



DOI 10.32900/2312-8402-2023-129-103-114

УДК 575.113:63.27.082(477)

ВИКОРИСТАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦІЙНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ДЛЯ ОЦІНКИ СЕЛЕКЦІЙНОЇ РОБОТИ У ПОПУЛЯЦІЯХ КОРІВ МОЛОЧНИХ ПОРІД

Кулібаба Р. О., д. с.-г. н., с. н. с., <https://orcid.org/0000-0003-1776-7147>
Національний університет біоресурсів і природокористування України
Ляшенко Ю. В., к. с.-г. н., с. н. с., <https://orcid.org/0000-0003-2747-476X>
Інститут тваринництва НААН
Сахацький М. І., д. б. н., проф., академік НААН України,
<https://orcid.org/0000-0002-6113-0226>
Національний університет біоресурсів і природокористування України

У статті наведені результати комплексних досліджень, які є продовженням роботи, спрямованої на визначення поліморфізму локусів *CSN2*, *PRL*, *LEP* та *TNF- α* , а також на аналіз показників продуктивності особин великої рогатої худоби молочного напрямку продуктивності з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами. Мета роботи – провести аналіз селекційної роботи з популяціями корів молочних порід на основі результатів типування особин за алельними варіантами локусів *CSN2*, *PRL*, *LEP* та *TNF- α* , які пов'язані з проявом господарсько корисних ознак, але безпосередньо не враховуються традиційними методами оцінки за фенотипом. Для аналізу використовували показники фактичної (H_o) та очікуваної (H_e) гетерозиготності, індекс фіксації Райта (F_{is}). Індивідуальне типування тварин проводили за використання методів *AS-PCR* (*CSN2*), *SSCP* (*TNF- α*) та *PCR-RFLP* (*PRL*, *LEP*). За результатами досліджень в популяції корів української чорно-рябої молочної породи виявлений ексцес гетерозиготних особин за локусами *CSN2* та *TNF- α* , та значне превалювання кількості гомозиготних особин за локусом *LEP*. Для генів пролактину (*PRL*) і лептину (*LEP*) показано зміщення генетичної рівноваги за рахунок зростання кількості гомозиготних особин. В популяції корів української червоно-рябої молочної породи за локусом пролактину встановлений високий рівень інбридингу (39 %), що знайшло своє відображення в порушенні стану генетичної рівноваги ($\chi^2 = 13,50$). У випадку з локусами бета-казеїну та лептину ситуація протилежна – наявний виражений ексцес гетерозиготних особин (-0,24 та -0,18 відповідно), але за відсутністю відхилень від рівноважного стану популяції (значення χ^2 склали 2,06 та 2,42 відповідно). Для обох популяцій показана відсутність суттєвих змін у співвідношенні різних алелів та генотипів за низкою досліджених локусів та доведена неможливість фіксації “бажаних” алелів при використанні традиційних методів селекційно-плеємної роботи з тваринами. За результатами порівняльного аналізу використання різних типів ДНК-маркерів та методів типування (*AS-PCR*, *SSCP* та *PCR-RFLP*) встановлена чутливість показників H_o , H_e та F_{is} до параметру кількості алелів на локус, що необхідно враховувати при проведенні генетико-популяційних досліджень.

Ключові слова: поліморфізм, популяція, корови, алель, генотип, гомозиготність, мінливість, фіксація.

Генетичні дослідження сільськогосподарських тварин зосереджені переважно на виявленні генів, які детермінують економічно важливі ознаки та можуть



бути використані в програмах розведення. У молочному скотарстві здебільшого досліджують гени, які можуть визначити відмінності у надоях та складі молока, стійкості до захворювань та підвищенні відтворювальної здатності тварин [1]. Найбільш ефективним на сьогоднішній день є метод геномної оцінки тварин, який базується на використанні генетичних маркерів, розташованих на різних хромосомах, та дозволяє враховувати спадкові особливості передачі генетичної інформації, що впливає на прояв основних господарсько-корисних ознак. Геномна оцінка в молочному скотарстві включає аналіз близько 80000 маркерів (SNP) на одну особину та стала обов'язковою для оцінки худоби в країнах з розвиненим тваринництвом. Однак зазначений метод поки що не знайшов практичного використання в племінних господарствах України. Наряду з цим, набуває статусу традиційних селекційно-племінних заходів використання порівняно менш затратна маркер-асоційована селекція (MAS) за локусами генів-маркерів кількісних ознак (QTL), яка доповнює та підвищує ефективність добору за фенотипом.

Слід зазначити, що традиційна селекція за багатьма економічно значимими ознаками ускладнюється їх низькою успадкованістю, необхідністю досягнення тварин відповідного віку для оцінки їх племінної цінності, застосування розширеної процедури генетичної оцінки за родоводом [2]. Тому впровадження маркер-орієнтованої селекції у тваринництво може забезпечити значний прогрес у селекційній роботі, що сприятиме покращенню економічної ефективності галузі загалом [3].

Застосування генетичних маркерів дає змогу передбачати племінну цінність за ознаками, які важко виміряти за фенотипним проявом, а, отже, які не є частиною критерію відбору. Основною метою нашої роботи було показати що відбувається з частотами алелів деяких важливих QTL, які безпосередньо впливають на рівень прояву господарсько корисних ознак, однак не мають вираженого фенотипного прояву (для їх визначення за фенотипом), а отже не враховуються традиційними методами селекційно-племінної роботи. В якості моделі для комплексної оцінки генетичної детермінації зазначених ознак нами були використані гени, задіяні у соматотропної та імунній системах організму. До їх переліку потрапили перспективні гени-кандидати, такі як ген пролактину (*PRL*), β -казеїну (*CSN2*), лептину (*LEP*) та фактору некрозу пухлин альфа (*TNF- α*).

Ген *PRL* (8902 п.н.) розташований в хромосомі 23 *B. taurus* і має у своєму складі 5 екзонів. Відомо про низку SNP в гені пролактину, зокрема транзицію C/T у положенні 35333764 (rs211032652), яку пов'язують з показниками молочної продуктивності [4].

Ген β -казеїну (*CSN2*) локалізований в 6 хромосомі ВРХ (1153 п.н.), має в своїй структурі 9 екзонів. Відомо близько 60 одонуклеотидних мутацій (SNP) в екзонній частині гену та 12 алельних варіантів *CSN2*, серед яких найбільш використовуваними в промисловому тваринництві є алелі A^1 і A^2 [5]. Мова йде про місенс мутацію C/A (rs:43703011) в 7 екзоні, яка призводить до зміни в кодоні CCT/CAT (пролін (A^2)/гістидин(A^1)).

Ген лептину (*LEP*) ВРХ (16731 п.н.) складається з 3 екзонів та 2 інтронів, розташований у 4 хромосомі та має близько 60 встановлених SNP [6]. *LEP* приймає участь у регуляції великої кількості різних функцій організму, в першу чергу жирового та енергетичного обміну, а також у регуляції активності імунної та репродуктивної систем [7]. Як правило, *LEP* розглядається в якості гену-кандидату в маркери м'ясних якостей великої рогатої худоби [8]. Однак у публікаціях різних авторів показано асоціативний зв'язок між різними алельними варіантами *LEP*



(екзон 3, A59V) та репродуктивними якостями [9], стійкістю до маститу у різних порід великої рогатої худоби [10, 11].

Ген фактору некрозу пухлин альфа (*TNF- α*), продукує багатофункціональний протизапальний цитокін, один з ключових медіаторів локальної імунної відповіді [12]. Ген *TNF- α* (2879 п.н.) розташований у 23 хромосомі в районі *BoLA*, містить 4 екзони та має близько 30 поліморфних ділянок. Показано наявність різних алельних варіантів за різними позиціями гену, їх зв'язок із показниками продуктивності великої рогатої худоби, а також асоціативний зв'язок зі стійкістю/чутливістю до різних захворювань, в тому числі до маститу [13] та лейкозу великої рогатої худоби [14].

Таким чином, виходячи зі всього вищенаведеного, мета нашої роботи – провести аналіз селекційної роботи з популяціями корів молочних порід української селекції на основі результатів типування особин за алельними варіантами локусів *CSN2*, *PRL*, *LEP* та *TNF- α* .

У статі наведені результати комплексних досліджень, які є органічним продовженням роботи, спрямованої на визначення поліморфізму локусів *CSN2*, *PRL*, *LEP* та *TNF- α* , а також на аналіз показників продуктивності особин ВРХ різних порід з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами. Відповідно, з більш детальною інформацією стосовно особливостей поліморфізму (електрофореграми, схеми рестрикції та інше) можна ознайомитися за посиланнями [15-18].

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведені у лабораторії молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН та в лабораторії молекулярно-генетичних досліджень кафедри біології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України.

В якості об'єкту досліджень використовували породи корів української селекції – українська чорно-ряба молочна порода (n=100) та українська червоно-ряба молочна порода (n=100) (ДП ДГ «Гонтарівка»).

У статті наведені результати комплексних досліджень, які є продовженням роботи, спрямованої на визначення поліморфізму генів *CSN2* (с.350 C>A, rs43703011), *PRL* (с.35333764 C>T, rs211032652), *LEP* (с.239C>T, rs29004508) та *TNF- α* (область 2 екзону та частини 1-2 інтронів, 239 п.н., 23 хромосома). Генотипування тварин за *CSN2* проводили за використання методу алель-специфічної ПЛР (AS-PCR), *TNF- α* – на основі аналізу одноланцюгового конформаційного поліморфізму (SSCP), *PRL* і *LEP* – методом ПЛР-ПДРФ (PCR-RFLP). З більш детальною інформацією стосовно особливостей поліморфізму зазначених генів (електрофореграми, схеми рестрикції та інше) можна ознайомитися за посиланнями [15-18].

Для оцінки селекційної роботи використовували аналіз співвідношення значень фактичної (H_o) та очікуваної (H_e) гетерозиготності за сукупністю різних поліморфних локусів, а також індекс фіксації Райта (F_{is}). Розрахунки параметрів проводили за результатами аналізу проведених раніше досліджень [15-18]. Дослідні показники визначали за використання програмного пакету GENALEX version 6.5 у середовищі Excel 2019 [19].

Інтерпретацію показників здійснювали за методикою Кузнецова В. М. [20]. У випадку відсутності відмінностей у значенні показників H_o та H_e наявний рівноважний стан популяції (панміксія) та, відповідно, відсутня селекційна робота з групою тварин. За умов $H_o < H_e$ у популяції спостерігається ексцес гомозиготних



особин (інбридинг, близькоспоріднене схрещування). За умов $N_o > N_e$ спостерігається ексцес гетерозиготних особин (аутбридинг, неспоріднене схрещування).

Результати досліджень. За результатами проведених досліджень встановлено, що локуси бета-казеїну, пролактину, лептину та фактору некрозу пухлини альфа є поліморфними в популяціях обох дослідних порід корів.

Коротко розглянемо результати досліджень у порівняльному аспекті в контексті загальних питань визначення особливостей генетико-популяційних параметрів популяцій великої рогатої худоби різних порід та регіонів світу.

За аallelними варіантами локусу бета-казеїну (*CSN2*) відмічена наявність всіх можливих генотипів в обох популяціях корів – A^1A^1 , A^1A^2 та A^2A^2 . Для популяції корів української червоно-рябої молочної породи виявлено превалювання частоти алелю A^2 (0,57), в той час як для української чорно-рябої молочної породи – навпаки (превалює алель A^1 , частота – 0,66). Відповідно й розподіл частот генотипів був різним. Отримані результати можна пояснити особливостями походження кожній із порід, в першу чергу, з часткою кровності голштинської породи в кожному випадку. Для голштинів, за умови відсутності спрямованої селекції за аallelними варіантами бета-казеїну, є характерним саме превалювання частоти алелю A^1 , в той час як локальні породи характеризуються високою частотою алелю A^2 , що може бути пов'язане з проведенням селекційної роботи, спрямованої на підвищення параметрів надою тварин [21]. Це спостереження підтверджується результатами порівняльного аналізу різних порід великої рогатої худоби, як комерційних, так і нативних, що проводяться в лабораторіях авторів (результати досліджень у друці). У будь-якому випадку, в дослідних популяціях корів достатньо особин для можливості проведення подальшої селекції в напрямку отримання молочної продукції певного типу (A_2 молока).

За *RsaI*-поліморфізмом четвертого екзону локусу пролактину визначено аallelні варіанти С та Т в кожній з дослідних популяцій. Для обох популяцій відмічено превалювання частоти алелю С над Т, що є найбільш вираженим у випадку з чорно-рябою молочною породою (0,87 проти 0,13). Отримані дані корелюють з результатами, що одержані на інших популяціях великої рогатої худоби (в першу чергу – комерційних порід). Так, превалювання частоти алелю С (*RsaI*-) відмічено в популяціях голштинських корів [22], турецьких породах ВРХ [23], російських чорно- та червоно-рябих порід [24] та інших. У той же час, більш згладжені відмінності між значеннями частот алелів локусу (як у червоно-рябої породи, 0,58 проти 0,42) та домінування частоти алелю *RsaI*+ є характерними для переважної кількості локальних порід ВРХ різних країн: польської чорно-рябої [25], литовських нативних порід [26], чеських комбінованих породах [27], пакистанських [28] та інших породах, а також для деяких комерційних порід [28]. На нашу думку, домінування частоти алелю С (*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 (монбільярдів, голштино-фриських та деяких локальних порід) [29, 30]. У наших дослідженнях також встановлено вищі значення надоїв для дослідних популяцій корів, але картина, що спостерігається у випадку з різними дослідними породами є цілком протилежною. Так, для корів української чорно-рябої породи доведено переваження значень показнику надою за 305 днів лактації для особин із генотипом СС. У той же час, для популяції корів червоно-рябої мо-



лочної 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 популяцій (вплив породної належності, особливостей походження та інше). Таким чином, ефект впливу генотипу на ознаку може бути суттєво скорегований та мати виражений породоспецифічний характер. Необхідно також зазначити, що ця мутація (rs211032652, C/T), хоч і знаходиться в екзонній частині гену *PRL*, є синонімічною і безпосередньо не змінює структуру білка. Відповідно, цей SNP є потенційним маркером, який може знаходитися в одній групі зчеплення з місенс-мутаціями *PRL*, і опосередковано впливати на показники молочної продуктивності. Порівняно з розглянутою мутацією в гені *CSN2*, алельні варіанти *PRL* більшою мірою пов'язані з рівнем прояву господарсько-корисних ознак та можуть змінювати частоти розподілу в популяціях ВРХ під впливом традиційних методів селекції.

Виявлення різних алельних варіантів гену лептину (*LEP*) за NphI-поліморфізмом у третьому екзоні дало змогу вперше в Україні та на пострадянському просторі виявити особливості генетичної структури популяцій корів молочних порід за мутацією A59V (rs29004508, c.239C>T). За результатами досліджень встановлено суттєве превалювання частоти алелю С в обох дослідних популяціях тварин (0,72 – 0,77). Слід зазначити, що в популяції чорно-рябої молочної породи також встановлено домінування алелю С у гомозиготному стані (генотип СС; 0,64). 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 [31, 32], що, на нашу думку, відображає загальний напрямок продуктивності тварин – підвищення показників надою. 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 використання розробленої методики проведення SSCP-аналізу досліджено поліморфізм фрагмента гену фактору некрозу пухлини альфа (2 екзон, 23 хромосома), розміром 239 п.н. 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 переваження 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. 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 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.



Дослідний фрагмент гену *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 [33]. 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.

Після короткого аналізу результатів досліджень генетичної структури, а також зв'язку виявлених поліморфних локусів з показниками продуктивності перейдемо до визначення можливості використання отриманих даних для аналізу ефективності проведення селекційної роботи з дослідними популяціями тварин.

На рис. 1 наведено значення показників фактичної гетерозиготності (H_o), очікуваної гетерозиготності (H_e) та індексу фіксації Райта (F_{is}) у популяції корів української чорно-рябої молочної породи.

Як слідує із представлених даних, співвідношення значень H_o та H_e у дослідній популяції корів були досить варіабельними за виявленими поліморфними локусами. Максимальне від'ємне значення індексу фіксації Райта є характерним для *TNF-α*, максимальне позитивне – для *LEP*. В той же час бета-казеїн також демонструє від'ємне значення індексу фіксації, що свідчить про деякий ексцес гетерозиготних особин, який, слід відмітити, не є вираженим (на що вказує відповідність дослідній популяції стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, $\chi^2 = 0,201$). У випадку з фактором некрозу пухлини альфа не відмічено відповідність рівноважному стану, що й призводить до досить екстремальних значень індексу фіксації (-0,47). Але, слід відмітити, що поліморфізм локусу *TNF-α* досліджували за використання маркерної системи SSCP, за результатами якої визначено три алеля для породи українська чорно-ряба молочна. В той же час, для інших локусів використовували маркерні системи AS-PCR та PCR-RFLP, що і дало можливість їх опису в якості класичних двохалельних систем.

За локусом лептину значення індексу фіксації досягають 0,23, що свідчить про істотний ексцес гомозиготних особин. При цьому, як це вже було відмічено, дослідна популяція корів демонструє відхилення від рівноважного стану ($\chi^2 = 4,97$) та суттєве переваження, майже трикратне, частоти одного з алелів (алелю С). Переважання гомозиготних за алелем С особин й призвело до збільшення інбредності дослідної популяції.

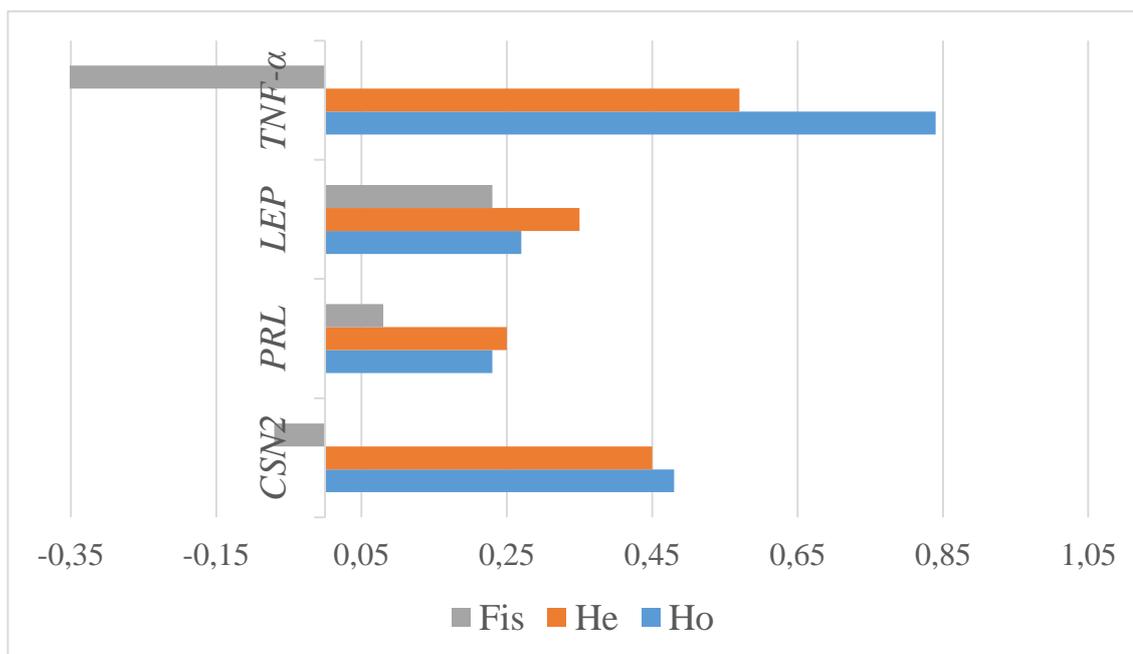


Рис. 1. Значення показників фактичної гетерозиготності (H_o), очікуваної гетерозиготності (H_e) та індексу фіксації Райта (F_{is}) у популяції корів української чорно-рябої молочної породи

У свою чергу, за локусом пролактину відмічене незначне переважання кількості гомозиготних особин ($F_{is} = 0,08$), що, при цьому, не призвело до порушення рівноважного стану для дослідної популяції тварин ($\chi^2 = 0,26$).

Таким чином, з чотирьох розглянутих нами локусів, алельні варіанти яких не використовувались в якості критеріїв добору в селекційній програмі з ВРХ чорно-рябої молочної породи, у двох (*PRL* і *LEP*) спостерігалось зміщення генетичної рівноваги в бік зростання кількості гомозиготних особин. Більшою мірою це стосується локусу лептину за рахунок добору особин з генотипом *LEP^{CC}* (0,64) і, відповідно, зменшенню частоти мутантного (*A59V*, rs29004508, с.239C>T) алелю Т (0,23). За локусом пролактину мала місце тенденція до збільшення кількості гомозигот *PRL^{CC}* (0,76) і відповідно низька кількість особин з мутантним алелем Т (0,13) переважно за рахунок гетерозигот *PRL^{CT}* (0,23).

Для популяції корів української червоно-рябої молочної породи ситуація дещо інша (рис. 2).

Як і у випадку з чорно-рябою молочною породою за локусом *TNF-α* дослідна популяція характеризується вираженим ексцесом гетерозиготних особин ($F_{is} = -0,39$), що ми також пов'язуємо з типом використаного для визначення поліморфізму маркера (SSCP) та загальною кількістю виявлених алелів (6 алелів). У свою чергу, максимальне значення індексу фіксації відмічене для локусу пролактину (рівень інбридингу досягає 39 %), що знайшло своє відображення в порушенні стану генетичної рівноваги ($\chi^2 = 13,50$). У випадку з локусами бета-казеїну та лептину ситуація протилежна – наявний виражений ексцес гетерозиготних особин (-0,24 та -0,18 відповідно), але за відсутністю відхилень від рівноважного стану популяції (значення χ^2 дорівнюють 2,06 та 2,42 відповідно).

Отримані результати досліджень, на прикладі значень основних показників генетичної мінливості, свідчать про відсутність однозначної картини змін співвідношення різних алелів та генотипів за низкою досліджених локусів. За кожним з



визначених поліморфних генів спостерігається тенденція як до збільшення показнику інбридингу (за рахунок переважання кількості гомозиготних особин для локусу *PRL*), так і до збільшення гетерозиготності (аутбридинг) у випадку з іншими маркерами. Однак, не завжди, на перший погляд суттєві відмінності у співвідношенні значень параметрів фактичної та очікуваної гетерозиготності (H_o та H_e) свідчать про відхилення від рівноважного популяційного стану під впливом спрямованого добору. Більш за все це викликано дією стохастичних факторів (дрейф генів та інші).

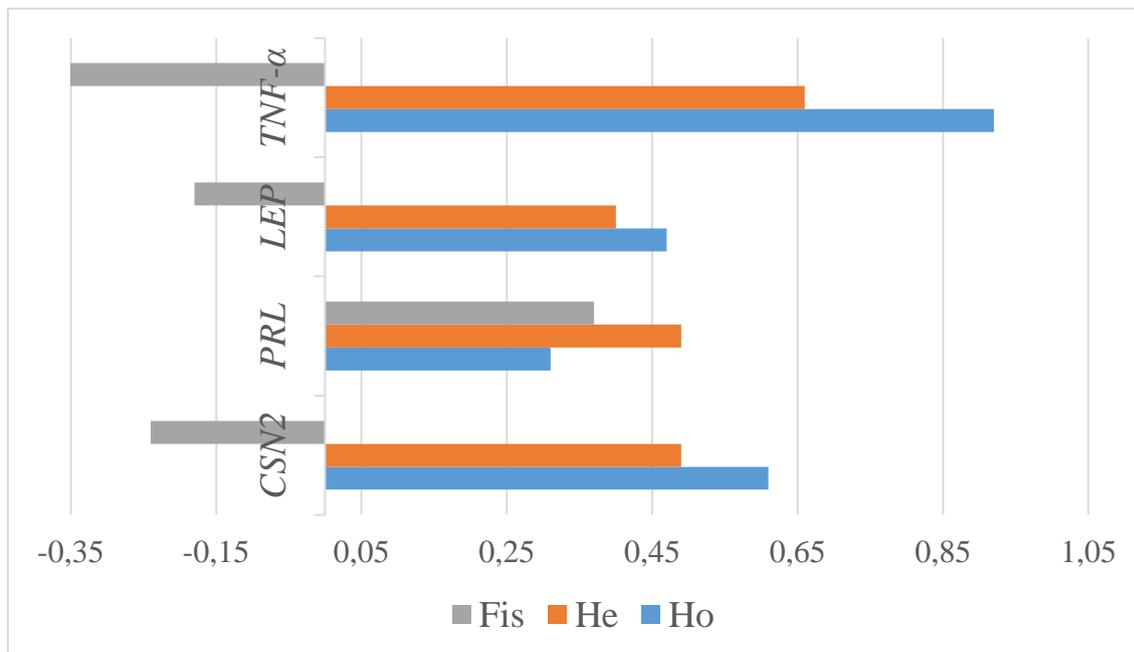


Рис. 2. Значення показників фактичної гетерозиготності (H_o), очікуваної гетерозиготності (H_e) та індексу фіксації Райта (F_{is}) у популяції корів української червоно-рябої молочної породи

Додатково до всього, тип використаних ДНК-маркерів та значення кількості алелів на локус також вносять свої корективи, що ми й спостерігаємо на прикладі гену *TNF- α* , що необхідно враховувати при аналізі генетичної структури. У будь якому випадку, селекційна робота, яка не спрямована на використання результатів індивідуального типування особин за низкою генів-кандидатів або локусів кількісних ознак не дає можливості провести остаточну фіксацію алеля, за умови його асоціативного зв'язку з цільовими параметрами продуктивності, яка приводила б до його мономорфності у дослідній групі тварин. Навіть у такого маркерного гену як пролактин, який характеризується суттєво вираженим превалюванням частоти «бажаного» алелю, не відбувається фінальної його фіксації. Після “формування” генетичної структури дослідної популяції суттєві зміни відсутні, а група тварин характеризується станом генетичної рівноваги, що свідчить про недостатню дію відбору та, відносно, стабільний стан у розрізі поколінь. Аутбридинг, тобто схрещування не споріднених між собою тварин, призводить до зміни співвідношень H_o та H_e , про що свідчать від’ємні значення індексу фіксації (ексцес гетерозиготних особин) за локусами *TNF- α* , *LEP* та *CSN2*. Але це не завжди супроводжується порушенням рівноважного стану популяції (як це зазначено вище у розрізі різних порід ВРХ) та може бути лише відбитком вихідних формоут-



ворюючих процесів у попередніх поколіннях. Таким чином, сучасна селекція у скотарстві, яка спрямована на максимальну реалізацію продуктивного потенціалу тварин, має бути доповненою сучасними молекулярно-генетичними методами оцінки особин, за відсутністю яких фінальна зміна генетичної структури у напрямку фіксації “бажаних” алелів певних генів-кандидатів практично неможлива.

Висновки:

1. В дослідній популяції корів української чорно-рябої молочної породи виявлений ексцес гетерозиготних особин за локусами *CSN2* та *TNF- α* , та значне превалювання кількості гомозиготних особин за локусом *LEP*. Для генів пролактину (*PRL*) і лептину (*LEP*) встановлено зміни генетичної структури за рахунок збільшення кількості гомозиготних особин.

2. В дослідній популяції корів української червоно-рябої молочної породи за локусом пролактину встановлений високий рівень інбридингу (39 %), що знайшло своє відображення в порушенні стану генетичної рівноваги ($\chi^2 = 13,50$). У випадку з локусами бета-казеїну та лептину ситуація протилежна – наявний виражений ексцес гетерозиготних особин (-0,24 та -0,18 відповідно), але за відсутністю відхилень від рівноважного стану популяції (значення χ^2 дорівнюють 2,06 та 2,42 відповідно).

3. За результатами проведених досліджень з порівняльного аналізу використання різних типів ДНК-маркерів та методів типування (AS-PCR, SSCP та PCR-RFLP) показано чутливість показників H_o , H_e та F_{is} до параметру кількості алелів на локус, що необхідно враховувати при проведенні генетико-популяційних досліджень.

References

1. Komisarek, J., & Dorinek, Z. (2009). Effect of *ABCG2*, *PPARGC1A*, *OLRI* and *SCD1* gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of applied genetics*. Vol. 50(2). P. 125–132. <https://doi.org/10.1007/BF03195663>.
2. Davis, G. P., & DeNise, S. K. (1998). The impact of genetic markers on selection. *Journal of Animal Science*. Vol. 76(9). P. 2331. doi:10.2527/1998.7692331x.
3. MacNeil, M. D., & Grosz, M. D. (2002). Genome-wide scans for QTL affecting carcass traits in Hereford x Composite double backcross populations. *Journal of Animal Science*. Vol. 80(9). P. 2316–2324.
4. Lewin, H. A., Schmitt, K., & Hubert, R. (1992). Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes mapping in cattle by single sperm typing. *Genomics*. Vol. 13. P. 44–48.
5. Adoligbe, C. M., Akpo, S. G., Adido, S., M'Po, M., Zoclanclounon, A., Mantip, S., Akpo, Y., & Farougou, S. (2022). Distribution of the beta-casein gene variants in three cattle breeds reared in Benin. *J Agri Sci*. Vol. 14. P. 86–94. <https://doi.org/10.5539/jas.v14n2p86>.
6. Sedykh, T. A., Kalashnikova, L. A., Gusev, I. V., Pavlova, I. Yu., Gizatullin, R. S., & Dolmatova, I. Yu. (2016). Influence of TG5 and LEP gene polymorphism on quantitative and qualitative meat composition in beef calves. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. Vol. 30(2). P. 41–48. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2016.121382>.
7. Buchanan, F. C., Van Kessel, A. G., & Waldner, C. (2003). Hot Topic: An Association Between a Leptin Single Nucleotide Polymorphism and Milk and Protein Yield. *J. Dairy Sci*. Vol. 86. P. 3164–3166. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73).



8. Buchanan, F. C., Fitzsimmons, C. J., Van Kessel, A. G., Thue, T. D., Winkelman-Sim, D. C., & Schmutz, S. M. (2002). Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*. Vol. 34(1). P. 105. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-1-10>.
9. 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.
10. Deshpande, M., Rank, D. N., & Vataliya, P. H. (2014). Study of leptin gene polymorphism in mehsana buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Buffalo Bulletin*. Vol. 33 (No.1). P. 115–119.
11. Kulig, H., Kmiec, M., & Wojdak-Maksymiec, K. (2010). Associations between Leptin Gene Polymorphisms and Somatic Cell Count in Milk of Jersey Cows. *Acta Vet. Brno*. Vol. 79. P. 237–242. <https://doi.org/10.2754/avb201079020237>.
12. Ranjan, S., Bhushan, B., & Panigrahi, M. (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.
13. Ogorevc, J., Kunej, T., & Razpet, A. (2009). Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*. Vol. 40. P. 832–851.
14. Bojarójc-Nosowicz, B., Kaczmarczyk, E., Stachura, A., & Kotkiewicz, M. (2011). Polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha gene in cattle herds naturally infected and uninfected with the Bovine Leukemia Virus. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. Vol. 14(4). P. 671–673. <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0101-0>.
15. Kulibaba, R., Sakhatskyi, M., & Liashenko, Y. (2023). Comparative analysis of A1 and A2 allele detection efficiency for bovine CSN2 gene by AS-PCR methods. *Acta Biochimica Polonica*. https://doi.org/10.18388/abp.2020_6530.
16. Alshamailekh, Kh. S., Liashenko, Yu. V., & Kulibaba, R. O. (2022). Parametry produktyvnosti koriv molochnykh porid z riznymy henotypamy za lokusamy TNF- α ta MYF-5. [Productivity parameters of dairy cows with different genotypes of *tnf- α* and *myf5* locis] *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Instytutu tvarynnystva NAAN – Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Animal Science of the National Academy of Agrarian Science of Ukraine*. Kharkiv, № 127. C. 69–79 [In Ukrainian].
17. Kulibaba, R., Liashenko, Y., Yurko, P., Sakhatskyi, M., Osadcha, Y., & Alshamaileh, H. (2021). Polymorphism of LEP and TNF- α Genes in the Dairy Cattle Populations of Ukrainian Selection. *Basrah J. Agric. Sci.* Vol. 34(1). P. 180–191. <https://doi.org/10.37077/25200860.2021.34.1.16>.
18. Kulibaba, R. O., Liashenko, Y. V., & Yurko P. S. (2019). Genetic structure features of cattle populations of Ukrainian selection by polymorphism of loci that are associated with milk productivity traits. *Agricultural Science and Practice*. Vol. 6, No. 3, P. 37–44.
19. Smouse, P. E., Banks, S. C., & Peakall, R. (2017). Converting quadratic entropy to diversity: Both animals and alleles are diverse, but some are more diverse than others. *PLOS ONE*. Vol. 12. e0185499.
20. Kuznecov, V. M. (2014). F-statistiki Rajta: ocnka i interpretaciya. [Wright's F-statistics: estimation and interpretation] *Problemy biologii produktivnyh zhivotnyh*. Borovsk. № 4. P. 80–104 [in Russian].
21. Bisutti, V., Pegolo, S., Giannuzzi, D., Mota, F. M., Vanzin, A., Toscano, A., Trevisi, E., Marsan, P. A., Brasca, M., & Cecchinato A. (2022). The β -casein (CSN2)



A2 allelic variant alters milk protein profile and slightly worsens coagulation properties in Holstein cows. *J Dairy Sci.* Vol. 105. P. 3794–3809. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21537>.

22. 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.

23. 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.

24. Alipanah, M., Kalashnikova, L. A., & Rodionov, G. V. (2008). Kappa-casein and PRL-RsaI genotypic frequencies in two Russian cattle breeds. *Archivos de Zootecnia.* Vol. 57 (218). P. 131–138.

25. 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.

26. 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.

27. 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. <https://doi.org/10.17221/5131-CJAS>.

28. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00875.x>.

29. 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. https://doi.org/10.4103/jnsbm.JNSBM_303_16.

30. 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.

31. Clempson, A. M., Pollott, G. E., Brickell, J. S., Bourne, N. E., Munce, N., & Wathes, D. C. (2011). Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* Vol. 94(7). P. 3618–3628. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3626>.

32. Abbas, N., Suleman, M., Zahur, A. B., Ghafoor, A., Rashid, F., Jan, A. U., Akbar, F., Ali, S., Aziz, A., Islam, Z., & Shah, A. (2019). Molecular Analysis of Leptin Gene Polymorphism in Achai, Sahiwal Cattle and Nili-ravi Buffalo Breeds of Pakistan. *International Journal of Genetics and Genomics.* Vol. 7(3). P. 75–79. <https://doi.org/10.11648/j.ijgg.20190703.17>.

33. 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. <https://doi.org/10.1080/10495398.2014.929582>.



USING OF GENETIC-POPULATION STUDIES RESULTS FOR ASSESSMENT OF SELECTION WORK IN DAIRY CATTLE POPULATIONS

Kulibaba R. O., National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Liashenko Yu. V., Institute of Animal Science NAAS

Sakhatskyi M. I., National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

The article presents the results of complex research that continues previous work aimed at determining the polymorphism of the CSN2, PRL, LEP, and TNF- α loci and analyzing the productivity of dairy cattle with different genotypes for these loci. The goal of the work is to analyze the selection work with populations of dairy cows based on the results of typing individuals for allelic variants of the CSN2, PRL, LEP, and TNF- α loci, which are associated with economically valuable traits but are not directly evaluated by traditional phenotype-based methods. To analyze the data, the observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity and Wright's fixation index (F_{is}) were used. Individual animal typing was performed using AS-PCR (CSN2), SSCP (TNF- α), and PCR-RFLP (PRL, LEP) methods. The studies revealed an excess of heterozygous individuals for the CSN2 and TNF- α loci and a significant predominance of homozygous individuals for the LEP locus in the population of Ukrainian Black-and-White dairy cows. For the prolactin (PRL) and leptin (LEP) genes, a deviation from genetic equilibrium was shown due to the increase in the number of homozygous individuals. In the population of Ukrainian Red-and-White dairy cows, a high level of inbreeding (39%) was found for the PRL locus, which was reflected in a deviation from the genetic equilibrium state ($\chi^2 = 13.50$). In the case of the beta-casein and leptin loci, the situation is opposite, with a marked excess of heterozygous individuals (-0.24 and -0.18, respectively), but no deviations from the equilibrium state were observed in the population (χ^2 values of 2.06 and 2.42, respectively). For both populations, there were no significant changes in the ratio of different alleles and genotypes for several loci investigated, and the impossibility of fixing desired alleles using traditional breeding methods was demonstrated. Based on a comparative analysis of different types of DNA markers and typing methods (AS-PCR, SSCP, and PCR-RFLP), the sensitivity of the H_o , H_e , and F_{is} parameters to the number of alleles at the locus was established, which should be taken into account when conducting genetic-population studies.

Keywords: polymorphism, population, cows, allele, genotype, homozygosity, variability, fixation.