

ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ СТІЙКОСТІ КОРІВ ДО МАСТИТІВ**Т. Супрович, Р. Колінчук***Подільський державний університет*

*Наведено результати дослідження алелів гена BoLA-DRB3, які мають асоціації із захворюванням корів на мастит і можуть слугувати ДНК-маркерами даного захворювання. Алельний спектр гена BoLA-DRB3 вивчали за допомогою ПЛР-ПДРФ. Визначено, що у корів української чорно-рябої молочної породи визначається 28 алелів гена BoLA-DRB3 з середньою частотою виявлення 3,57%. Найчастіше визначався алель BoLA-DRB3*22 (19,1%). В групі сприйнятливих до маститів корів виявлено 24 алеля (середня частота 4,17%). Алелі BoLA-DRB3 *16, *25, *31 і *36 не виявлялися взагалі. Серед корів стійких до маститів виявлено 27 алелів. Середня частота прояву склала 3,7%. Жодного разу не виявлявся алель *41. Встановлено наявність двох алелів (*24 та *26), які мають тісний зв'язок із схильністю і два алеля (*13, та *22), які асоціюються з резистентністю до захворювань молочної залози корів.*

Ключові слова: корови, мастит, ген BoLA-DRB3, алелі.

Постановка проблеми. Захворюваність корів на мастити в Україні визначається вітчизняними дослідниками, як основна проблема тваринницької галузі. Внаслідок масового поширення захворювань вим'я серед корів молочне скотарство та переробна промисловість зазнають значних економічних збитків через зниження молочної продуктивності, погіршення якості молока й молочних продуктів. За різними оцінками захворюваність корів в середньому сягає 30%, а в окремих господарствах при порушенні умов утримання, годівлі, відсутності належного ветеринарного обслуговування та ефективної селекційної роботи діагностується постійно [1, 2, 3, 4, 5].

На сьогоднішній день, у зв'язку із скороченням чисельності поголів'я тварин на території країни, мало б спостерігатися зниження частки маститних корів, тому що, як правило, зі стада в першу чергу вибраковуються хворі тварини. Однак, навпаки, тенденції до зниження захворюваності корів маститами не спостерігається [6].

Є низка факторів, які цьому сприяють: організаційні, інформаційні, економічні, фахові тощо. Вплив цих факторів на рівень захворюваності піддається регулюванню, тобто при належному відношенні до причини можна скоротити негативні наслідки впливу.

Але є ще один фактор – генетичний, який виправити в процесі «експлуатації» тварини вже неможливо: якщо тварина генетично схильна до захворювання, то вона буде частіше хворіти за інших, і навіть висока продуктивність такої корови не перевершує витрат необхідних на лікування і втрат, пов'язаних з неякісним продуктом, який отримується від неї.

Тому пошук методів, які б забезпечили формування молочного стада генетично резистентними до маститів коровами має велике значення для програм спрямованих на скорочення захворюваності молочної залози корів. Одним із таких методів є пошук молекулярно-генетичного маркерів, які асоціюють із захворюваністю або стійкістю до даної патології тварин.

З усього різноманіття генетичних маркерів ген BoLA-DRB3 є унікальним. Він є одним із самих поліморфних генів класу II головного комплексу гістосумісності великої рогатої худоби (BoLA). Головний комплекс гістосумісності (ГКГ) – велика родина генів та відповідна область геному більшості хребетних, яка відіграє важливу роль у функціонуванні імунної системи, зокрема впливаючи на аутоімунні реакції, прийняття трансплантатів та успіх репродукції. Відкриття та вивчення ГКГ стало головною подією в фундаментальній та прикладній імунології. Сучасні дослідження переконливо обґрунтували роль ГКГ- системи в забезпеченні генетичного гомеостазу в організмі, шляхом об'єднання факторів природного та адаптивного імунітету. Набір молекул ГКГ робить багатоклітинні організми унікальними в фізіологічних реакціях, включаючи поведінкові та гендерні їх особливості.

Молекули головного комплексу гістосумісності виконують роль своєрідних «антен», які дозволяють організму, розпізнавати власні та чужорідні клітини (бактерії, віруси, ракові клітини) і, при необхідності, запустити імунну відповідь, забезпечуючи утворення специфічних антитіл і

видалення чужорідного агенту з організму.

Основна фізіологічна функція молекул ГКГ, що розташовані на поверхні клітинної мембрани, полягає в зв'язуванні пептидних фрагментів чужорідних білків і презентація їх Т-лімфоцитам. Без молекул ГКГ не можлива індукція клітинного і гуморального імунітету.

Вивчення нуклеотидних послідовностей генів класу II BoLA-системи у великої рогатої худоби дозволило описати алелі гена DRB3 і виявити алелі, відповідальні за стійкість і сприйнятливості до маститу [7, 8].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Дослідження в області головного комплексу гістосумісності ведуться досить інтенсивно фахівцями у різних галузях біології, медицини та сільського господарства. Застосування методів молекулярної біології сприяло швидкому стрибку у вивченні ГКГ. Величезний інтерес пов'язаний з результатами досліджень, особливо в області імунітету і еволюції головного комплексу гістосумісності, а також з цінними перспективами для їх застосування в імунології, трансплантології, у всіх галузях медицини (у тому числі і в ветеринарній) та сільському господарстві.

В даний час інтенсивно проводиться вивчення асоціацій поліморфізму гена BoLA-DRB3 з різними захворюваннями, імунологічними властивостями, ознаками молочної продуктивності, а також молекулярних механізмів, що обумовлюють подібні асоціації [9, 10, 11]. Досить детально вивчені асоціації різних алельних варіантів цього гену у зв'язку зі стійкістю й сприйнятливостю до лейкозу [12].

Майже одночасно паралельно дослідженням по виявленню асоціацій поліморфізму гена BoLA-DRB3 з лейкозом почали вивчатися алелі цього гена у корів з різними формами маститів [13, 14, 15].

Аналіз літературних джерел показує, що для різних порід виявляються різні, інколи прямо протилежні, взаємозв'язки між алелями та станом тварини. В огляді [16] BoLA корів на асоціацію з маститами вказують алелі *03, *08, *11, *13, *1501 (*16), *18, *22, *23 і *0101 (*24), на стійкість до захворювання – *1201 (*08) і *1101 (*22). Невизначеність існує для алеля *1401 (*27).

При аналізі експресії алелів DRB3 у китайської голштинської породи ВРХ встановлено, що алелі *1201 (*08) і *2703 (*23) проявляють асоціативні взаємозв'язки з резистентністю до маститів, а алель *1501 (*16), особливо в гомозиготному стані, є актуальним щодо можливого захворювання корови маститом [17].

Мікрофлора, яка викликає мастит, може бути різноманітною. Тому поки немає повної ясності щодо асоціації конкретних алелів BoLA-DRB3 з певними збудниками даного захворювання. Так, зі стійкістю до маститу пов'язують алелі DRB3*07, *11, *13, *18, *22, *24, *27, *03; до стрептококових і стафілококових маститів – *1101 (*22), до маститу, викликаного *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *E. coli* – *1201 (*08). З сприйнятливостю до маститу асоційовані алелі BoLA-DRB3*26, *08, *23, з маститом, викликаним стафілококами і *E. coli* – *0101 (*24), * з маститом, викликаним – *E. coli* 1506 (*16) [18, 19].

Дані про поліморфізм гена BoLA-DRB3 дозволяють проводити MAS- селекцію з метою отримання високопродуктивних, а головне – стійких до захворювань тварин. Це дозволить знизити необхідність складних і дорогих заходів щодо організації лікування тварин, контролю за поширенням патогенів, вибракування, ізоляції та карантину хворих тварин, що стає все більш актуальним у зв'язку зі зростаючою стійкістю патогенів до антибіотиків та інших профілактичних і лікувальних препаратів [20].

Мета роботи: полягала у вивченні поліморфізму алелів гена BoLA-DRB3 у здорових і хворих на мастит корів та виявлення алелів асоційованих із стійкістю та сприйнятливостю корів до маститів.

Матеріали і методи дослідження. Виробничі досліди проводилися у племінних і товарних господарствах Хмельницької області. Господарства відрізнялися напрямом виробництва продукції, організацією племінної справи, умовами утримання і годівлі тварин, станом ветеринарно-зоотехнічного обслуговування. Субклінічні мастити визначалися за допомогою реакції секрету з кожної чверті на молочно-контрольній пластинці з 2%-м розчином мастидину відразу ж після доїння.

Для вивчення поліморфізму і виявлення ДНК-маркерів резистентності (сприйнятливості) до маститів серед алелів гена BoLA-DRB3 у корів даної породи було відібрано 100 проб крові від

здорових тварин та 62 проби від корів з діагнозом хронічний мастит.

Виділення ДНК проводили з використанням наборів «DIAtomTMNAPRep 200» фірми ТОВ «Лабораторія Ізоген» згідно з вимогами виробника. Дозвіл на використання тварин затверджено Вченою радою Подільського державного аграрно-технічного університету у відповідності з Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей.

Для визначення алелів гена *BoLA-DRB3* було використано рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації (ПЛР-ПДРФ). Ампліфікацію фрагмента екзона 2 гена *BoLA-DRB3* проводили в два етапи з використанням набору «GenePakTM PCR Core» (Isogene Lab. Ltd, Москва). Для першого раунду використано праймери HLO-30 і HLO-31, для другого раунду – HLO-30 і HLO-32.

Характеристика праймерів:

HLO-30 (5'-3': TCCTCTCTGTCAGCACATTTCC);

HLO-31 (5'-3': ATTCGCGCTCACC TCGCCGCT),

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

Рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації проводили з використанням ендонуклеаз *RsaI*, *HaeIII* і *BstYI* (*XhoII*). Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу в 4% агарозному гелі (TopVision™ LE GQ agarose, Fermentas, Канада) у присутності бромистого етидію (5 мМ/мл) і тестували в УФ-світлі (рис.1).

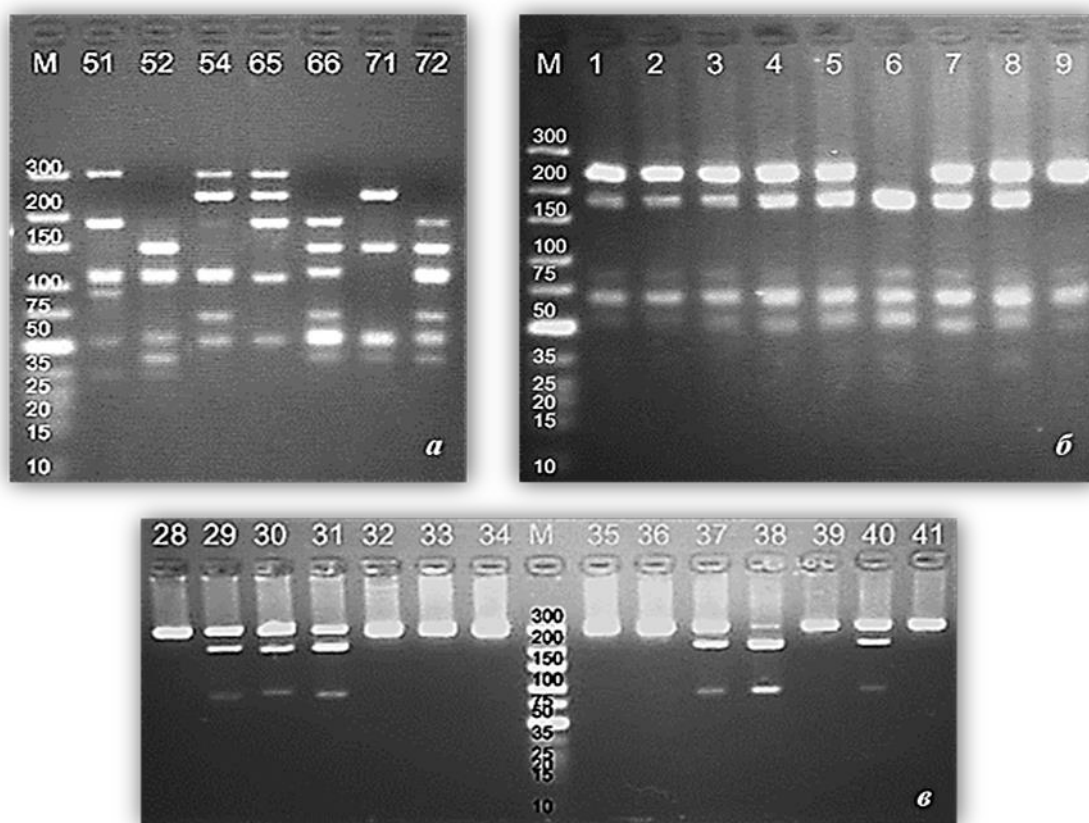


Рис.1. Електрофореграми продуктів ампліфікації екзона 2 гена *BoLA-DRB3*, отриманих на ДНК корів української чорно-рябої молочної породи з використанням ендонуклеаз *RsaI* (а), *HaeIII* (б) і *BstYI* (в). Для оцінки довжин фрагментів використано маркер молекулярних мас «GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder» фірми «Fermentas», Литва. Зверху вказані номери зразків крові.

Статистичний обробіток даних проводили в стандартному пакеті «Microsoft Excel 2013» з використанням власних програм та інтегрованої надбудови GenAlEx 6.503 (<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html>).

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті дослідження встановлено, що у корів української чорно-рябої молочної породи визначається 28 алелів гена *BoLA-DRB3* з середньою частотою виявлення 3,57% (табл.1)

Таблиця 1. Розподіл частот алелів BoLA-DRB 3 у загальній групі корів української чорно-рябої молочної породи ($n = 162$)

Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$	Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$
*01	5	0,015	0,685	*21	6	0,019	0,749
*02	8	0,025	0,862	*22	39	0,12	1,808
*03	19	0,059	1,305	*23	6	0,019	0,749
*04	7	0,022	0,808	*24	38	0,117	1,788
*07	16	0,049	1,204	*25	2	0,006	0,435
*08	24	0,074	1,455	*26	14	0,043	1,13
*10	17	0,053	1,239	*28	25	0,077	1,482
*11	5	0,015	0,685	*31	2	0,006	0,435
*12	12	0,037	1,049	*32	10	0,031	0,961
*13	17	0,053	1,239	*36	10	0,031	0,961
*15	6	0,019	0,749	*37	11	0,034	1,006
*16	2	0,006	0,435	*41	2	0,006	0,435
*18	8	0,025	0,862	*42	2	0,006	0,435
*20	3	0,009	0,532	*48	8	0,024	0,862

«Інформативними» з частотою понад у 5% в загальній групі виявлялися 7 алелів. Найчастіше у цій вибірці визначався алель BoLA-DRB3*22. Його виявлено у 31 (19,1%) тварини. Алель *24 визначено у 34 корів (21%) але завдяки тому, що він частіше проявляється в гомозиготному стані його частка в дослідженій вибірці склала лише 11,7%.

Межу інформативності у $P(A) \geq 5\%$ перевищили, також, алелі: *28 – 7,7%, *08 – 7,4%, *03 – 5,9%, *10 і *13 – 5,3%. Сумарна частота 7 найбільш поширених алелів склала 59,6%. Найменше варіантів по 2 (0,6%) знайдено для алелів *16, *25, *31, *41 і *42.

Результати дослідження поліморфізму в групі сприйнятливих до маститів корів приведено в табл. 2. В цій групі тварин виявлено 24 алеля (середня частота 4,17%). Варіанти *16, *25, *31 і *36 не виявлялися взагалі.

Таблиця 2. Розподіл частот алелів BoLA-DRB 3 у сприйнятливих до маститів корів української чорно-рябої молочної породи ($n = 62$)

Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$	Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$
*01	1	0,008	0,803	*20	1	0,008	0,803
*02	2	0,016	1,131	*21	4	0,032	1,587
*03	8	0,065	2,206	*22	9	0,073	2,330
*04	2	0,016	1,131	*23	2	0,016	1,131
*07	6	0,048	1,927	*24	20	0,161	3,303
*08	6	0,048	1,927	*26	10	0,081	2,445
*10	5	0,040	1,767	*28	12	0,097	2,655
*11	4	0,032	1,587	*32	2	0,016	1,131
*12	6	0,048	1,927	*37	3	0,024	1,380
*13	2	0,016	1,131	*41	2	0,016	1,131
*15	4	0,032	1,587	*42	1	0,008	0,803
*18	6	0,048	1,927	*48	6	0,048	1,927

З частотою понад 5% визначено 5 алелів. Найбільш поширеним у сприйнятливих до маститів тварин виявився варіант BoLA-DRB3*24 – 16,1%. З 62 протестованих тварин його знайдено у 17 (27,4%). Також часто визначалися алелі *28 – 9,7%, *26 – 8,1%, *22 – 7,3% і *03 – 6,5%. Малопоширеними серед маститних корів були алелі *01, *20 та *42 (по 0,8%). Інші 19 алелів зустрічалися рідко. Сумарна частота їх виявлення склала 46,4%.

Алель *24 найбільше зустрічається в гомозиготному стані. Генотип BoLA-DRB3*24*24 виявився найбільш поширеним у хворих на мастит тварин (37,5%).

Серед корів стійких до маститів виявлено 27 алелів (табл.3). Середня частота прояву – 3,7%. Жодного разу не виявлявся варіант *41. Алель *48 генотиповано лише в однієї корови. З частотою $P(A) \geq 5\%$ виявлено 8 випадків.

Таблиця 3. Розподіл частот алелів BoLA-DRB 3 у корів української чорно-рябої молочної породи резистентних до маститів ($n = 100$)

Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$	Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$
*01	4	0,02	0,99	*21	2	0,01	0,704
*02	6	0,03	1,206	*22	30	0,15	2,525
*03	11	0,055	1,612	*23	4	0,02	0,990
*04	5	0,025	1,104	*24	18	0,09	2,024
*07	10	0,05	1,541	*25	2	0,01	0,704
*08	18	0,09	2,024	*26	4	0,02	0,990
*10	12	0,06	1,679	*28	13	0,065	1,743
*11	1	0,005	0,499	*31	2	0,01	0,704
*12	6	0,03	1,206	*32	8	0,04	1,386
*13	15	0,075	1,862	*36	10	0,05	1,541
*15	2	0,01	0,704	*37	8	0,04	1,386
*16	2	0,01	0,704	*42	1	0,005	0,499
*18	2	0,01	0,704	*48	2	0,01	0,704
*20	2	0,01	0,704				

Серед ідентифікованих алелів найбільш часто зустрічався варіант BoLA-DRB3*22 (15%). У 6 корів він утворював гомозиготи (40% від усієї кількості виявлених гомозигот). Також даний варіант найчастіше виявлявся і серед стійких до маститів тварин. Його носіями були 24 корови (24%).

Алелі *24 і *08 достатньо часто виявлялися у гетерозиготному генотипі (9,0%), *13 – 7,5%, *28 – 6,5%, *10 – 6,0%, *08 – 5,0%.

Алель BoLA-DRB3*10 чотири рази було виявлено у гомозиготному стані, що склало 26,7% від усіх генотипів у тварин стійких до маститів і 2 гомозиготи для алеля *08 (13,3%). Ще 3 алеля (*07, *08 і *10) виявлялися в гомозиготному генотипі. Сумарна частота 19 малопоширених алелів склала 34,5%.

Таким чином, встановлено, що у представленій породи тварин з частотою понад 5% хоча б одній з дослідних вибірок (сприйнятливі, резистентні, загальна група) визначається 9 алелів BoLA-DRB3. Серед них виділяються 4 алеля, які присутні у всіх трьох вибірках: *03, *22, *24 і *28. Ще три «інформативних» алеля визначаються більш ніж у кожній 20-ї корови одночасно у стійких до маститів корів і в загальній вибірці: 08, *10 і *13.

Показник частоти знаходження алелів гена BoLA-DRB3 відображає їх розподіл у популяції. Дана ознака є якісною, тому що відображає частку алеля у відповідній вибірці. Але, як правило, її недостатньо для встановлення достовірних зв'язків в системі «алель – захворювання», тобто неможливо достовірно стверджувати, що нами встановлено ДНК-маркер асоційований з

маститими ВРХ. На це вказують ряд авторів, які проводили аналогічні дослідження на інших породах корів [21, 22].

Для виявлення достовірних зв'язків між алелями та чутливістю корів до маститів проведено статистичний обробіток. Визначено біометричні показники, які дозволяють:

– оцінити ступінь достовірності досліджуваних альтернатив – наявність-відсутність алеля у стійких і сприйнятливих тварин;

– встановити, чи існує мультиплікативна взаємодія між фактором і подією, тобто між наявністю алеля і станом корови (резистентна – сприйнятлива).

Про випадковість або дійсність виявленого розподілу алелів у зв'язку із захворюваністю маститими судять за критерієм відповідності. Визначення χ^2 проводили за формулою Пірсона.

Наявність асоціації між захворюванням і алелем виявляли на основі порівняння частот алелів у хворих і здорових корів. Показником відмінності частот визначення алелів у групах сприйнятливих і стійких до маститів тварин служить величина відносного ризику, яка відображає мультиплікативність асоціації. Величина RR показує у скільки разів ризик розвитку захворювання є більшим у разі присутності в генотипі певного алеля, ніж при його відсутності.

Результати розрахунку біометричних показників з поправкою Вульфа-Холдейна і перевіркою на достовірність малих вибірок за χ^2 представлено в табл. 4.

Значимими за критерієм Пірсона є вісім алелів BoLA-DRB3, які мають достатній рівень достовірності для досліджених біологічних об'єктів. Рівень довірчої ймовірності дослідження $p = 0,99$ проявляють алелі *26 ($\chi^2 = 7,13$) і *36 ($\chi^2 = 6,61$). Шість алелів мають мінімальний поріг достовірності $p = 0,95$: *13 ($\chi^2 = 5,65$), *22 ($\chi^2 = 5,02$), *18 і *48 ($\chi^2 = 4,82$), *24 ($\chi^2 = 4,33$) і *11 ($\chi^2 = 3,8$).

За критерієм відносного ризику значимі асоціації зі схильністю чи стійкістю до маститів мають 17 алелів. На зв'язок із захворюваністю ($RR \geq 2$) вказують 8 алелів, а саме: *41 ($RR = 8,31$), *11 ($RR = 6,83$), *18 і *48 ($RR = 5,25$), *26 ($RR = 4,62$), *15 і *21 ($RR = 3,38$) та *24 ($RR = 2,17$); на зв'язок зі стійкістю до маститів ($RR \leq -2$) вказують наступні 9 алелів: *36 ($RR = -14,5$), *13 ($RR = -5,29$), *16 і *25 та *31 ($RR = -3,17$), *32 ($RR = -2,61$), *01 і *22 ($RR = -2,52$) та *08 ($RR = -2,05$).

Асоційованим із захворюванням вважається алель, для якого виконується умова $RR \geq 2$ і $\chi^2 > 3,8$. Всього нараховується 5 таких алелів: *11 ($RR = 6,83$; $\chi^2 = 3,8$), *18 ($RR = 5,25$; $\chi^2 = 4,82$), *24 ($RR = 2,17$; $\chi^2 = 4,33$), *26 ($RR = 4,62$; $\chi^2 = 7,13$) і *48 ($RR = 5,25$; $\chi^2 = 4,8$). Три з них не витримують перевірку на обмеженість вибірки. Із-за цього обмеження не можна вважати асоційованими із сприйнятливістю до маститів наступні алелі: *11 ($P(A) = 0,0154$), *18 і *48 ($P(A) = 0,0247$).

Асоційованим із стійкістю до захворювання вважається алель, для якого виконується умова $RR \leq -2$ і $\chi^2 > 3,8$. Всього налічується 3 таких алеля: *13 ($RR = -5,29$; $\chi^2 = 5,65$), *22 ($RR = -2,52$; $\chi^2 = 5,02$) і *36 ($RR = -14,5$; $\chi^2 = 6,61$). Для алеля *36 ($P(A) = 0,031$) не виконується перевірка виконана на обмеженість вибірки, що не дозволяє вважати значимим його зв'язок зі стійкістю корів до маститів.

Таким чином, дослідження поліморфізму гена BoLA-DRB3 у корів української чорно-рябої молочної породи показує, що у даної популяції виявляється два алеля, які мають тісний зв'язок із сприйнятливістю корів до маститів. Це алелі BoLA-DRB3: *24 ($RR = 2,17$; $P(A) = 0,117$; $\chi^2 = 4,33$) і *26 ($RR = 4,62$; $P(A) = 0,043$; $\chi^2 = 7,13$).

Даним дослідженням встановлено наявність також двох алелів, які вказують на статистично значимий зв'язок зі стійкістю корів до маститів. Це алелі BoLA-DRB3: *13 ($RR = -5,29$; $P(A) = 0,053$; $\chi^2 = 5,65$) і *22 ($RR = -2,52$; $P(A) = 0,12$; $\chi^2 = 5,02$).

Необхідно звернути увагу на алелі *18 і *48, які мають високі показники відносного ризику, достатню достовірність за критерієм Пірсона, але не витримують перевірку по критерію відповідності на обмеженість розміру вибірки і тому, що рідко виявляються у здорових тварин. Таке обмеження, як правило, витримує перевірку для малих вибірок за точним одностороннім критерієм Фішера, при незначному зниженні загальної достовірності дослідження. У зв'язку зі стійкістю до маститів необхідно також перевірити на силу асоціації алель BoLA-DRB3*08 ($RR = -2,05$; $P(A) = 0,074$), який не має достатньої точності за критерієм відповідності ($p < 0,95$) але відповідає вимогам достовірності за іншими обмеженнями.

Таблиця 4. Біометричні показники поліморфізму алелів гена *BoLA-DRB3* корів української чорно-рябої молочної породи та їх зв'язок з маститами

Алелі	$P(A)$	χ^2	RR	Перевірка достовірності по χ^2			
				$\frac{(a+b) \times (a+c)}{N}$	$\frac{(a+b) \times (b+d)}{N}$	$\frac{(c+d) \times (a+c)}{N}$	$\frac{(c+d) \times (b+d)}{N}$
*01	0,0154	0,729	-2,54	1,91	2,99	60,1	96,9
*02	0,0247	0,627	0,522	3,06	4,74	58,9	95,1
*03	0,0586	0,134	1,2	7,27	11,4	54,7	88,3
*04	0,0216	0,291	0,633	2,68	4,19	59,3	95,7
*07	0,0494	0,004	0,964	6,12	9,48	55,9	90,1
*08	0,0741	2,1	-2,05	9,19	13,0	52,8	85,2
*10	0,0525	0,631	0,643	6,51	9,76	55,5	89,5
*11 ¹	0,0154	3,8	6,83	1,91	3,18	60,1	96,9
*12	0,037	0,755	1,68	4,59	7,41	57,4	92,6
*13 ¹	0,0525	5,65	-5,29	6,51	9,13	55,5	89,5
*15	0,0185	2,13	3,38	2,30	3,78	59,7	96,3
*16	0,0062	1,26	-3,17	0,77	1,21	61,2	98,8
*18 ¹	0,0247	4,81	5,25	3,06	5,14	58,9	95,1
*20	0,0093	0,032	0,803	1,15	1,83	60,9	98,2
*21	0,0185	2,13	3,38	2,30	3,78	59,7	96,3
*22 ¹	0,1204	5,02	-2,52	14,9	19,0	47,1	75,9
*23	0,0185	0,064	0,8	2,3	3,63	59,7	96,3
*24 ¹	0,1173	4,33	2,17	14,5	23,9	47,5	76,5
*25	0,0062	1,26	-3,17	0,77	1,21	61,2	98,3
*26 ²	0,0432	7,13	4,62	5,36	9,16	56,6	91,4
*28	0,0772	1,18	1,61	9,57	15,3	52,4	84,6
*31	0,0062	1,26	-3,17	0,77	1,21	61,2	98,8
*32	0,0309	1,51	-2,61	3,83	5,80	58,2	93,8
*36	0,0309	6,61	-14,5	3,83	5,56	58,2	93,8
*37 ²	0,034	0,604	0,585	4,21	6,45	57,8	93,2
*41	0,0062	3,27	8,31	0,77	1,26	61,2	98,8
*42	0,0062	0,118	1,62	0,77	1,23	61,2	98,8
*48 ¹	0,0247	4,81	5,25	3,06	5,14	58,9	95,1

За критерієм Фішера достатню силу зв'язку з маститом мають алелі *BoLA-DRB3**18 і *48 ($P < 0,05$). Але перевірка за коефіцієнтом Пірсона вказує на слабкість виявленої асоціації. Тому пропонувати ці алелі до використання як ДНК-маркери чутливості до захворювань маститами корів української чорно-рябої молочної породи необхідно тільки після додаткових досліджень на більших вибірках тварин. Алель *BoLA-DRB3**08 не витримує перевірку за точним критерієм Фішера ($P > 0,05$) і має дуже низьку силу асоціації за коефіцієнтом Пірсона, що виключає його зі списку потенціальних ДНК-маркерів.

Висновки і перспективи. Встановлено, що у корів української чорно-рябої молочної породи тісний зв'язок із сприйнятливістю корів до маститів мають два алеля *BoLA-DRB3*: *24 ($RR = 2,17$; $P(A) = 0,117$; $\chi^2 = 4,33$) і *26 ($RR = 4,62$; $P(A) = 0,043$; $\chi^2 = 7,13$), а на асоціацію з резистентністю вказують варіанти: *13 ($RR = -5,29$; $P(A) = 0,053$; $\chi^2 = 5,65$) та *22 ($RR = -2,52$;

$P(A) = 0,12$; $\chi^2 = 5,02$). Отримані результати будуть корисними при формуванні стад молочних корів стійких до маститів на етапі раннього постнатального онтогенезу, а також при розробці селекційних програм спрямованих на відбір корів стійких до інтрамамарних інфекцій вим'я.

Список використаних джерел

1. Байдевятова Ю.В., Байдевятов Ю.А. Серозний мастит у корів (поширеність, діагностика і терапія). *Вісник Сумського національного аграрного ун-ту: Серія : «Ветеринарна медицина»*. Суми. 2011. Вип.1(28). С.81-86.
2. Вальчук О., Столюк В. Мастит корів – ефективні шляхи вирішення проблеми. *Здоров'я продуктивних тварин*. 2009. №4. С.30-34.
3. Пешук Л.В. Проблема маститу в стадах великої рогатої худоби молочного напрямку. *Вісник аграрної науки*. 2001. №9. С.32-35.
4. Смоляр В.С. Профілактика маститів при доїнні корів. *Тваринництво України*. 2002. №11. С.8-9.
5. Ljubeckij W.J., Walczuk A.A. Rozszerzenie si mastitis wid wysokoprodukcyjnych krw w niektrych gospodarstwach Obwodu Kijowskiego. *Materialy konferencyjne, midzynarodowa sesja naukowa «Problemy w rozrodzie wyda – dzi i jutro»*. 2004. Polanica Zdrj. S.92-94.
6. Супрович Т.М. Дослідження поліморфізму гена BoLA-DRB3 у корів сприйнятливих та стійких до маститів. *Тваринництво України*. 2013. №12. С.14-19.
7. Сулимова Г.Е. ДНК-маркери в изучении генофонда пород крупного рогатого скота / В кн: «Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства». Москва. Наука, 2006. С.138-166.
8. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т.17(4). С.1044-1054.
9. Удина И.Г., Карамышева Е.Е., Туркова С.О. Генетические механизмы устойчивости и чувствительности к лейкозу айрширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота, установленные на основе распределения аллелей гена BoLA-DRB3. *Генетика*. 2003. Т.39. №3. С.383-396.
10. Baxter R., Hastings N., Law A., Glass E.J. A rapid and robust sequence-based genotyping method for BoLA-DRB3 alleles in large numbers of heterozygous cattle. *Animal Genetics*. 2008. V.39. P.561-563. doi: 10.1111 / j.1365-2052.2008.01757.x.
11. Yoshida T., Mukoyama H., Furuta H. Et al. Association of the amino acid motifs of BoLA-DRB3 alleles with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Animal Science Journal*. 2009. V.80. №5. P.510-519. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2009.00664.x>
12. Juliarena M.A, Poli M., Sala L. Et al. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Animal genetics*. 2008. V.39. №4. P.432-438. doi: 10.1111 / j.1365-2052.2008.01750.x.
13. Codner G.F. Assessing MHC class I diversity in dairy cattle populations : A Thesis of Doctor of Philosophy / School of Veterinary Medicine: University of Glasgow. 2010. 300 p.
14. Galal K., Hameed A., Sender G., Mayntz M. Major histocompatibility complex polymorphism and mastitis resistance – a review. *Animal Science Papers and Reports*. 2006. V.24. №1. P.11-25.
15. Sharif A.M., Muhammad U., Muhammad G. Mastitis control in dairy production. *Journal of Agriculture & Social Science*. 2009. №5. P.102-105.
16. Behl Y.D., Verma N.K., Tyagi N. et al. The Major Histocompatibility Complex in Bovines: A Review Int. Scholarly Res. Network: ISRN Veterinary Science. 2012, Article ID 872710. 12 p.
17. Lin Jyun-Hong. Analysis of relationships between BoLA-DRB3.2 alleles, mastitis, and milk traits by noninvasive sampling methods: URL: <http://ntur.lib.ntu.edu.tw/handle/246246/253870?locale=zh-TW>.
18. Yoshida T., Mukoyama H., Furuta H. [et al.] Association of BoLA-DRB3 alleles identified by a sequence-based typing method with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Animal Science Journal*. 2009. V.80. №5. P.498-509. doi: 10.1111 / j.1740-0929.2009.00663.x.
19. Pashmi M., Qanbari S., Ghorashi S.A., Salehi A. PCR based RFLP genotyping of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 in Iranian Holstein population. *Pakistan Journal Biology Science*. 2007.

V.10. №3. P.383-387. doi:10.3923/ pjbs. 2007.383.387.

20. Mota A.F., Gabriel J.E., Martinez M.L. et al. Coutinho Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). *Euro Journal Immunogenetic*. 2002. V.29. P.223-227.

21. Kulberg S., Heringstad B., Guttersrud O.A., Olsaker I. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2007. V.124(4). P.201-207. doi:10.1111/j. 1439-0388.2007.00662.x.

22. Sharma N., Rho G.j., Hong Y., Kang T., Lee H., Hur T., Jeong D., Rho G., Hong Y., Kang T., Lee S.-H., Hur Y. Bovine mastitis: an Asian perspective. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2012. V.7. P.454-476. doi: 10.3923/ ajava.2012.454.476.

GENETIC CONTROL OF SUSTAINABILITY OF COWS TO MASTITIS

T. Supovych, R. Kolinchuk

*The results of the study of alleles of the BoLA-DRB3 gene, which have associations with cow mastitis and can serve as DNA markers of this disease. The allele spectrum of the BoLA-DRB3 gene was studied using PCR-RLFP. It is determined that the cows in the Ukrainian black-and-white dairy cattle determines 28 alleles of the BOLA-DRB3 gene with an average frequency of detection of 3.57%. Most often, the allele BoLA-DRB3 *22 (19.1%) was determined. In a group of susceptible cows, 24 allele (average frequency is 4.17%) was revealed. Alleles BoLA-DRB3 *16, *25, *31 and *36 were not manifested at all. Among the cows resistant to the masters of animals identified 27 alleles. The average frequency of the manifestation was 3.7%. Never detected allele *41. The presence of two alleles (* 24 and * 26) has been established that have a close relationship with the tendency to mastitis and two alleles (*13 and *22), that are associated with resistance to diseases of the mammary gland of cows.*

Keywords: cows, mastitis, BoLA-DRB3 gene, alleles.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ УСТОЙЧИВОСТИ КОРОВ К МАСТИТАМ

Т. Супрович, Р. Колинчук

*Приведены результаты исследования аллелей гена BoLA-DRB3, которые имеют ассоциации с маститами коров и могут служить ДНК-маркерами данного заболевания. Аллельный спектр гена BoLA-DRB3 изучали с помощью ПЦР-ПДРФ. Определено, что у коров украинской черно-рябой молочной породы определяется 28 аллелей гена BoLA-DRB3 со средней частотой выявления 3,57%. Чаще всего определялся аллель BoLA-DRB3 *22 (19,1%). В группе восприимчивых к маститу коров выявлено 24 аллеля (средняя частота 4,17%). Аллели BoLA-DRB3*16, *25, *31 и *36 не проявлялись вообще. Среди коров устойчивых к маститу животных выявлено 27 аллелей. Средняя частота проявления составила 3,7%. Ни разу не выявлялся аллель *41. Установлено наличие двух аллелей (*24 и *26), имеющих тесную связь со склонностью к маститам и двух аллелей (*13 и *22), которые ассоциируются с резистентностью к заболеваниям молочной железы коров.*

Ключевые слова: коровы, мастит, ген BoLA-DRB3, аллели.