порівняльний аналіз параметрів молочної продуктивності корів дослідних порід за різними генотипами виявлених поліморфних локусів

За результатами проведених досліджень проаналізуємо відмінності в показниках молочної продуктивності тварин з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами.

Як слідує з результатів досліджень для корів чорно-рябої молочної породи за параметром надою за 305 днів лактації найбільш привабливими (тобто такими, що характеризуються максимальним «впливом» на досліджувану ознаку) є локуси пролактину, лептину та міогенного фактору 5. За показником вмісту жиру в молоці – локус рецептору гормону росту, а також лептину, але, в цьому випадку, є протилежний характер впливу різних генотипів (СС та ТТ) на показники молочної продуктивності. З усіх досліджених локусів найбільший вплив на параметр надою за 305 днів лактації мав лептин (різниця між різними генотипами досягала 19,3%), найменшу – пролактин (різниця досягала 12,3%).

У свою чергу, міогенний фактор 5 займав проміжне значення. Але, в цьому випадку слід зазначити, що за локусом пролактину та міогенного фактору встановлені вірогідні відмінності між особинами з різними генотипами для двох лактацій на відміну від лептину, де вірогідні відмінності виявлено лише для першої лактації. Однак, як вже було зазначено вище, відсутність вірогідних відмінностей за локусом лептину на другу та третю лактацію може бути внаслідок низької чисельності особин з генотипом ТТ, що й призводить до значних коливань варіабельності показнику.

Дані щодо переваги за значеннями кожного з генотипів за виявленими поліморфними локусами для популяції чорно-рябої породи корів наведено у таблиці 3.26.

Таблиця 3.26

Відмінності у показниках молочної продуктивності корів української чорно-рябої породи залежно від генотипу за поліморфними локусами

Локус	Переважаючий генотип	Показник	
		Надій, 305 днів, кг	Жир, 305 днів, %
<i>PRL</i>	CC > TT	1 лактація – 15,7%; 2 лактація – 12,3%	-
<i>GHR</i>	AluI+/AluI+ > AluI-/AluI-	-	1 лактація – 5,9%; 2 лактація – 4,1%; 3 лактація – 3,5%
<i>LEP</i>	CC > TT	1 лактація – 19,3%	-
	TT > CC	-	1 лактація – 3,3%
<i>MYF5</i>	TaqI+/TaqI- > TaqI-/TaqI-	1 лактація – 16,8%; 2 лактація – 14,1%	-

Слід відмітити, що в таблиці наведено лише ті показники за кожним з локусів, відмінності у значенні яких між особинами з різними генотипами були вірогідними.

Слід зазначити, що в переважній кількості спостережень, найбільші відмінності у значеннях показників молочної продуктивності корів демонструють особини з «протилежними» гомозиготними генотипами. Значення показників гетерозиготних особин, як правило, займають проміжні позиції, що можна пояснити одночасним синтезом, або характером експресії, продуктів гену (проміжний тип експресії). У такому випадку значення ознаки в гетерозиготних особин будуть займати або проміжне значення, або більш здвигнуте до однієї із

гомозиготних особин, що ми й спостерігаємо у наших дослідженнях. В якості єдиного винятку виступає локус міогенного фактору 5, для якого є характерним превалювання показників молочної продуктивності саме для особин з гетерозиготним генотипом (табл. 3.25). У будь-якому випадку, встановлені особливості експресії продуктивних ознак тварин з різними генотипами рекомендовано використовувати у подальших програмах з маркер-асоційованої селекції великої рогатої худоби дослідних порід.

У свою чергу, для корів української червоно-рябої молочної породи встановлено дещо інші закономірності.

Як слідує з результатів проведених досліджень, для корів червоно-рябої молочної породи за параметром надою за 305 днів на першу лактацію також встановлені бажані генотипи за локусом пролактину. Але, на відміну від чорно-рябої молочної породи в цьому випадку до бажаного генотипу належить ТТ. Для особини, з гомозиготним за алелем Т генотипом, зафіксовано вищі значення надою у порівнянні з особинами з іншими генотипами (СС та СТ). Відмінності в алелях за локусом пролактину для різних порід корів демонструють суттєву важливість фактору впливу генного оточення для функціональних елементів геному, модифікаційної дії інших компонентів, які є різними для дослідних порід внаслідок відмінностей у походженні та належності до різних генеалогічних ліній в цілому. Саме модифікаційний вплив генного оточення й визначає необхідність проведення як популяційно-генетичних, так і досліджень зі встановлення зв'язку між особинами з різними генотипами та параметрами продуктивності в кожному окремому випадку. Отримані результати з аналізу продуктивних якостей тварин за різними генотипами підтверджують сформульовані нами раніше висновки (підрозділ 3.3) за результатами генетико-популяційних досліджень та додатково підкреслюють необхідність проведення окремих для кожної популяції великої рогатої худоби відповідних селекційних заходів.

Дані щодо переваги за значеннями кожного з генотипів за виявленими поліморфними локусами для популяції чорно-рябих корів наведено у таблиці 3.27.

Таблиця 3.27

Відмінності у показниках молочної продуктивності корів української червоно-рябої породи залежно від генотипу за поліморфними локусами

Локус	Переважаючий генотип	Показник	
		Надій, 305 днів, кг	Жир, 305 днів, %
<i>PRL</i>	TT > CC	1 лактація – 11,9%	-
<i>LEP</i>	CC > TT	1 лактація – 19,8%; 2 лактація – 16,8%; 3 лактація – 13,5%.	-
	CT > CC	-	1 лактація – 2,3%; 2 лактація – 2,1%; 3 лактація – 1,6%.

Як і у випадку з чорно-рябою молочною породою дослідна порода корів демонструє суттєві відмінності в показниках продуктивності тварин з різними генотипами за локусом лептину. У цьому випадку бажаний генотип за параметром надою за 305 днів лактації у тварин обох дослідних порід співпадає. Але, слід зазначити, що в червоно-рябої породи вірогідні відмінності в параметрах надою зафіксовано протягом всіх трьох лактацій (у чорно-рябої тільки для першої). Також, додатково до всього, встановлено підвищені значення вмісту жиру в молоці протягом всіх трьох лактацій для гетерозиготного генотипу (СТ) у порівнянні з тваринами, гомозиготними за алелем С.

За іншими проаналізованими локусами вірогідної різниці між тваринами з різними генотипами за параметрами молочної продуктивності не виявлено.

Отримані результати досліджень дають змогу використовувати комплексні генотипи тварин за сукупністю виявлених поліморфних локусів у програмах

маркер-асоційованої селекції корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід.

Результати досліджень розділу опубліковано в роботах [218, 219].

Висновки до розділу 3.4

1. За результатами проведених досліджень встановлені значення параметрів молочної продуктивності корів (надій за 305 днів лактації, вміст молочного жиру та білка) української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід з різними генотипами за локусами пролактину, лептину, рецептору гормону росту, міогенного фактору 5 та фактору некрозу пухлини α за три лактації.

2. Встановлено, що за локусом пролактину підвищеними значеннями параметру надою за 305 днів лактації характеризуються особини з протилежними гомозиготними генотипами для дослідних порід. Для української чорно-рябої молочної породи бажаним генотипом є СС, для української червоно-рябої молочної породи – генотип ТТ.

3. За локусом рецептора гормону росту зафіксовано переважні значення показника вмісту жиру в молоці для гомозиготних за алелем $AluI^+$ особин української чорно-рябої породи.

4. З'ясовано, що за локусом лептину гомозиготні за алелем С особини характеризуються більшими значеннями параметру надою за 305 днів лактації для обох дослідних порід корів. Для чорно-рябих корів встановлений зв'язок генотипу ТТ з вмістом жиру в молоці. Для червоно-рябих корів виявлено переважання гетерозиготних особин за параметром вмісту молочного жиру протягом трьох лактацій.

5. Встановлено, що для корів української чорно-рябої молочної породи за параметром надою за 305 днів лактації за локусом міогенного фактору 5 домінуючими значеннями показнику характеризуються особини з гетерозиготним генотипом.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

У сучасному тваринництві ефективність використання різних селекційних програм, що направлені, як правило, на максимальну реалізацію продуктивного потенціалу тварин, обмежується сукупністю методичних підходів до проведення племінної роботи (у контексті забезпечення якісного селекційного матеріалу поза параметрів умов утримання та годівлі, тобто паратипічних факторів). У цьому випадку особливе значення набуває аналіз особливостей генетичної структури популяцій різних порід великої рогатої худоби за комплексом локусів кількісних ознак (QTL) та генів-кандидатів, причому максимальної уваги заслуговують результати з аналізу відносно маловивчених маркерних систем [36].

Сучасна селекція у тваринництві досягла вражаючих успіхів – створено різноманітні високопродуктивні лінії та породи тварин різних напрямів продуктивності, виведені експериментальні групи тварин, стійких до різних захворювань бактеріальної та вірусної етіології тощо. За використання різноманітних методів оцінки, відбору та підбору упродовж століть створено безліч порід і популяцій тварин, у тому числі з видатною продуктивністю. Деякі з цих методів за експериментального обґрунтування, апробації та результативного практичного застосування одержали назву «класичні». І в наш час за використання класичних методів селекції створено чимало спеціалізованих ліній і кросів, особливо в птахівництві і свинарстві. Але темпи створення масивів тварин з новими властивостями за їх використання уже не влаштовують сучасну індустрію з виробництва продукції тваринництва. Використання маркер-асоційованої селекції (MAS) уже дало змогу провідним селекціонерам світу вирішити низку принципових питань, що, в свою чергу, призвело до відносно швидкого створення нових ліній тварин з високим рівнем продуктивного потенціалу [4, 220]. Дослідження популяційно-генетичних аспектів генофондних (аборигенних) порід різних видів сільськогосподарських

тварин, поряд з комерційними породами, на рівні безпосередньо спадкового матеріалу (ДНК) відноситься до одного з найактуальніших питань сучасного тваринництва для різних країн. Аналіз генетичної структури дослідних популяцій – це необхідний елемент у загальній стратегії маркер-асоційованої селекції, що має безпосереднє відношення до проблеми збереження генофонду поряд з вирішенням суто утилітарних завдань [2, 34]. Проведення генетико-популяційних досліджень дає змогу оцінити алельне різноманіття за кожним із цільових локусів, виявити поліморфні та мономорфні варіанти генів. Наступний крок у цьому напрямі – вивчення зв'язку різних алельних варіантів цільових генів з господарсько-корисними ознаками різних видів сільськогосподарських тварин, порід та напрямів продуктивності, що має визначити значущі, з точки зору практичного використання в селекції, алелі різноманітних генів. У цьому контексті ключове значення має факт потенціальної породоспецифічності кожного з перспективних маркерів, що призводить до варіативності вираженості ефекту конкретного алеля на ту, або іншу ознаку в лініях тварин. Для кожного з потенційних генів-кандидатів це питання суто індивідуальне, що визначає необхідність проведення популяційно-генетичних досліджень на значній кількості популяцій тварин різних видів та напрямів продуктивності.

У зв'язку з цим, в наших дисертаційних дослідженнях були обрані не тільки різні маркерні системи (PCR-RFLP та SSCP), але й гени-кандидати та мутації, які практично не досліджено у популяціях великої рогатої худоби вітчизняної селекції. Понад з цим проведено аналіз дослідних популяцій корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід за поліморфізмом вже «класичного» маркеру молочної продуктивності – локусу пролактину, з метою максимально можливого, в межах кандидатської дисертації, охоплення різних потенційних факторів, що пов'язані з молочною продуктивністю тварин.

За результатами проведених досліджень виявлено особливості генетичної структури популяцій корів української чорно-рябої та червоної молочних порід за локусами пролактину, плацентарного лактогену, рецептору гормону росту, лептину, фактору некрозу пухлини альфа та міогенного фактору росту 5.

За RsaI-поліморфізмом четвертого екзону локусу пролактину визначено алельні варіанти С та Т в кожній з дослідних популяцій. Для кожної популяції відмічено превалювання частоти алелю С, що є найбільш вираженим у випадку з чорно-рябою молочною породою. Отримані дані корелюють з результатами, що одержані на популяціях великої рогатої худоби (в першу чергу – комерційних порід). Так, превалювання частоти алелю RsaI- відмічено в популяціях голштинських корів [221], турецьких породах ВРХ [222], російських чорно- та червоно-рябих порід [115] та інших. У той же час, більш згладжені відмінності між значеннями частот алелів локусу (як у червоно-рябій породи) та домінування частоти алелю RsaI+ є характерними для переважної кількості локальних порід ВРХ різних країн: польської чорно-рябій [223], литовських нативних порід [224], чеських комбінованих породах [126], пакистанських [120] та інших породах, а також для деяких комерційних порід [120]. На нашу думку, домінування частоти алелю RsaI- в дослідних популяціях, а також у голштинів та переважної кількості інших порід великої рогатої худоби пов'язано, перш за все, із загальною спрямованістю племінної роботи у напрямку підвищення параметрів молочної продуктивності тварин. Це припущення отримує додаткові докази у вигляді результатів досліджень з визначення та порівняння параметрів продуктивності особин з різними генотипами за локусом пролактину, що також відображено й для інших порід корів (монбільярдів, голштино-фризьких та деяких локальних порід) [116, 121, 225]. У наших дослідженнях також встановлено вищі значення надоїв для дослідних популяцій корів, але картина, що спостерігається у випадку з різними дослідними породами корів є цілком протилежною. Так, для корів української чорно-рябій породи доведено переваження значень показнику надою за 305 днів лактації для особин із генотипом СС. У той же час, для популяції корів червоно-рябій молочної породи зафіксовано переважання значень показнику надою для гомозиготних за алелем Т особин. На нашу думку, явище, що спостерігається, є наслідком, у першу чергу, впливу генного оточення, яке є різним у дослідних популяціях (вплив породної належності, особливостей

походження та інше). Таким чином, ефект впливу генотипу на ознаку може бути суттєво скорегований та мати виражений породоспецифічний характер.

За результатами проведених досліджень встановлено мономорфність локусу плацентарного лактогену в дослідних популяціях тварин. Мономорфний характер локусу *PL* за *RsaI*-поліморфізмом у п'ятому екзоні підтверджують результати, які були отримані раніше на цих же породах [139]. Також для цього локусу не виявлений поліморфізм й у другій дослідній популяції (Por 2) української чорно-рябої молочної породи корів, що підтверджує виявлену закономірність (наявність особин виключно з генотипом *CC*) для цієї породи. При цьому слід зазначити, що відсутність поліморфних варіантів локусу *PL* вказує лише на мономорфність конкретного сайту для *RsaI* саме у п'ятому екзоні та не свідчить про повну відсутність варіативності гену за іншими позиціями взагалі. Однак, мономорфність за цим сайтом призводить до необхідності його виключення з потенційних програм MAS дослідних порід великої рогатої худоби. Відсутність особин з різними генотипами також унеможливило проведення аналізу зв'язку алельних варіантів з показниками продуктивності тварин.

За результатами проведених досліджень стосовно *AluI*-поліморфізму промоторного фрагменту гену рецептору гормону росту встановлено суттєве переважання частоти алелю *AluI*+, в той час як для червоно-рябих корів – виявлені близькі значення частот алелів.

Результати досліджень, що проведені на популяції червоно-рябих молочних корів, підтверджують дані, що отримані іншими дослідниками на популяціях голштинських корів – схожі значення частот алелів *Alu*+ та *AluI*- [162]. З іншого боку, в популяції литовських червоних корів встановлено переважання частоти алелю *AluI*+ [226], в той час як для литовських чорно-рябих – виявлено подібність значень частот алелів. У свою чергу, превалювання частоти алелю *AluI*+, що виявлено у популяції чорно-рябих молочних корів корелює з даними Aggrey S.E. зі співавторами, стосовно поступового збільшення частоти цього алеля в популяції корів саме голштинської породи [227]. Автори

пов'язують це явище з виявленою асоціацією алелю $AluI^+$ з вмістом жиру в молоці зі спрямованою селекцією за цією ознакою. Це припущення повністю підтверджується у наших дослідженнях, де встановлені більші значення вмісту жиру в молоці корів чорно-рябої породи з генотипом $AluI^+/AluI^+$. Також результати досліджень можна інтерпретувати досить великою часткою кровності української чорно-рябої молочної породи з голштинською породою.

Виявлення різних алельних варіантів гену лептину за $HphI$ -поліморфізмом у третьому екзоні дало змогу вперше в Україні та на пострадянському просторі виявити особливості генетичної структури популяцій корів молочних порід за мутацією A59V. За результатами досліджень встановлено суттєве превалювання частоти алелю С в обох дослідних популяціях тварин. Слід зазначити, що в популяції чорно-рябої молочної породи також встановлено домінування алелю С у гомозиготному стані (генотип СС). Суттєве переважання кількості гомозиготних особин призвело до відхилення від стану генетичної рівноваги, що, у свою чергу, свідчить про певний тиск добору, або вплив фактору дрейфу генів (мікроеволюційних процесів). Виявлене домінування частоти алелю С підтверджує подібні тенденції, що були встановлені іншими авторами на низці локальних порід великої рогатої худоби [228, 229], що, на нашу думку, відображає загальний напрямок продуктивності тварин – підвищення показників надою та інше. Це припущення було підтверджено за результатами досліджень з оцінки продуктивних якостей корів з різними генотипами за локусом лептину – особини з генотипом СС, у порівнянні з ТТ, мали вірогідно більші значення надоїв за 305 днів лактації (перша лактація) у популяції чорно-рябої породи, та вірогідно більші значення цього показника для всіх трьох лактацій у популяції червоно-рябої породи. В той же час, встановлено превалювання значень гетерозиготних у червоно-рябих та гомозиготних за алелем Т чорно-рябих корів за параметром вмісту жиру в молоці.

За локусом міогенного фактору 5 в обох дослідних популяціях тварин встановлено значне переважання частоти алелю $TaqI^+$, при чому за цим показником групи тварин майже не відрізняються одна від одної (0,65 проти

0,64). У популяції корів червоно-рябої породи дещо більша кількість гетерозигот, але й за генетиповою структурою популяції також є дуже схожими. Одержані нами дані узгоджуються з результатами досліджень Kiyici J.M. зі співавторами, що проведені на популяціях голштинських корів, в яких також відмічено превалювання частоти алелю TaqI⁺ (G) [202]. Додатково в наших дослідженнях з аналізу молочної продуктивності також відмічено більші значення надойв молока за 305 днів лактації для корів з генотипом TaqI⁺/TaqI⁺, що повністю узгоджується з результатами Kiyici J.M. зі співавторами. Слід відмітити, що в інших популяціях голштинських корів превалювання алелю TaqI⁺ (G) не відмічено, наявні популяції характеризуються домінуванням генотипу TaqI⁺/TaqI⁻ [230]. У той же час в дослідженнях Fadhil M. зі співавторами показано превалювання частоти алелю TaqI⁺ у популяції бурої швицької породи корів [195]. У цілому, домінування частоти алелю TaqI⁺ є характерним й для локальних/аборигенних порід корів різних країн [231].

За використання розробленої методики проведення SSCP-аналізу досліджено поліморфізм фрагмента гену фактору некрозу пухлини альфа, розміром 239 п.н. За результатами аналізу виявлених одноланцюгових патернів визначено 6 алелів, розміром 450-1200 п.н. – алелі A, B та F у популяції чорно-рябої молочної породи; A, B, C, D, E, F – у популяції червоно-рябих корів. В обох випадках встановлено суттєве переваження частоти алелю A – 0,58 та 0,54 відповідно. Слід відмітити, що єдиний тип гомозиготних особин, які виявлені в обох дослідних породах ВРХ, відноситься до генотипу AA. Всі інші алельні варіанти представлені у вигляді гетерозиготних особин.

Як слідує з результатів досліджень українська червоно-ряба порода демонструє значно більший рівень поліморфізму локусу *TNF-α* за кількістю виявлених алелів та генотипів, але, приймаючи до уваги той факт, що значення частоти домінуючого алелю A є практично однаковою в обох популяціях, а також наявність гомозигот одного типу, можна зробити висновок про загальну спрямованість мікроеволюційних процесів у породах тварин внаслідок

проведення селекційної роботи в напрямку підвищення параметрів молочної продуктивності.

Дослідний локус *TNF-α* утримує весь другий екзон (49 п.н., <http://www.ensembl.org>) та сусідні ділянки першого та другого інтронів (190 п.н.). Згідно бази даних Ensembl у другому екзоні *TNF-α* виявлено 4 SNP – rs451672471 (A/G, synonymous variant), rs456866435 (C/T, synonymous variant), rs110320728 (T/C, synonymous variant) та rs469370538 (G/C, synonymous variant). Отже, ми цілком допускаємо ймовірність відповідності різних поліморфних варіантів виявленим в наших дослідженнях SSCP-патернам. Крім того, додаткові патерни (варіанти) може додавати інтронна ділянка локусу, за якою інформація стосовно SNP відсутня. Наявність у популяції тварин алелів А та В встановлено також і в помісних індійських популяціях корів, в яких виявлено тільки два SSCP-патерна [205]. Цікаво, що у цьому випадку, дослідження Ranjan et al. були спрямовані на визначення параметрів резистентності тварин до маститів – з'ясовано, що алель А наявний, як правило, у особин, які є чутливими до маститів. Потенційний зв'язок різних SSCP-патернів з параметрами резистентності/чутливості до маститів додатково робить локус *TNF-α* перспективним для проведення подальших досліджень на породах ВРХ саме української селекції, приймаючи до уваги важливість та актуальність проблеми маститів у нашій країні. Особливості розподілу частот алелів та генотипів за локусом фактору некрозу пухлини альфа привносять свій суттєвий вклад – вірогідних відмінностей у значеннях показників особин з різними генотипами за параметрами молочної продуктивності в обох дослідних породах ВРХ не виявлено.

Генетико-популяційні дослідження є необхідним фундаментом маркер-асоційованої селекції великої рогатої худоби. Безпосереднім продуктом якої є лінії (експериментальні популяції) тварин, що характеризуються певними генотипами за сукупністю локусів та відповідним рівнем прояву господарсько-корисних ознак. Перехідним етапом між даними стосовно генетичної структури популяцій тварин та створенням експериментальних ліній є дослідження параметрів продуктивності тварин з різними генотипами за виявленими

поліморфними маркерами. У нашій дисертаційній роботі ми виконали обидва функціональні блоки завдання та безпосередньо підійшли до рекомендацій до проведення селекційної роботи та створення дослідних популяцій корів у межах української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід.

За результатами досліджень з аналізу продуктивних якостей особин з різними генотипами за визначеними поліморфними локусами визначені перспективні комплексні генотипи для кожної з порід залежно від спрямованості селекційних задач.

Як слідує за результатами досліджень для корів української чорно-рябої молочної породи найбільш перспективними для дослідження та використання у племінних програмах локусів є пролактин (RsaI-поліморфізм у п'ятому екзоні), лептин (HphI-поліморфізм у третьому екзоні), рецептор гормону росту (AluI-поліморфізм промоторного фрагменту) та міогенний фактор 5 (TaqI-поліморфізм у другому інтроні). Слід відмітити, що приймаючи до уваги протилежний характер значень параметрів надою та вмісту жиру в молоці (групи тварин, що характеризуються максимальним значенням надою також характеризуються і мінімальним вмістом молочного жиру) формули бажаних генотипів за сукупністю поліморфних локусів будуть різними.

Формула бажаних генотипів для популяції корів української чорно-рябої молочної породи за збільшенням значення параметрів надою за 305 діб лактації:

$$PRL^{CC} LEP^{CC} MYF5^{TaqI+/TaqI-}.$$

Формула бажаних генотипів для популяції корів української чорно-рябої молочної породи у напрямку збільшення вмісту молочного жиру:

$$GHR^{AluI+/AluI+} LEP^{TT}.$$

Для корів української червоно-рябої молочної породи найбільш перспективними для дослідження є локуси пролактину та лептину. Кількість перспективних локусів значно менша ніж для чорно-рябої породи, 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 червоно-рябої молочної породи за збільшенням значень параметрів надою за 305 діб лактації:

$$PRL^{TT} LEP^{CC}.$$

Формула бажаних генотипів для популяції корів української червоно-рябої молочної породи у напрямку збільшення вмісту молочного жиру:

$$LEP^{CT}.$$

За результатами проведених дисертаційних досліджень можна зробити декілька узагальнюючих висновків. У першу чергу це стосується певного обмеження та конкретизації можливості використання на практиці отриманих результатів досліджень. Як вже було нами продемонстровано на прикладі аналізу особливостей генетичної структури двох популяцій однієї породи великої рогатої худоби (українська чорно-ряба молочна порода), що розводяться у різних господарствах однієї області, за виявленими поліморфними локусами, неприпустимо робити сліпу екстраполяцію результатів, отриманих на одній популяції, на всі інші. Вплив особливостей племінної роботи та селекційних програм, а також відмінності у походженні тварин, створюють такий тиск добору (або стохастичних факторів), який може призводити до суттєвих відмінностей, майже до протилежних, у співвідношенні частот алелів та генотипів за різними маркерними системами. У деяких випадках це може призвести до втрати перспективних алелів та генних комплексів певною популяцією тварин, що, у свою чергу, значно знизить перспективи використання племінного матеріалу у різних селекційних програмах. Результати популяційних досліджень дають змогу оцінити наявний спектр бажаних алелів за сукупністю функціональних генів та відібрати особин для їх розведення. Використання виявлених перспективних генотипів за кожною з дослідних популяцій ВРХ різних порід дає можливість отримувати нащадків із заданими генотипами, які будуть характеризуватися певним значенням прояву продуктивних ознак (з варіаціями внаслідок кількісної природи продуктивних ознак). Саме отримання нащадків з певними генотипами й надає необхідний рівень практичності проведеним дослідженням.

Слід зазначити, що робота з використання виявлених перспективних маркерних систем повинна проводитися у комплексі зі стандартними процедурами добору та оцінки тварин за фенотипом. Запропоновані методичні підходи, в цілому, доповнюють класичні методи роботи у племінній справі та, у випадку їх реалізації, будуть сприяти максимально можливій реалізації продуктивного потенціалу тварин (велика рогата худоба дослідних порід) у напрямку підвищення параметрів молочної продуктивності.

ВИСНОВКИ

За результатами аналізу особливостей генетичної мінливості популяцій великої рогатої худоби української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід та визначення зв'язку різних алельних варіантів поліморфних локусів кількісних ознак з параметрами продуктивності тварин обґрунтовано критерії добору із застосуванням методів маркер-асоційованої селекції та ДНК-типуювання. Забезпечено передумови використання бажаних комплексних генотипів у селекційній роботі у напрямку підвищення параметрів молочної продуктивності дослідних популяцій корів.

1. Оптимізовано та апробовано методику електрофоретичного розділення ампліфікованих фрагментів другого екзону гену фактору некрозу пухлини альфа (SSCP-аналіз). Встановлено, що для ефективного генотипування необхідно використовувати 12% поліакриламідний гель зі співвідношенням акриламід/бісакриламід 100/1 та додаванням гліцерину до 5% від загального об'єму гелю.

2. За результатами проведених досліджень встановлено, що в популяціях корів української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід локуси пролактину (*PRL*), рецептору гормону росту (*GHR*), лептину (*LEP*), міогенного фактору 5 (*MYF5*) та фактору некрозу пухлини альфа (*TNF-α*) є поліморфними. У популяції української чорно-рябої молочної породи встановлено відхилення від стану генетичної рівноваги за локусами *LEP* та *TNF-α*; у популяції української червоно-рябої молочної породи – за локусами *PRL* та *TNF-α*. Локус плацентарного лактогену (*PL*) за *RsaI*-поліморфізмом у п'ятому екзоні є мономорфним в обох популяціях.

3. За результатами проведених досліджень з'ясовано, що різні популяції корів української чорно-рябої молочної породи характеризуються превалюванням співпадаючих «домінуючих» алелей за локусами *PRL* (частота алеля С складає 0,85 та 0,6), *LEP* (частота алеля С – 0,77 та 0,72) та *TNF-α* (частота алеля А – 0,58 та 0,56 відповідно), проте вираженими відмінностями у значеннях

частот генотипів та загальних параметрів генетичної мінливості. Доведено, що варіювання показників генетичної мінливості (H_e) залежить від маркера, який використовується, – у випадку з SSCP значення цього показника суттєво вище ніж його ж за використання PCR-RFLP.

4. Доведено необхідність індивідуального аналізу параметрів генетичної структури у випадку з окремими популяціями однієї породи корів (на прикладі української чорно-рябої молочної породи). В умовах відсутності використання спрямованого добору за генотипом популяції ВРХ однієї породи відрізняються одна від одної за окремими локусами внаслідок відмінностей у вихідному племінному матеріалі, а також впливу таких мікроеволюційних факторів, як добір та дрейф генів.

5. Встановлено, що за локусом пролактину підвищеними значеннями параметру надою за 305 днів лактації характеризуються особини з протилежними гомозиготними генотипами для дослідних порід. Для української чорно-рябої молочної породи бажаним генотипом є СС, для української червоно-рябої молочної породи – генотип ТТ.

6. За локусом рецептора гормону росту зафіксовано переважні значення показника вмісту жиру в молоці для гомозиготних за алелем $AluI^+$ особин української чорно-рябої породи ($p < 0,05$). Для першої лактації різниця між значеннями показників досягала 5,9%; для другої – 4,1%; для третьої – 3,5% відповідно.

7. З'ясовано, що за локусом лептину гомозиготні за алелем С особини характеризуються вірогідно більшими значеннями параметру надою за 305 днів лактації для обох дослідних порід корів ($p < 0,05$). Для чорно-рябої молочної породи різниця у значеннях показнику між особинами з різними гомозиготними генотипами складає 19,7% на першу лактацію; для червоно-рябої – 18,8% на першу, 16,8% – на другу та 13,5% на третю лактацію відповідно. Для чорно-рябої породи встановлений зв'язок генотипу ТТ з вмістом жиру в молоці ($ТТ > СС$; 3,3% на першу лактацію), для червоно-рябої – виявлено переважання

гетерозиготних особин за цим показником протягом всіх трьох лактацій (СТ > СС; 2,3%, 2,1% та 1,6% відповідно).

8. Встановлено, що для корів української чорно-рябої молочної породи за параметром надою за 305 днів лактації за локусом міогенного фактору 5 домінуючими значеннями показнику характеризуються особини з гетерозиготним генотипом ($p < 0,05$). Різниця у значеннях показнику між особинами з різними генотипами (TaqI⁺/TaqI⁻ та TaqI⁻/TaqI⁻) складає 16,8% для першої лактації та 14,1% для другої.

9. За результатами проведених досліджень визначені перспективні комплексні генотипи для кожної з порід залежно від спрямованості селекційних задач. Для української чорно-рябої молочної породи формула бажаних генотипів у напрямку збільшення значення параметрів надою за 305 днів лактації – $PRL^{CC}LEP^{CC}MYF5^{TaqI^{+}/TaqI^{-}}$; у напрямку збільшення вмісту молочного жиру – $GHR^{AluI^{+}/AluI^{+}}LEP^{TT}$. Для української червоно-рябої молочної породи формула бажаних генотипів у напрямку збільшення значення параметрів надою за 305 днів лактації – $PRL^{TT}LEP^{CC}$; у напрямку збільшення вмісту молочного жиру – LEP^{CT} .

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Для забезпечення найвищої молочної продуктивності корів української чорно-рябої молочної породи при проведенні племінної роботи у комплексі зі стандартними процедурами добору та оцінки тварин за фенотипом рекомендується використовувати ДНК-типуння особин за локусами пролактину (RsaI-поліморфізм у п'ятому екзоні), лептину (HphI-поліморфізм у третьому екзоні), рецептору гормону росту (AluI-поліморфізм промоторного фрагменту) та міогеного фактору 5 (TaqI-поліморфізм у другому інтроні); для української червоно-рябої молочної породи – за локусами пролактину та лептину відповідно.

2. Для досягнення максимальних значень молочної продуктивності корів обох дослідних порід рекомендується використовувати розроблені формули бажаних генотипів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Dekkers J. C. M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J. Anim. Sc.* 2004. Vol. 82. E-Suppl. P. E313–E328.
2. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17, № 4/2. С. 1044–1054.
3. Marker-Assisted Selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish / ed. E. P. Guimaraes et. al. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations, 2007. 494 p.
4. Wakchaure R., Ganguly S., Para P. A., Praveen P. K., Qadri K. Molecular Markers and their Applications in Farm Animals: A Review. *International Journal of Recent Biotechnology*. 2015. Vol. 3 (3). P. 23–29.
5. Naqvi A. N. Application of Molecular Genetic Technologies in Livestock Production: Potentials for Developing Countries. *Advances in biological research*. 2007. Vol. 1 (3-4). P. 72–84.
6. Кулібаба Р. О. Використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки селекційної роботи з популяціями курей українських локальних порід. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. 2017. № 118. С. 104–113.
7. Копилова К. В. Молекулярно-генетичні маркери в системі збереження біорізноманіття сільськогосподарських тварин: дис. ... д-ра с.-г. наук: 03.00.15 / Ін-т розведення і генетики тварин. Чубинське, 2012. 307 с.
8. FAO. 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO animal production and health guidelines. No. 9. Rome, Italy. URL: <http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf>
9. Столповский Ю. А. Популяционно-генетические основы сохранения генофондов domestikirovannykh видов животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. № 17 (4/2). С. 900–915.

10. Murad Gurses A.E., Yuce H., Etem E.O., Patir B. 2016. Polymorphisms of kappa-casein gene and their effects on milk production traits in Holstein, Jersey and Brown Swiss cattle. *Animal Production Science*. Vol. 58(5). P. 778–784. doi:10.1071/AN15131
11. Alim M.A., Sun D., Zhang Y., Zhang Y., Zhang Q., Liu L. 2015. DNA Polymorphisms in the β -lactoglobulin and κ -casein Genes Associated with Milk Production Traits in Dairy Cattle. *Biores Comm*. Vol. 1(2). P. 82–86.
12. Kolenda M., Sitkowska B. 2021. The Polymorphism in Various Milk Protein Genes in Polish Holstein-Friesian Dairy Cattle. *Animals*. Vol. 11(2). 389. doi:10.3390/ani11020389
13. Ahmadzadeh M., Rashidi F., Najafabadi H. A., Jaferian A., & Eghbalsaiied S. 2019. Effects of genetic polymorphism in Pit1, GH, GHR and KCN3 on milk yield and body weight of Khuzestan (Iran) water buffaloes. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*. Vol. 32(2). P. 107–116. doi:10.17533/udea.rccp.v32n2a04
14. Amiri S., Jemmali B., Ferchichi M.A.H. 2018. Assessment of growth hormone gene polymorphism effects on reproductive traits in Holstein dairy cattle in Tunisia. *Arch. Anim. Breed*. Vol. 61. P. 481–489. doi:10.5194/aab-61-481-2018
15. Putra W.P.B., Agung P.P., Anwar S., Said S. 2019. Polymorphism of Bovine Growth Hormone Receptor Gene (g.3338A>G) and Its Association with Body Measurements and Body Weight in Pasundan Cows. *Tropical Animal Science Journal*. Vol. 42(2). P. 90–96. doi:10.5398/tasj.2019.42.2.90
16. Копилов К.В. Поліморфізм генів асоційованих з господарсько корисними ознаками (QTL) у трьох порід великої рогатої худоби. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2010. Вип. 7 (17). С. 51–57.
17. Супрович Т.М., Мохначова Н.Б. 2017. Поліморфізм генів господарсько-корисних ознак сірої української породи великої рогатої худоби. *Біологія тварин*. Т. 19, № 1. С. 111–118.
18. 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.

19. Березовський О.В., Полупан Ю.П., Рубан С.Ю., Копилов К.В. Зв'язок поліморфізму за генами κ-CN, TG5, LEP з молочною продуктивністю корів українських молочних порід. *Розведення і генетика тварин*. 2015. Вип. 49. С. 154–164.
20. Ладика В.І., Скляренко Ю.І., Павленко Ю.М. 2020. Характеристика генетичної структури плідників лебединської породи за генами бета- (CSN2) та капа-казеїну (CSN3). *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. № 2. С. 88–96.
21. Мітіюгло І.Д., Дзіцюк В.В., Мохначова Н.Б., Добрянська М.Л. 2021. Генетична структура корів української червоно-рябої молочної породи за комплексом генотипів GH, CSN3 та BLG. *Вісник аграрної науки*. №4 (817). С. 51–58.
22. Ahmed R., Bello S., Shu'aibu I., Hegarty M. 2020. An Investigation of Polymorphism in SMO and LMF1 Genes and Their Association with Body Size in White Fulani and Muturu Cattle Breeds. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. Vol. 11. P. 319–344. doi:10.4236/abb.2020.117023
23. Salzano A.M., Pauciullo A., D'Ambrosio C., Novi G., Strazzullo M., Scaloni A. 2015. Bovine hemoglobin polymorphism: a novel alpha-globin variant identified in the Agerolese breed from southern Italy. *Czech J. Anim. Sci.* Vol. 60 (4). P. 145–151. doi:10.17221/8128-CJAS
24. Войтенко С.Л., Сидоренко О.В. 2021. Збереження генофонду та підвищення продуктивності худоби білоголової української породи. *Вісник аграрної науки*. №2 (815). С. 41–51.
25. Козир В.С., Коваленко В.П., Геккієв А.Д. 2017. Стан та перспективи племінної роботи в молочному скотарстві півдня України. *Передгірне та гірське землеробство і тваринництво*. Вип. 61. С. 159–172.
26. Dodgson J. B., Cheng H. H., Okimoto R. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science*. 1997. Vol. 76. P. 1108–1114.
27. Schlotterer C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature reviews: genetics*. 2004. Vol. 5. P. 63–69.

28. Teneva A. Molecular markers in animal genome analysis. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 2009. Vol. 25. P. 1267–1284.
29. Arif I.A., Khan H.A. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*. Vol. 32 (1). P. 9–17.
30. Yadav A. K., Tomar S. S., Jha A. K., Singh J. Importance of Molecular Markers in Livestock Improvement: A Review. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 2017. Vol. 5 (4). P. 614–621.
31. Ставецька Р.В. 2017. Селекція молочної худоби за стійкістю до захворювань. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. № 1-2. С. 90–100.
32. Ладика В.І., Скляренко Ю.І., Павленко Ю.М. 2020. Характеристика генетичної структури за геном β -казеїну плідників, допущених до використання в Україні у 2020 році. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. № 1. С. 39–45.
33. Kulibaba R.A., Liashenko Y.V., Yurko P.S. Genetic differentiation of Ukrainian chicken breeds using various types of molecular genetic markers. *Agricultural Biology*. 2018. Vol. 53, № 2. P. 282–292. doi:10.15389/agrobiology.2018.2.282eng
34. Mishra S. P., Mishra C., Mishra D. P., Rosalin B. P., Bhuyan C. Application of advanced molecular marker technique for improvement of animal: A critical review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2017. Vol. 5 (5). P. 1283–1295.
35. Beuzen N.D., Stear M.J., Chang K.C. 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*. Vol. 160(1). P. 42–52. doi:10.1053/tvj.2000.0468
36. Salisu I. B., Olawale A.S., Jabbar B., Koloko B.L., Abdurrahman S.L., Amin A.B., Ali Q. 2018. Molecular markers and their Potentials in Animal Breeding and Genetics. *Nigerian J. Anim. Sci*. Vol. 20 (3). P. 29–48.

37. Dentine, M.R. 1992. Marker-assisted selection in cattle. *Animal Biotechnology*. Vol. 3(1). P. 81–93. doi:10.1080/10495399209525764
38. Abd El-Hack M.E., Abdelnour S.A., Swelum A.A., Arif M. 2018. The application of gene marker-assisted selection and proteomics for the best meat quality criteria and body measurements in Qinchuan cattle breed. *Molecular Biology Reports*. Vol. 5. P. 1445–1456. doi:10.1007/s11033-018-4211-y
39. Hayes B.J., Chamberlain A.J., McPartlan H., Macleod I., Sethuraman L., Goddard M.E. 2007. Accuracy of marker-assisted selection with single markers and marker haplotypes in cattle. *Genet. Res.* Vol. 89. P. 215–220. doi:10.1017/S0016672307008865
40. Purfield D.C., Evans R.D., Berry D.P. 2020. Breed and trait-specific associations define the genetic architecture of calving performance traits in cattle. *Journal of Animal Science*. Vol. 98 (5). P. 1–18. doi:10.1093/jas/skaa151
41. Gubarenko N. 2020. Evaluation of milk productivity of cows using genetic markers. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. № 8 (2). P. 163–170.
42. Тарасюк С.І., Каратєєва О.І. 2012. Порівняльний аналіз днк-поліморфізму структурних генів білків у корів різних типів формування організму. Збірник наукових праць Вінницького національного аграрного університету. Вип. 5(67). С. 177–183.
43. Копилова К., Копилов К., Арнаут К. 2009. Особливості генетичної структури різних порід великої рогатої худоби за локусами кількісних ознак (QTL). *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України*. Вип. 138. С. 239–245.
44. Копылов К.В., Копылова Е.В., Шельов А.В., Шевченко Е.А., Березовский А.В. 2014. Генетическая структура популяции по полиморфным вариантам гена MSTN и хозяйственно-биологические особенности кроликов. *Экологическая генетика*. Том 12 (1). С. 73–78.
45. Kotsyubenko G.A., Pogorelova A.A., Kramarenko O.S. 2017. Progesterone receptor (PRG) gene polymorphism and association with litter size in the

california rabbit breed. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*. Vol. 19(74). P. 76–79.

46. Балацкий В.Н., Саенко А.М., Гришина Л.П. 2012. Полиморфизм локуса рецептора естрогена 1 в популяциях свиней разных генотипов и его ассоциация с репродуктивными признаками свиноматок крупной белой породы. *Цитология и генетика*. № 4. С. 48–54.

47. Гиря В.М., Метлицька О.І., Усачова В.Є., Бондаренко О.М. 2018. Зв'язок поліморфізмів генів PLIN і MC4R з відгодівельними якостями свиней. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. № 1. С. 101–107.

48. Vashchenko P., Balatsky V., Pocherniaev K., Voloshchuk V., Tsybenko V., Saenko A., Oliynychenko Ye., Buslyk T., Rudoman H. 2019. Genetic characterization of the Mirgorod pig breed, obtained by analysis of single nucleotide polymorphisms of genes. *Agricultural Science and Practice*. Vol. 6 (2). P. 47–57.

49. Череватов О., Рошка Н.М. 2020. Поліморфізм ділянки СоІІ медоносних бджіл західних регіонів України. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*. Том 12 (2). С. 174–179.

50. 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.

51. Мельник О.В., Дзіцюк В.В., Спиридонов В.Г., Андрєєв І.В. 2015. Генетична характеристика коней чистокровної верхової та української верхової порід за мікросателітними локусами ДНК. *Тваринництво та технології харчових продуктів*. № 207. С. 188–19.

52. Shelyov A.V., Kopylov K.V., Kramarenko S.S., Kramarenko A.S. 2020. Genetic structure of different equine breeds by microsatellite DNA loci. *Agricultural Science and Practice*. Vol. 7 (2). P. 3–13.

53. Шуліка Л. В. Генетична структура двох ліній курей комбінованого напряму продуктивності за локусами MSTN та TLR4. *Вісник аграрної науки*. 2016. № 2. С. 58–60.

54. Кулібаба Р. О., Юрко П. С., Ляшенко Ю. В. Аналіз розподілу гаплотипів у локусах пролактину та інсуліноподібного ростового фактору-I у популяціях курей різних порід. *Вісник аграрної науки*. 2018. № 3 (780). С. 30–34.
55. Супрович Т.М., Мохначова Н.Б. 2017. Поліморфізм генів господарсько-корисних ознак сірої української породи великої рогатої худоби. *Біологія тварин*. Т. 19, № 1. С. 111–118.
56. Коваль Т.П. 2020. Генетико-популяційні параметри корів української червоної молочної породи залежно від умовної кровності за голштинською породою. *Розведення і генетика тварин*. Вип. 60. С. 40–46.
57. Ладика В.І., Скляренко Ю.І., Павленко Ю.М. 2021. Аналіз молочної продуктивності корів української бурої молочної породи різних генотипів за капа-казеїном. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. № 1. С. 74–81.
58. Гуменний В.Д., Костенко О.І., Тимченко Л.О. 2015. Організаційні та генетикопопуляційні аспекти збереження автохтонних локальних порід в Україні. *Вісник аграрної науки*. №6. С. 37–42.
59. Grădinaru A.C., Petrescu-Mag I.V., Oroian F.C., Balint C., Oltean I. 2018. Milk Protein Polymorphism Characterization: a Modern Tool for Sustainable Conservation of Endangered Romanian Cattle Breeds in the Context of Traditional Breeding. *Sustainability*. Vol. 10. P. 534. doi:10.3390/su10020534
60. Melka H.D., Jeon E., Kim S., Han J., Yoon D., Kim K. 2011. Identification of Genomic Differences between Hanwoo and Holstein Breeds Using the Illumina Bovine SNP50 BeadChip. *Genomics & Informatics*. Vol. 9 (2). P. 69–73. doi:10.5808/GI.2011.9.2.69
61. Гончаренко І.В. 2010. Система інформаційного забезпечення і прискорення селекційного процесу в молочному скотарстві. *Збірник наукових праць ВНАУ. Сучасні проблеми селекції, розведення та гігієни тварин*. № 5 (45). С. 21–24.
62. Hartatik T., Volkandari S.D., Rachman M.P., Sumadi 2013. Polymorphism leu/val of Growth Hormone Gene Identified from Limousin Cross

Local Cattle in Indonesia. *Procedia Environmental Sciences*. Vol. 17. P. 105–108. doi:[10.1016/j.proenv.2013.02.017](https://doi.org/10.1016/j.proenv.2013.02.017)

63. Ramesha K.P.; Rao A., Basavaraju M., Geetha G.R., Kataktalware M.A., Jeyakumar S. 2015. Genetic variability of bovine GHR, IGF-1 and IGFBP-3 genes in Indian cattle and buffalo. *South African Journal of Animal Science*. Vol. 45 (5). P. 485–493. doi:[10.4314/sajas.v45i5.5](https://doi.org/10.4314/sajas.v45i5.5)

64. Ahmadzadeh M, Rashidi F, Najafabadi HÁ, Jaferian A, Eghbalsaied S. 2019. Effects of genetic polymorphism in Pit1, GH, GHR and KCN3 on milk yield and body weight of Khuzestan (Iran) water buffaloes. *Rev Colomb Cienc Pec*. Vol. 32(2). P. 107–116.

65. Zabeel A.K., Mohammed Al-Bazi W.G., Ali Muhammed H. 2018. Study the association of pit1 gene polymorphism with milk yield and body weight traits of local breed Iraqi cattle in Kerbala province. *Biochemistry and Cell Biology*. Vol. 18 (2). P. 1867–1871.

66. Li J., Liang A., Li Z., Du C., Hua G., Salzano A., Campanile G., Gasparini B., Yang L. An association analysis between PRL genotype and milk production traits in Italian Mediterranean river buffalo. *Journal of Dairy Research*. Vol. 84 (4). P. 430–433.

67. Hartati, Soewandi B.D.P., Hapsari A.A.R., Anwar S., Pamungkas D. 2019. Identifikasi polimorfisme gen GH|MspI dan GHR|AluI dan hubungannya dengan bobot lahir pedet pada sapi Peranakan Ongole Grati di Loka Penelitian Sapi Potong. *JITV*. Vol. 24(2). P. 55–61. doi:[10.14334/jitv.v24i2.1939](https://doi.org/10.14334/jitv.v24i2.1939)

68. Cobanoglu O., Kul E., Gurcan E.K., Abaci S.H., Cankaya S. 2021. Determination of the association of GHR/AluI gene polymorphisms with milk yield traits in Holstein and Jersey cattle raised in Turkey. *Arch. Anim. Breed*. Vol. 64, 417–424. doi:[10.5194/aab-64-417-2021](https://doi.org/10.5194/aab-64-417-2021)

69. Bižienė R., Morkūnienė K., Mišeikienė R., Pečiulaitienė N., Makštutienė N., Šlyžius E. 2018. Effects of single nucleotide polymorphism markers on the carcass and fattening traits in different pig populations. *Journal of Animal and Feed Sciences*. Vol. 27. P. 255–262. doi:[10.22358/jafs/95020/2018](https://doi.org/10.22358/jafs/95020/2018)

70. Al Abri M.A., Holl H.M., Kalla S.E., Sutter N.B., Brooks S.A. 2020. Whole genome detection of sequence and structural polymorphism in six diverse horses. *PLoS ONE*. Vol. 15(4). e0230899. doi:10.1371/journal.pone.0230899
71. Wuac S., Ninga Y., Razaa S.H.A., Zhangd C., Zhang L., Cheng C., Wang H., Schreurse N., Zan L. 2019. Genetic variants and haplotype combination in the bovine CRT3 affected conformation traits in two Chinese native cattle breeds (*Bos Taurus*). *Genomics*. Vol. 111 (6). P. 1736–1744. doi:10.1016/j.ygeno.2018.11.028
72. Zhang H., Wei Y., Zhang F., Liu Y., Li Y., Li G., Han B., Wang H., Zhao W., Wang C. 2019. Polymorphisms of MASP2 gene and its relationship with mastitis and milk production in Chinese Holstein cattle. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. Vol. 33 (1). P. 589–596. doi:10.1080/13102818.2019.1596755
73. Кругляк О.В., Чорноостровець Н.М., Кулакова М.Б., Мартинюк І.С. 2020. Розвиток генетичних ресурсів молочного скотарства України. Розведення і генетика тварин. Том 60. С. 47–53. doi:10.31073/abg.60.06
74. Кийко Е.И. 2010. Принципы маркерной селекции в молочном скотоводстве. *Вестник ТГУ*. Том 15 (10). С. 134–135.
75. Miluchova M., Gabor M., Trakovicka A. 2014. Analysis of Beta-Casein Gene (*CSN2*) Polymorphism in Different Breeds of Cattle. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*. Vol. 47 (2). P. 56–59.
76. Parashar A., Krishan Saini R. 2015. A1 milk and its controversy-a review. *International journal of bioassays*. Vol. 4 (12). P. 4611–4619.
77. Rahimi Z., Gholami M., Rahimi Z., Yari K. 2015. Evaluation of beta-casein locus for detection of A1 and A2 alleles frequency using allele specific PCR in native cattle of Kermanshah, Iran. *Biharean Biologist*. Vol. 9 (2). P. 85–87.
78. Massella E., Piva S., Giacometti F., Liuzzo G., Zambrini A.V., Serraino A. 2017. Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy. *Italian Journal of Food Safety*. Vol. 6:6904. P. 131–133.
79. Малікова А., Ладика В., Скляренко Ю., Павленко Ю. 2020. Формування молочного стада для виробництва молока А2. *Біологія тварин*. Том 22 (4). С. 76.

80. Ладика В.І., Склярєнко Ю.І., Павленко Ю.М., Малікова А.І. 2020. Порівняльна оцінка молочної продуктивності корів української бурої молочної породи різних генотипів за β -казеїном. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво»*. Вип. 3 (42). С. 3–7.
81. Mokhnachova N.B. 2021. Genotyping of “Ukrainian” water buffaloes according β -CN (A2-milk), *CSN3* and *β LG* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, agrarian series*. Vol. 59 (3). P. 361–365. doi:10.29235/1817-7204-2021-59-3-361-365
82. Kaunitz J.D. 2015. The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Dig Dis Sci*. Vol. 60(8). P. 2230–2231.
83. Zhu H., Zhang H., Xu Y., Laššáková S., Korabečná M., Neužil P. 2020. PCR past, present and future. *BioTechniques*. Vol. 69, No. 4. doi:10.2144/btn-2020-0057.
84. Van Pelt-Verkuil E., van Belkum A., Hays J. P. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer Science, 2007. 329 p.
85. Mohamed L. DNA markers and their application in animal genetics: an overview. *The Sudan J. Vet. Res*. 2006. Vol. 21. P. 1–13.
86. Duran C., Appleby N., Edwards D., Batley J. Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualization. *Current bioinformatics*. 2009. Vol. 4. P. 16–27.
87. Сулимова Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения. *Успехи современной биологии*. 2004. №124 (3). С. 260–271.
88. 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.
89. Копилов К. В., Метлицька О. І., Мохначова Н. Б., Супрович Т. М. Молекулярно-генетичний моніторинг у системі збереження генетичних ресурсів тварин. *Вісник аграрної науки*. 2016. № 6. С. 43–47.

90. Kobak P., Sablik P., Zukiewicz A., Syczewski A., Lechowicz W. Analysis of indel polymorphism of the PRNP gene in water buffalo, *Bubalus bubalis*. *Acta Sci. Pol., Zootechnica*. 2014. Vol. 13 (1). P. 51–56.
91. Zhao H., Wu M., Wang S., Yu X., Li Z. 2018. Ruihua Dang, and Xiuzhu Sun Identification of a novel 24 bp insertion–deletion (indel) of the androgen receptor gene and its association with growth traits in four indigenous cattle breeds. *Arch. Anim. Breed.* Vol. 61. P. 71–78. doi:10.5194/aab-61-71-2018
92. Wu M., Zhao H., Tang X., Li Q., Yi X., Liu S., Sun X. 2020. Novel InDels of GHR, GHRH, GHRHR and Their Association with Growth Traits in Seven Chinese Sheep Breeds. *Animals*. Vol. 10 (1883). doi:10.3390/ani10101883
93. Strychalski J., Czarnik U., Pierzchała M., Pareek C.S. 2011. Relationship between the insertion/deletion polymorphism within the promoter and the intron 1 sequence of the Prnp gene and milk performance traits in cattle. *Czech J. Anim. Sci.* Vol. 56 (4). P. 151–156.
94. Jiang J., Liu L., Gao Y. 2019. Determination of genetic associations between indels in 11 candidate genes and milk composition traits in Chinese Holstein population. *BMC Genet.* Vol. 20 (48). <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0751-y>
95. Li J., Zhang S., Shen C., Niu Z., Yang H., Zhang K., Lan X. 2021. Indel mutations within the bovine HSD17B3 gene are significantly associated with ovary morphological traits and mature follicle number. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 209. 105833. doi:10.1016/j.jsbmb.2021.105833
96. Hu J., Ng P.C. 2012. Predicting the effects of frameshifting indels. *Genome Biology*. Vol. 13(2), R9. doi:10.1186/gb-2012-13-2-r9
97. Lalonde S., Stone O.A., Lessard S., Lavertu A., Desjardins J., Beaudoin M., Lettre G. 2017. Frameshift indels introduced by genome editing can lead to in-frame exon skipping. *PLOS ONE*. Vol. 12(6), e0178700. doi:10.1371/journal.pone.01787
98. Jain A., Roorkiwal M., Kale S., Garg V., Yadala R., Varshney R.K. 2019. InDel markers: An extended marker resource for molecular breeding in chickpea. *PLoS ONE*. Vol. 14(3). e0213999. doi:10.1371/journal.pone.0213999

99. Yuan H., Yang W., Zou J., Cheng M., Fan F., Liang T., Yu Y., Qiu R., Li S., Hu J. 2021. InDel Markers Based on 3K Whole-Genome Re-Sequencing Data Characterise the Subspecies of Rice (*Oryza sativa* L.). *Agriculture*. Vol. 11 (655). doi:10.3390/agriculture1107065
100. Li J., Erdenee S., Zhang S., Wei Z., Zhang M., Jin Y., Wu H., Chen H., Sun X., Xu H., Cai Y., Lan X. 2018. Genetic effects of PRNP gene insertion/deletion (indel) on phenotypic traits in sheep. *Prion*. Vol. 12 (1). P. 42–53. doi:10.1080/19336896.2017.1405886
101. Berg H. 2012. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. P. 315–334. doi:10.5772/37724
102. Yang W., Kang X., Yang Q. 2013. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *J Animal Sci Biotechnol*. Vol. 4 (2). doi:10.1186/2049-1891-4-2
103. Hasanain M.H., Mahmoud K.Gh.M., Ahmed Y.F., EL-Menoufy A.A., Sakr A.M., Othman O.E. 2017. Effect of Body Condition Score and PCR-RFLP Polymorphism of Prolactin Gene on Semen Characteristics of Buffalo Bulls (*Bubalus Bubalis*). *Egypt. J. Vet. Sci*. Vol. 48. No 1. P. 1–9.
104. Sihite D.E.W.T., Priyanto R., Jakaria J. 2019. Polymorphism and Association of 5'UTR CAPN1 Gene with Growth Traits in Bali Cattle by PCR-RFLP. *Tropical Animal Science Journal*. Vol. 42(3). P. 175–179. doi:10.5398/tasj.2019.42.3.175
105. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natd. Acad. Sci. USA*. 1989. Vol. 86. P. 2766–2770.
106. Humphries S. E., Gudnason V., Whittall R. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry*. 1997. Vol. 43, No. 3. P. 427–435.

107. Larsen L. A., Jespersgaard C., Andersen P. S. Single-strand conformation polymorphism analysis using capillary array electrophoresis for large-scale mutation detection. *Nature Protocols*. 2007. Vol. 2, No 6. P. 1458–1466.
108. Tian H., Jaquins-Gerstl A., Munro N., Trucco M., Brody L.C., Landers J. P. 2000. Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis by Capillary and Microchip Electrophoresis: A Fast, Simple Method for Detection of Common Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genomics*. Vol. 63(1). P. 25–34. doi:10.1006/geno.1999.6067
109. Dong Y., Zhu H. 2005. Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis: Basic Principles and Routine Practice. Vol. 108. P.149–157. doi:10.1385/1-59259-850-1:149
110. Bu G., Liang X., Li J., Wang Y. 2015. Extra-pituitary prolactin (prl) and prolactin-like protein (prl-l) in chickens and zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* Vol. 220. P. 143–153. doi:10.1016/j.ygcen.2015.02.001.
111. Bole-Feysot C.H., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P.A. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrinology Review*. Vol. 19. P. 225–268.
112. Dobolyi A., Oláh S., Keller D., Kumari R., Fazekas E.A., Csikós V., Renner É., Cservenák M. 2020. Secretion and Function of Pituitary Prolactin in Evolutionary Perspective. *Front. Neurosci.* Vol. 14:621. doi:10.3389/fnins.2020.00621
113. Knight C.H. 2001. Overview of prolactin's role in farm animal lactation. *Livestock Production Science*. Vol. 70 (1) P. 87-93. doi:10.1016/S0301-6226(01)00200-7
114. Oztabak K., Un C., Tesfaye D., Akis I., Mengi A. 2008. Genetic polymorphisms of osteopontin (OPN), prolactin (PRL) and pituitary-specific transcript factor-1 (PIT-1) in South Anatolian and East Anatolian Red cattle. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section A. Animal Science*. Vol. 58 (2). P. 109-112. doi:10.1080/09064700802357771

115. Alipanah M., Alexandrovna Kalashnikova L., Veladimirovich Rodionov G. 2008. Kappa-casein and PRL-RsaI genotypic frequencies in two Russian cattle breeds. *Archivos de Zootecnia*. Vol. 57 (218). P. 131–138.
116. Ghasemi N., Zadehrahmani M., Rahimi G., Hafezian S.H. 2009. Associations between prolactin gene polymorphism and milk production in Montebeliard cows. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. Vol. 1 (3), P. 048–051.
117. Sodhi M., Mukesh M., Mishra B.P., Parvesh K., Joshi B.K. 2010. Analysis of Genetic Variation at the Prolactin-RsaI (PRL-RsaI) Locus in Indian Native Cattle Breeds (*Bos indicus*). *Biochemical Genetics*. 49 (1-2) P. 39-45. doi:10.1007/s10528-010-9383-7
118. Alfonso E., Rojas R., Herrera J.G., Ortega M.E., Lemus C., Cortez C., Ruiz J., Pinto R., Gómez H. 2012. Polymorphism of the prolactin gene (PRL) and its relationship with milk production in American Swiss cattle. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 11. (29). P. 7338–7343. doi:10.5897/AJB11.1485
119. Mahajan V., Parmar S.N.S., Thakur M.S., Sharma G. 2012. Association of prolactin gene polymorphism with milk production traits in Frieswal cattle. *Journal of Animal Research*. Vol. 2 (2). P. 165–169.
120. Ishaq R., Suleman M., Riaz M.N., Yousaf M., Shah A., Ghafoor A. 2012. Prolactin gene polymorphism in Nili-Ravi buffaloes in relation to Sahiwal and Achai Cattle. *International Journal of Dairy Technology*. Vol. 66 (1). P. 1–5. doi:10.1111/j.1471-0307.2012.00875.x
121. Patel J.B., Chauhan J.B. 2017. Polymorphism of the Prolactin Gene and Its Relationship with Milk Production in Gir and Kankrej Cattle. *Journal of Natural Science Biology and Medicine*. Vol. 8 (2). P. 167–170. doi:10.4103/jnsbm.JNSBM_303_16
122. Shah R.M., Ganai N.A., Sheikh F.D., Shanaz S., Khan H.M., Alam S., Khan N.N., Sheikh T., Bukhari S., Hamadani A., Rather M.A. 2021. Exon IV prolactin (PRL) gene polymorphism and its association with milk production traits in dairy cattle of Kashmir, India. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. Vol. 9 (2). P. 521–524.

123. Sonmez Z., Ozdemir M. 2017. Prolactin-RsaI gene polymorphism in East Anatolian Red cattle in Turkey. *South African Journal Of Animal Science*. Vol. 47 (2). P. 124–129. doi:10.4314/sajas.v47i2.3
124. Thuy N.T.D., Thu N.T., Cuong N.H., Ty L.V., Nguyen T.T.B., Khoa D.V.A. 2018. Polymorphism of PIT-1 and Prolactin Genes and Their Effects on Milk Yield in Holstein Frisian Dairy Cows Bred in Vietnam. *Russian Journal of Genetics*. Vol. 54 (3). P. 346–352. doi: 10.1134/S1022795418030146
125. Akyüz B., Çınar M.U. 2014. Analysis of Prolactin and Kappa-Casein Genes Polymorphism in Four Cattle Breeds in Turkey. *Annals of Animal Science*. Vol. 14 (4). P. 799–806. doi:10.2478/aoas-2014-0036
126. Boleckova J., Matejickova J., Stipkova M., Kyselova J., Barton L. 2012. The association of five polymorphisms with milk production traits in Czech Fleckvieh cattle. *Czech Journal of Animal Science*. Vol. 57 (2). P. 45–53. doi:10.17221/5131-CJAS
127. Lu A., Hu X., Chen H., Jiang J., Zhang C., Xu H., Gao X. 2010. Single nucleotide polymorphisms in bovine PRL gene and their associations with milk production traits in Chinese Holsteins. *Molecular Biology Reports*. Vol. 37 (1). P. 547–551. doi:10.1007/s11033-009-9762-5
128. Lacasse P., Ollier S., Lollivier V., Boutinaud M. 2016. New insights into the importance of prolactin in dairy ruminants. *Journal of dairy science*. Vol. 99 (1). P. 864–874. doi:10.3168/jds.2015-10035
129. Buttle H.L., Forsyth I.A. 1976. Placental lactogen in the cow. *Journal of Endocrinology*. Vol. 68(1). P. 141–146. doi:10.1677/joe.0.0680141.
130. Huang W., Mikhail D., Bindrim A.C., Khatib H. 2009. Interactions of the bovine placental lactogen and prolactin receptor genes are associated with fertility traits in cattle. *Animal*. Vol. 3(12). P. 1743–1745. doi:10.1017/s1751731109990826
131. Takahashi T., Hayashi K.-G., Hosoe M. 2013. Biology of the Placental Proteins in Domestic Ruminants: Expression, Proposed Roles and Practical Applications. *Japan Agricultural Research*. Vol. 47(1). P. 43–51. doi:10.6090/jarq.47.43

132. Schuler L.A., Kessler M.A. 1992. Bovine placental prolactin-related hormones. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Vol. 3(9). P. 334–338. doi:10.1016/1043-2760(92)90112-e
133. Rohenkohl M.M.W., Lopes M.G., Barbosa A.A., Krause A.R.T., Montagner P., Schwegler E., Corrêa M.N. 2017. Paraoxonase activity in the serum of peripartum dairy cows with different placental lactogen concentrations. *Semina: Ciências Agrárias*. Vol. 38(5). P. 3371–3376. doi:10.5433/1679-0359.2017v38n5p3371
134. Alvarez-Oxiley A.V., de Sousa M.N., Beckers J. 2008. Native and recombinant bovine placental lactogens. *Reproductive Biology*. Vol. 8 (2). P. 85–106.
135. Sibiak R., Jankowski M., Gutaj P., Mozdziak P., Kempisty B., Wender-Ożegowska E. 2020. Placental Lactogen as a Marker of Maternal Obesity, Diabetes, and Fetal Growth Abnormalities: Current Knowledge and Clinical Perspectives. *Journal of Clinical Medicine*. Vol.9(4). P. 1142. doi:10.3390/jcm9041142
136. Kessler M.A., Schuler L.A. 1991. Structure of the Bovine Placental Lactogen Gene and Alternative Splicing of Transcripts. *DNA and Cell Biology*. Vol. 10(2). P. 93–104. doi:10.1089/dna.1991.10.93
137. Zhang J., Sun D.X., Womack J.E., Wang Y.C., Yu Y., Liu R., Zhang Y. 2008. Polymorphism identification, RH mapping and association of placental lactogen gene with milk production traits of dairy cows. *Animal*. Vol. 3(01). P. 1–5. doi:10.1017/s1751731108003054
138. Mohammad M., Bagher M.T.M., Homayoun F., Arash O. 2014. Study of placental lactogen gene polymorphism and its association with milk production traits in the Holstein cows. *International journal of advanced biological and biomedical research*. Vol. 2 (3). P. 650–658.
139. Kulibaba R., Liashenko Y., Yurko P. 2019. Genetic structure features of cattle populations of Ukrainian selection by polymorphism of loci, associated with milk productivity traits. *Agricultural Science and Practice*. Vol. 6(3). P. 37–44. doi:10.15407/agrisp6.03.037

140. Barb C.R., Kraeling R.R. 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Animal Reproduction Science*. Vol. 82-83. P. 155-167. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.032
141. Domínguez-Mancera B., Barrientos-Morales M., Cervantes-Acosta P., Hernández-Beltrán A., Rodríguez-Andrade A., González-Ramírez R., Monjaraz E., Felix R. 2017. Leptin regulation of inward membrane currents, electrical activity and LH release in isolated bovine gonadotropes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 491 (1). P. 53-58. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.037
142. Daix M., Pirotte C., Bister J.L., Wergifosse F., Cuvelier C., Cabaraux J.F., Kirschvink N., Istasse L., Paquay R. 2008. Relationship between leptin content, metabolic hormones and fat deposition in three beef cattle breeds. *The Veterinary Journal*. Vol. 177 (2). P. 273-278. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.04.004
143. Wang L., Raza S.H.A., Gui L., Li S., Liu X., Yang X., Wang S., Zan L., Zhao C. 2020. Associations between UASMS2 polymorphism in leptin gene and growth, carcass and meat quality traits of cattle: a meta-analysis. *Animal Biotechnology*. P.1-10. doi: 10.1080/10495398.2020.1805327
144. Yang D., Chen H., Wang X., Tian Z., Tang L., Zhang Z., Lei C., Zhang L., Wang Y. 2007. Association of Polymorphisms of *Leptin* Gene with Body Weight and Body Sizes Indexes in Chinese Indigenous Cattle. *Journal of Genetics and Genomics*. Vol. 34 (5). P. 400-405. doi: 10.1016/S1673-8527(07)60043-5
145. G. da Silva R.C., Ferraz J.B.S., Meirelles F.V., Eler J.P., Balieiro J.C.C., Cucco D.C., Mattos E.C, Rezende F.M., Silva S.L. 2012. Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin and leptin receptor genes with growth and ultrasound carcass traits in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*. Vol. 11 (4). P. 3721-3728. doi: 10.4238/2012.August.17.10
146. Kaplan S. 2018. Characterization of Bubaline Leptin Gene Polymorphism in Anatolian Buffaloes By Using PCR-RFLP Method. *Alinteri Journal of Agriculture Science*. Vol. 33 (1). P. 93-97. doi:10.28955/alinterizbd.402760

147. Ferchichi M.A., Jemmali B., Amiri S., Gara A.B. 2018. Effect of leptin genetic polymorphism on lameness prevalence in Tunisian Holstein cows. *Archives Animal Breeding*. Vol. 61 (3). P. 305-310. doi:10.5194/aab-61-305-2018
148. Kulig H. 2005. Associations between leptin gene polymorphism and some milk performance traits of cattle. *Journal of Animal and Feed Sciences*. Vol. 14 (2). P. 235-243. doi: 10.22358/jafs/67009/2005
149. Maletić M., Paprikić N., Lazarević M., Hodžić A., Davidović V., Stanišić L., Stanimirović Z. 2019. Insight in Leptin Gene Polymorphism and Impact on Milk Traits in Autochthonous Busha Cattle. *Acta Veterinaria-Beograd*. Vol. 69 (2). P. 153-163. doi:10.2478/acve-2019-0012
150. Kulig H., Kmiec M., Wojdak-Maksymiec K. 2010. Associations between Leptin Gene Polymorphisms and Somatic Cell Count in Milk of Jersey Cows. *Acta Veterinaria Brno*. Vol. 79 (2). P. 237-242. doi:10.2754/avb201079020237
151. Kiyici J.M., Akyüz B., Kaliber M., Arslan K., Aksel E.G., Çınar M.U. 2020. LEP and SCD polymorphisms are associated with milk somatic cell count, electrical conductivity and pH values in Holstein cows. *Animal Biotechnology*. Vol. 31 (6). P. 498-503. doi: 10.1080/10495398.2019.1628767
152. Liefers S.C., Pas M.F.W., Veerkamp R.F., Chilliard Y., Delavaud C., Gerritsen R., van der Lende T. 2003. Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. *Mammalian Genome*. Vol. 14. P. 657–663. doi:10.1007/s00335-003-2275-y
153. Yazdani H., Rahmani H.R., Edris M.A., Dirandeh E. 2010. Association between A59V polymorphism in exon 3 of leptin gene and reproduction traits in cows of Iranian Holstein. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9 (36). P. 5997-6000. doi:10.5897/AJB10.126
154. Mandefro A., Sisay T., Kim K.-S., Edea Z., Konwarh R., Dadi H. 2021. Single nucleotide polymorphisms of leptin gene in five Ethiopian indigenous cattle breeds and the Korean Hanwoo breed. *Tropical Animal Health and Production*. Vol. 53(2). doi:10.1007/s11250-021-02642-1

155. El-Debaky H., Mahmoud K.Gh.M., Abd El-Razik K.A., Sosa A.S.A.; Kandil M.M.M., Ahmed Y.F. 2020. PCR-SSCP and Sequencing Analysis For Studying Leptin Gene Polymorphism and Its Association with Reproductive Status of Egyptian Buffalo. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*. Vol. 51 (1). P. 11-21. doi: 10.21608/EJVS.2019.16438.1094
156. Postel-Vinay M., Finidori J. 1995. Growth hormone receptor: structure and signal transduction. *European Journal of Endocrinology*. Vol. 133. P. 654–659.
157. Dehkhoda F., Lee C.M.M., Medina J., Brooks A.J. 2018. The Growth Hormone Receptor: Mechanism of Receptor Activation, Cell Signaling, and Physiological Aspects. *Front. Endocrinol.* Vol. 9 (35). doi:10.3389/fendo.2018.00035
158. Brooks A.J., Waters M.J. 2010. The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nature Reviews Endocrinology*. Vol. 6. P. 515–525.
159. Zhang R.A., Palmieri D.A., Sugisawa L., Ferraz A.L.J., de Oliveira H.N., Furlan L.R., Lopes, C.R. 2006. Effects of GHR gene polymorphisms on growth and carcass traits in Zebu and crossbred beef cattle. *Livestock Science*. Vol. 101(1-3). P. 94–100. doi:10.1016/j.livprodsci.2005.09
160. Maskur R., Arman C. 2014. Association of a Novel Single Nucleotide Polymorphism in Growth Hormone Receptor Gene with Production Traits in Bali Cattle. *Italian Journal of Animal Science*. Vol. 13(4). P. 841–845. doi:10.4081/ijas.2014.3461
161. Fedota O.M., Lysenko N.G., Ruban S.Y., Kolisnyk O.I., Goraychuk I.V. 2017. The effects of polymorphisms in growth hormone and growth hormone receptor genes on production and reproduction traits in Aberdeen-Angus cattle (*Bos taurus* L., 1758). *Cytology and Genetics*. Vol. 51(5). P. 352–360. doi:10.3103/s0095452717050024
162. Rahbar R., Rahimi G., Ansari Pirsaraei Z., Gholizadeh M. 2010. Identification of polymorphism in promoter region of growth hormone receptor (GHR) gene and its association with milk related traits in Holstein cows. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9(33). P. 5460–5464.

163. Olenski K., Suchocki T., Kaminski S. 2010. Inconsistency of associations between growth hormone receptor gene polymorphism and milk performance traits in Polish Holstein-Friesian cows and bulls. *Animal Science Papers and Reports*. Vol. 28 (3). P. 229–234.
164. El-Komy S.M., Saleh A.A., Abdel-Hamid T.M., El-Magd M.A. 2020. Association of GHR Polymorphisms with Milk Production in Buffaloes. *Animals*. Vol. 10(7). 1203. doi:10.3390/ani10071203
165. Hadi Z., Atashi H., Dadpasand M., Derakhshandeh A., Ghahramani Seno M.M. 2015. The relationship between growth hormone polymorphism and growth hormone receptor genes with milk yield and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Iran J Vet Res*. Vol. 16 (3). P. 244–248.
166. Ogorevc J., Kunej T., Razpet A., Dovc P. 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*. Vol. 40 (6). P. 832–851. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x
167. Rahmatalla S.A., Müller U., Strucken E.M., Reissmann M., Brockmann G.A. 2011. The F279Y polymorphism of the GHR gene and its relation to milk production and somatic cell score in German Holstein dairy cattle. *Journal of Applied Genetics*. Vol. 52 (4). P. 459–465. doi:10.1007/s13353-011-0051-3
168. Waters S.M., McCabe M.S., Howard D.J., Giblin L., Magee D.A., MacHugh D.E., Berry D.P. 2011. Associations between newly discovered polymorphisms in the Bos taurus growth hormone receptor gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle. *Animal Genetics*. Vol. 42(1). P. 39–49. doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02087.x.
169. Viale E., Tiezzi F., Maretto F., De Marchi M., Penasa M., Cassandro M. 2017. Association of candidate gene polymorphisms with milk technological traits, yield, composition, and somatic cell score in Italian Holstein-Friesian sires. *Journal of Dairy Science*. Vol. 100 (9). P. 7271–7281. doi:10.3168/jds.2017-12666.
170. Komisarek J., Dorynek. 2003. Polymorphism of BTN and GHR genes and its impact on bulls' breeding value for milk production traits. *Journal of Animal and Feed Sciences*. Vol. 12. P. 681–688.

171. Viitala S. 2006. The Role of the Bovine Growth Hormone Receptor and Prolactin Receptor Genes in Milk, Fat and Protein Production in Finnish Ayrshire Dairy Cattle. *Genetics*. Vol. 173(4). P. 2151–2164. doi:10.1534/genetics.105.046730
172. Hradecká E., Čítek J., Panicke L., Řehout V., Hanusová L. 2008. The relation of GH1, GHR and DGAT1 polymorphisms with estimated breeding values for milk production traits of German Holstein sires. *Czech Journal of Animal Science*. Vol. 53 (6). P. 238–246. doi:10.17221/362-cjas
173. Nelson Chau B., Chen T., Wan Y.Y., DeGregori J., Wang J.Y.J. 2004. Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis Requires p73 and c-ABL Activation Downstream of RB Degradation. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 24 (10). P. 4438–4447. doi:10.1128/MCB.24.10.4438–4447.2004
174. Yuan K., Farney J. K., Mamedova L. K., Sordillo L. M., Bradford B. J. 2013. TNF α altered inflammatory responses, impaired health and productivity, but did not affect glucose or lipid metabolism in early-lactation dairy cows. *PLoS One*. Vol. 8 (11). P. e80316. doi: 10.1371/journal.pone.0080316
175. El-Tahan R.R., Ghoneim A.M., El-Mashad N. 2016. TNF- α gene polymorphisms and expression. *Springerplus*. Vol. 5:1508. P. 1–7. doi:10.1186/s40064-016-3197-y
176. Cheng Y., Huang C.S., Tsai H.-J. 2016. Relationship of bovine TNF- α gene polymorphisms with the risk of bovine tuberculosis in Holstein cattle. *Journal of Veterinary Medical Sciences*. Vol. 78 (5). P. 727–732. doi: 10.1292/jvms.15-0506
177. Крыцына Т.И., Кочнев Н.Н., Юдин Н.С. 2017. Генетическое разнообразие крупного рогатого скота по комплексу генотипов локусов TNF- α и TNFR1. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. Том 47. № 2. С. 66–73.
178. Muhaghegh-Dolatabady M., Rezaei A.R. 2018. Sequence Characterization in 3'-Flanking Region of Bovine TNF- α : Association with Milk Production Traits and Somatic Cell Score in Holstein Cattle of Iran. *Iranian Journal of Biotechnology*. Vol. 16(1). P. 81-84. doi:10.21859/ijb.1195
179. Sattar H., Firyal S., Awan A.R., Rehman H.-U., Hasni M.S., Aqib A.I. 2019. Genetic Association of Bovine TNF- α Gene Polymorphism with Clinical and

Sub-clinical Mastitis in Sahiwal Cows. *Pakistan Journal of Zoology*. Vol. 15 (6). P. 1–4. doi: 10.17582/journal.pjz/2019.51.6.sc2.

180. Konnai S., Usui T., Ikeda M., Kohara J., Hirata T., Okada K., Ohashi K., Onuma M. 2006. Tumor necrosis factor- α genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes Infect.* Vol. 8 (8). P. 2163–2171. doi:10.1016/j.micinf.2006.04.017

181. Kushibiki S. 2011. Tumor necrosis factor- α -induced inflammatory responses in cattle. *Animal Science Journal*. Vol. 82 (4). P. 504–511. doi:10.1111/j.1740-0929.2011.00931.x

182. Wojdak-Maksymiec K., Szyda J., Strabel T. 2013. Parity-dependent association between TNF- α and LTF gene polymorphisms and clinical mastitis in dairy cattle. *BMC Veterinary Research*. Vol. 9. P. 114. doi:10.1186/1746-6148-9-114

183. Lendez P.A., Passucci J.A., Poli M.A., Gutierrez S. E., Dolcini G.L., Ceriani M.C. 2015. Association of TNF-[α] gene promoter region polymorphisms in bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle with different proviral loads. *Archives of Virology*. Vol. 160 (8). doi: 10.1007/s00705-015-2448-5

184. Bojarojc-Nosowicz B., Kaczmarczyk E., Jastrzebska A. 2018. Relationship between polymorphism in the tumour necrosis factor- α gene and selected indices and cell subpopulations in naturally bovine leukaemia virus-infected and healthy cows. *Veterinarni Medicina*. Vol. 63 (3). P. 101–109. doi.: 10.17221/135/2017-VETMED

185. Stachura A., Bojarojć-Nosowicz B., Kaczmarczyk D., Kaczmarczyk E. 2019. Polymorphisms in the bovine tumour necrosis factor receptor type two gene (TNF-RII) and cell subpopulations naturally infected with bovine leukaemia virus. *Journal of Veterinary Research*. Vol. 63. P. 175–182. doi:10.2478/jvetres-2019-0032

186. Yudin N.S., Aitnazarov R.B., Voevoda M.I., Gerlinskaya L.A., Moshkin M.P. 2013. 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*. Vol. 26 (10). P. 1379–1387. doi: 10.5713/ajas.2013.13114

187. Bojarojć-Nosowicz B., Brym P., Kaczmarczyk E., Stachura A., Habel A.K. 2016. 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). *Veterinárni Medicina*. Vol. 61 (01). P. 1–9. doi:10.17221/8676-VETMED
188. Kawasaki Y., Aoki Y., Magata F., Miyamoto A., Kawashima C., Hojo T., Okuda K., Shirasuna K., Shimizu T. 2014. The effect of single nucleotide polymorphisms in the tumor necrosis factor- α gene on reproductive performance and immune function in dairy cattle. *Journal of Reproduction Development*. Vol. 60 (3). P. 173–178. doi:10.1262/jrd.2013-140
189. Francetic T., Li Q. 2011. Skeletal myogenesis and Myf5 activation. *Transcription*. Vol. 2(3). P. 109–114. doi:10.4161/trns.2.3.15829
190. Kopantseva E.E., Belyavsky A.V. 2016. Key regulators of skeletal myogenesis. *Molecular Biology*. Vol. 50(2). P. 169–192. doi:10.1134/s0026893316010076
191. Maak S., Neumann K., Swalve H.H. 2006. Identification and analysis of putative regulatory sequences for the *MYF5/MYF6* locus in different vertebrate species. *Gene*. Vol. 379 (1). P. 141–147. doi:10.1016/j.gene.2006.05.007
192. Nasr S.M., Ateya A.I., Sadek K.M., Radwan H.A. 2016. *TaqI* Polymorphism in *MYF5* Gene and its Association with Body Weight in Friesian Bull Calves. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. Vol. 11 (7). P. 429–433. doi: 10.3923/ajava.2016.429.433
193. Saputra E.A., Ulu M.F., Jakaria J. 2020. Association of SNP g.643G>A of MYF5 gene polymorphism with body weight and body measurements in Bali cattle. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. Vol. 45 (1). P.1–6. doi: 10.14710/jitaa.45.1.1-6
194. Robakowska-Hyzorek D., Oprzadek J., Zelazowska B., Olbromski R., Zwierzchowski L. 2010. Effect of the g.-723G→T Polymorphism in the Bovine Myogenic Factor 5 (*Myf5*) Gene Promoter Region on Gene Transcript Level in the

Longissimus Dorsi Muscle and on Meat Traits of Polish Holstein-Friesian Cattle. *Biochem Genet.* Vol. 48 (5-6). P. 450–464. doi: 10.1007/s10528-009-9328-1

195. Fadhil M., Zülkadir U. 2020. Association between polymorphisms of Myf5, MSTN and CAST genes and fattening performance in Brown Swiss and Holstein cattle breeds. *Animal Biotechnology.* Vol. 32 (1). P. 121–129. doi:10.1080/10495398.2020.1781148.

196. Chung E.R., Kim W.T. 2005. Association of SNP marker in *IGF-I* and *MYF5* candidate genes with growth traits in Korean cattle. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences.* Vol. 18 (8). P. 1061–1065. doi:10.5713/ajas.2005.1061.

197. Ujan J.A., Zan L.S., Wang H.B., Ujan S.A. 2011. The Effect of Myogenic Factor 5 Polymorphism on the Meat Quality in Chinese Bos Taurus. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS).* Vol. 76 (4). P. 373–377.

198. Ujan J.A., Zan L.S., Ujan S.A., Wang H.B. 2011. Association between polymorphism of MyF-5 gene with meat quality traits in indigenous Chinese cattle breeds. *International Conference on Asia Agriculture and Animal IPCBEE.* Vol. 13. P. 50–55.

199. Li C., Basarab J., Snelling W.M., Benkel B., Murdoch B., Hansen C., Moore S.S. 2004. Assessment of positional candidate genes *MYF5* and *IGF1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos Taurus*. *Journal of Animal Science.* Vol. 82 (1). P. 1–7. doi:10.2527/2004.8211

200. Zhang R.F., Chen H., Lei C.Z., Zhang C.L., Lan X.Y., Zhang Y.D., Zhang H.J., Bao B., Niu H., Wang X.Z. 2007. Association between Polymorphisms of MSTN and MYF5 Genes and Growth Traits in Three Chinese Cattle Breeds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* Vol. 20 (12). P. 1798–1804. doi:10.5713/ajas.2007.1798

201. Kišacová J., Kúbek A., Meluš V., Čanakyová Z., Řehout V. 2009. Genetic polymorphism of Myf-5 and Myostatin in Charolais breed. *Journal of Agrobiology.* Vol. 26 (1). P. 7–11.

202. Kiyici J.M., Arslan K., Akyuz B., Kaliber M., Aksel E.G., Çınar M.U. 2018. Relationships between polymorphisms of growth hormone, leptin and myogenic

factor 5 genes with some milk yield traits in Holstein dairy cows. *International Journal of Dairy Technology*. Vol. 70 (1). P. 1–7. doi:10.1111/1471-0307.12539

203. Kiyici J.M., Akyüz B., Kaliber M., Arslan K., Aksel E.G., Cinar M.U. 2020. Association of GH, STAT5A, MYF5 gene polymorphisms with milk somatic cell count, EC and pH levels of Holstein dairy cattle. *Animal Biotechnology*. P. 1–7. doi:10.1080/10495398.2020.1800483.

204. Haegeman A., Van Zeveren A., Peelman L.J. 2000. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. *Animal Genetics*. Vol. 31. P. 79. <http://doi:10.1111/j.1365-2052.2000.579-14.x>

205. Ranjan S., Bhushan B., Panigrahi M., Kumar A., Deb R., Kumar P., Sharma D. 2015. Association and Expression Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms of Partial Tumor Necrosis Factor Alpha Gene with Mastitis in Crossbred Cattle. *Animal Biotechnology*. Vol. 26 (2). P. 98–104. DOI: 10.1080/10495398.2014.929582

206. Меркурьева Е. К. Генетические основы селекции в скотоводстве. Москва: Колос, 1977. 240 с.

207. Hamilton M. B. Population genetics. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. 424 p.

208. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: «МедиаСфера», 2002. 312 с.

209. Кулібаба Р.О., Альшамайлех Х.С. Аналіз поліморфізму ДНК за використання SSCP-маркерів. Всеукраїнська науково-практична інтернет конференція присвячена 100-річчю факультету технологій продукції тваринництва та менеджменту «Актуальні питання технологій тваринництва та ветеринарної медицини», м. Харків, 2020 р.: тези доповіді. Харків: ХДЗВА, 2020. С. 6–10.

210. Альшамайлех Х., Кулібаба Р.О. Генетична структура популяції корів української чорно-рябої молочної породи за локусами пролактину та плацентарного лактогена. *Таврійський науковий вісник*. 2019. № 109 (2). С. 3–8.

211. Альшамайлах Х.С., Кулібаба Р.О., Ляшенко Ю.В., Борзова Г.С. 2021. Поліморфізм генів рецептора гормону росту та міогенного фактору 5 в популяціях корів молочних порід. *Науково-технічний бюлетень ІТ НААН*. № 125. С. 69–78.

212. Kulibaba R., Liashenko Y., Yurko P., Sakhatskyi M., Osadcha Y., Alshamaileh H. Polymorphism of LEP and TNF- α Genes in the Dairy Cattle Populations of Ukrainian Selection. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*. 2021. Vol. 34(1). P. 180–191. doi:10.37077/25200860.2021.34.1.16

213. Альшамайлах Х.С. Поліморфізм локусу TNF- α у популяції корів української чорно-рябої молочної породи. 75 Всеукраїнська науково-практична конференція «Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми», м. Київ, 25-26 березня 2021 р.: тези доповіді. Київ: НУБіП України, 2021. С. 96–98.

214. Альшамайлах Х.С., Кулібаба Р.О. Генетична структура популяції корів української чорно-рябої породи за локусами кількісних ознак. XV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Науковий прогрес в тваринництві та птахівництві», м. Харків, 26-27 серпня 2021 р.: тези доповіді. Харків: Інститут тваринництва НААН, 2021. С. 33–36.

215. Альшамайлах Х.С. Питання щодо перспективи використання MAS у селекційній роботі з локальними породами великої рогатої худоби України XIV. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві», м. Харків, 16-17 вересня 2020 р.: тези доповіді. Харків: Інститут тваринництва НААН, 2020. С. 20–23.

216. Альшамайлах Х., Кулібаба Р.О., Ляшенко Ю.В. Аналіз особливостей генетичної структури різних популяцій корів української чорно-рябої молочної породи за поліморфізмом локусів кількісних ознак. *Таврійський науковий вісник*. 2021. № 119. С. 152–159.

217. Кулибаба Р.А., Альшамайлах Х., Ляшенко Ю.В., Онищенко А.В. К вопросу о сравнении генетической структуры различных популяций крупного рогатого скота по локусам количественных признаков. *Актуальные проблемы*

интенсивного развития животноводства: материалы XXIV Международной научно-практической конференции. Горки, 2021. С. 54–58.

218. Кулібаба Р.О., Альшамайлех Х.С. Дослідження поліморфізму функціональних генів – невід’ємна складова загальної стратегії MAS. Міжнародна науково-практична конференція «Наукові і технологічні виклики тваринництва у XXI столітті», присвячена 90-річчю від дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора, академіка УААН і РААН Г.О. Богданова, м. Київ, 12-14 березня 2020 р.: тези доповіді. Київ: НУБіП України, 2020. С. 61–64.

219. Альшамайлех Х.С., Кулібаба Р.О. Продуктивні якості корів молочних порід з різними генотипами за локусами пролактину та рецептору гормону росту. Всеукраїнська науково-практична конференція «Сучасна наука: стан та перспективи розвитку тваринництва України в умовах Євроінтеграції», м. Херсон, 23 вересня 2021р.: тези доповіді. Херсон: ХДАУ, 2021. С. 4–8.

220. Fleming A., Abdalla E.A., Maltecca c., Baes C.F. 2018. Invited review: Reproductive and genomic technologies to optimize breeding strategies for genetic progress in dairy cattle. *Arch. Anim. Breed.* Vol. 61. P. 43–57.

221. Brym P., Kaminski S., Wojcik E. 2005. Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits. *J. Appl. Genet.* Vol. 45. P. 179–185.

222. Somnez Z., Ozdemir M. 2017. Prolactin-RsaI gene polymorphism in East Anatolian Red cattle in Turkey. *S. Afr. J. Anim. Sci.* Vol. 47 (2). P. 124–129.

223. Dybus A., 2002. Associations of growth hormone (GH) and prolactin (Prl) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black-and-White cattle. *Anim. Sci.* Vol. 20. P. 203–212.

224. Miceikiene I., Peciulaitiene N., Baltrenaite I., Skinkyte R., Indriulyte R. 2006. Association of cattle genetic markers with performance traits. *Biologija.* Vol. 1. P. 24–29.

225. Chung E.R., Rhim T.J., Han S.K. 1996. Associations between PCR-RFLP markers of growth hormone and prolactin genes and production traits in dairy cattle. *Korean J Anim Sci.* Vol. 38. P. 321–36.
226. Skinkyte R., Zwierzchowski L., Riaubaite L., Baltrenaite L., Miceikiene I. 2005. Distribution of allele frequencies important to milk production traits in Lithuanian black & white and Lithuanian red cattle. *Veterinarija ir zootechnika.* T. 31 (53). P. 93–97.
227. Aggrey S.E., Yao J., Sabour M.P., Lin C.Y., Zadworny D., Hayes J.F., Kuhnlein U. 1999. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holstein. *J. Hered.* Vol. 90. P. 148–151.
228. Clempson A.M., Pollott G.E., Brickell J.S., Bourne N.E., Munce N., Wathes D.C. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2011. Vol. 94(7). P. 3618–3628. doi:10.3168/jds.2010-3626
229. Abbas N., Suleman M., Zahur A.B., Ghafoor A., Rashid F., Jan A.U., Akbar F., Ali S., Aziz A., Islam Z., Shah A. Molecular Analysis of Leptin Gene Polymorphism in Achai, Sahiwal Cattle and Nili-ravi Buffalo Breeds of Pakistan. *International Journal of Genetics and Genomics.* 2019. Vol. 7(3). P. 75–79. doi:10.11648/j.ijgg.20190703.17
230. Çınar M.U., Akyüz B., Metin Kılıyıcı J., Arslan K., Kaliber M., Aksel E.G. 2018. Effects of GH-AluI and MYF5-TaqI polymorphisms on weaning weight and body measurements in Holstein young bulls. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 24 (6). P. 873–880. DOI: 10.9775/kvfd.2018.20193
231. Sahin C., Akyuz B. 2017. Detection of MYF5 gene polymorphism with PCR RFLP method in five cattle breeds breeding in Turkey. *Mediterr Agric Sci.* Vol. 30. P. 35–38.

ДОДАТКИ

Додаток А

ЗАТВЕРДЖУЮ:
В.о. ректора Харківської державної
зооветеринарної академії,
канд. вет. наук, доцент
Боровков С.Б.
20 р.

АКТ

Про впровадження результатів
дисертаційної роботи
у навчальний процес

Даним актом підтверджується, що результати наукових досліджень аспіранта кафедри біології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування Альшамайлеха Хамзи Самі, що викладено у дисертаційній роботі на тему «Обґрунтування критеріїв відбору із застосуванням маркер-асоційованої селекції в молочному скотарстві» на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 204 – технологія виробництва і переробки продукції тваринництва, впроваджено у навчальний процес Харківської державної зооветеринарної академії.

Викладені у роботі положення та наукові дані використовуються при викладанні дисциплін «Основи молекулярної біотехнології та генної інженерії», «Молекулярно-генетичні методи діагностики» студентам кафедри біотехнології ім. академіка Ф.І. Осташка факультету біотехнології та природокористування Харківської державної зооветеринарної академії.

Довідка видана для подання у спеціалізовану вчену раду за місцем захисту дисертації на здобуття вченого звання доктора філософії.

Доцент кафедри біотехнології
ім. академіка Ф.І. Осташка,
канд. вет. наук



П.С. Юрко

ЗАТВЕРДЖУЮ:
В.о. ректора Харківської державної
зооветеринарної академії,
канд. вет. наук, доцент
Боровков С.Б.
» 20 р.

АКТ

впровадження наукових досліджень та розробок

Тема наукової розробки. Типування особин великої рогатої худоби української чорно-рябої молочної породи за комплексом локусів кількісних ознак.

Мета наукового впровадження. Комплексне вивчення селекційно-генетичних аспектів формування особливостей генетичної структури популяції корів української чорно-рябої молочної породи за локусами пролактину (*PRL*), плацентарного лактогену (*PL*), бета-казеїну (*CSN2*) та лептину (*LEP*), алельні варіанти яких пов'язані з параметрами молочної продуктивності тварин.

Коротка характеристика впровадження. Отримані автором наукових досліджень генетико-популяційні параметри дослідної групи корів української чорно-рябої молочної породи за сукупністю локусів кількісних ознак використовуються для формування експериментальних груп тварин, що характеризуються певними бажаними генотипами за виявленими поліморфними локусами. Результати наукових досліджень можуть бути використані в якості підґрунтя перспективних селекційних програм, що дозволить підвищити рівень реалізації продуктивного потенціалу піддослідних тварин.

Доцент кафедри біотехнології ім. акад. Ф.І. Осташко
Харківської державної зооветеринарної академії,
канд. вет. наук.

П.С. Юрко

Професор кафедри біології тварин
Національного університету біоресурсів
і природокористування України,
доктор с.-г. наук, с.н.с.

Р.О. Кулібаба

Аспірант кафедри біології тварин
Національного університету біоресурсів
і природокористування України

Х.С. Альшамайлех

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Альшамайлех Х., Кулібаба Р.О. Генетична структура популяції корів української чорно-рябої молочної породи за локусами пролактину та плацентарного лактогена. *Таврійський науковий вісник*. 2019. № 109 (2). С. 3–8. (Дисертант провів дослідження і аналіз даних, біометричну обробку, підготував статтю до друку).

2. Альшамайлех Х.С., Кулібаба Р.О., Ляшенко Ю.В., Борзова Г.С. 2021. Поліморфізм генів рецептора гормону росту та міогенного фактору 5 в популяціях корів молочних порід. *Науково-технічний бюлетень ІТ НААН*. № 125. С. 69–78. (Здобувач брав участь у відборі дослідного матеріалу, інтерпретації та описі отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку).

3. Альшамайлех Х., Кулібаба Р.О., Ляшенко Ю.В. Аналіз особливостей генетичної структури різних популяцій корів української чорно-рябої молочної породи за поліморфізмом локусів кількісних ознак. *Таврійський науковий вісник*. 2021. № 119. С. 152–159. (Здобувачем здійснено проведення експериментів, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, аналіз результатів).

4. Альшамайлех Х.С., Ляшенко Ю.В., Кулібаба Р.О. Параметри продуктивності корів молочних порід з різними генотипами за локусами *TNF-α* та *MYF5*. *Науково-технічний бюлетень ІТ НААН*. 2022. №127. С. 69–79. (Здобувач брав участь у відборі дослідного матеріалу, проведенні досліджень, описі отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку).

**Стаття у періодичному науковому виданні, що індексується у
наукометричній базі SCOPUS**

5. Kulibaba R., Liashenko Y., Yurko P., Sakhatskyi M., Osadcha Y., **Alshamaileh H.** Polymorphism of LEP and TNF- α Genes in the Dairy Cattle Populations of Ukrainian Selection. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*. 2021. Vol. 34(1). P. 180–191. doi:10.37077/25200860.2021.34.1.16 (*Дисертант провів частину досліджень, аналіз отриманих даних, підготував статтю*).

Додатково відображають наукові результати дисертації

6. 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. (Здобувачем проведено частку експериментальних досліджень, викладення частини основного змісту, аналіз результатів).

Тези наукових доповідей

7. **Альшамайлех Х.С.** Питання щодо перспективи використання MAS у селекційній роботі з локальними породами великої рогатої худоби України XIV. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві», м. Харків, 16-17 вересня 2020 р.: тези доповіді. Харків: Інститут тваринництва НААН, 2020. С. 20–23.

8. Кулібаба Р.О., **Альшамайлех Х.С.** Дослідження поліморфізму функціональних генів — невід’ємна складова загальної стратегії MAS. Міжнародна науково-практична конференція «Наукові і технологічні виклики тваринництва у XXI столітті», присвячена 90-річчю від дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора, академіка УААН і РААН Г.О. Богданова, м. Київ, 12-14 березня 2020 р.: тези доповіді. Київ: НУБіП України,

2020. С. 61–64. *(Дисертант провів частину досліджень і аналіз даних, підготував статтю до друку).*

9. Кулібаба Р.О., **Альшамайлех Х.С.** Аналіз поліморфізму ДНК за використання SSCP-маркерів. Всеукраїнська науково-практична інтернет конференція присвячена 100-річчю факультету технологій продукції тваринництва та менеджменту «Актуальні питання технологій тваринництва та ветеринарної медицини», м. Харків, 2020 р.: тези доповіді. Харків: ХДЗВА, 2020. С. 6–10. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, викладення частини основного змісту, аналіз результатів).*

10. **Альшамайлех Х.С.** Поліморфізм локусу TNF- α у популяції корів української чорно-рябої молочної породи. 75 Всеукраїнська науково-практична конференція «Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище – виробництво продукції – екологічні проблеми», м. Київ, 25-26 березня 2021 р.: тези доповіді. Київ: НУБіП України, 2021. С. 96–98.

11. **Альшамайлех Х.С.,** Кулібаба Р.О. Генетична структура популяції корів української чорно-рябої породи за локусами кількісних ознак. XV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Науковий прогрес в тваринництві та птахівництві», м. Харків, 26-27 серпня 2021 р.: тези доповіді. Харків: Інститут тваринництва НААН, 2021. С. 33–36. *(Здобувачем здійснено проведення частини експериментів, аналіз результатів, сформульовано висновки).*

12. **Альшамайлех Х.С.,** Кулібаба Р.О. Продуктивні якості корів молочних порід з різними генотипами за локусами пролактину та рецептору гормону росту. Всеукраїнська науково-практична конференція «Сучасна наука: стан та перспективи розвитку тваринництва України в умовах Євроінтеграції», м. Херсон, 23 вересня 2021р.: тези доповіді. Херсон: ХДАУ, 2021. С. 4–8. *(Здобувачем здійснено проведення експериментів, біометричну обробку, викладення частини основного змісту, сформульовано висновки).*

13. Кулибаба Р.А., **Альшамайлех Х.,** Ляшенко Ю.В., Онищенко А.В. К вопросу о сравнении генетической структуры различных популяций крупного

рогатого скота по локусам количественных признаков. *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: материалы XXIV Международной научно-практической конференции*. Горки, 2021. С. 54–58. (Здобувач брав участь у відборі дослідного матеріалу, інтерпретації та описі отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку).