

УДК 575:636.2

Супрович Т.М.

д.с.-г.н., професор

кафедра мікробіології, фармакології і гігієни тварин
Подільський державний аграрно-технічний університет

Кам'янець-Подільський, Україна

E-mail : suprovycht@gmail.com**Супрович М.П.**

к.т.н., доцент

кафедра охорони праці та фізичного виховання
Подільський державний аграрно-технічний університет

Кам'янець-Подільський, Україна

E-mail : kokas2008@ukr.net**Копилов К.В.**

д.с.-г.н., професор

Інститут розведення і генетики тварин ім. Зубця НААН
с. Чубинське, Київська обл., Україна**E-mail** : kopylki@ukr.net**Колінчук Р.В.**

аспірант

Подільський державний аграрно-технічний університет

Кам'янець-Подільський, Україна

E-mail : kolinchuk2014@mail.ru

ГЕНЕТИЧНА ПОДІБНІСТЬ УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ТА ГОЛШТИНСЬКИХ ПОРІД ЗА ГЕНОМ *VoLA-DRB 3.2*

Анотація

Для оцінки генетичної мінливості застосовуються ДНК-маркери. Другий екзон гена *VoLA-DRB3* ВРХ досить високополіморфний, що допускає використання його алелів для визначення генетичної різноманітності. Для підвищення молочної продуктивності української чорно-рябої молочної породи широко використовується спадковий матеріал голштинської породи. Виявлені у власних дослідженнях аельний спектр породи за геном *VoLA-DRB3.2* та його порівняння з аелофондом Голштинів та голштинізованих порід дозволяють встановити генетичну подібність популяцій ВРХ, оцінити напрямок селекційної роботи та її достовірність.

Дослідження виконано на племінному заводі ТОВ «Козацька долина 2006», де проводиться інтенсивна голштинізація стада з використанням сперми бугаїв голштинської породи. Досліди проведено з інтервалом у 5 років, відповідно: 2010 (162 голови) і 2015 (114 голів). Аельний спектр гена *VoLA-DRB3.2* виявляли при допомозі двоетапної (праймери HLO-30, HLO-31 і HLO-32) та аель-специфічної ПЛР. Рестрикцію проводили ендонуклеазами *RsaI*, *HaeIII*, *BstYI*. Отримані фрагменти розділяли за допомогою електрофорезу в 4% агарозному гелі. Для аналізу визначали частоти алелів, генетичні дистанції і подібність. Статистичний обробіток даних і кластерний аналіз з побудовою дендрограм проводили в стандартному пакеті Microsoft Excel та інтегрованої надбудови StatistiXL 2.0. Наслідки голштинізації виявляли порівнянням генетичних дистанцій одинадцяти популяцій Голштинської та голштинізованої худоби інших країн розраховані на основі частот алелів.

Селекційні заходи останніх п'яти років призвели до появи в генотипі стада 4 нових алелів: *06, *14, *19 і *51. Спостерігається накопичення «інформативних» алелів, характерних для Голштинів *16 (з 0,62 до 5,26%) і *24 (з 11,7 до 18%) та елімінація аеля *22 (з 12 до 7,89%).

Між стадами 2010 і 2015 років з'явилася генетична розбіжність ($D = 0,081$). Одночасно зросла генетична спорідненість популяції 2015 року з Голитинами та голитинізованими породами інших країн. Це підтверджується зростанням генетичної подібності між цими популяціями в порівнянні з даними для стада дослідженого в 2010 році, а також дендрограмами, побудованими на основі кластерного аналізу генетичних відстаней.

Проведені дослідження і порівняння підтверджують позитивний результат селекційних заходів, спрямованих на голитинізацію місцевої популяції чорно-рябої породи. Однак, на даний час вона все ще зберігає значний рівень генетичної різноманітності.

Ключові слова: українська чорно-ряба молочна порода, Голитини, голитинізовані породи (holstein breed), ген BOLA-DRB3.2, алелі, генетична подібність, генетична дистанція.

Вступ. Генетична структура популяцій контролюється при допомозі різних поліморфних систем. За їхньою допомогою виявляється ступінь генетичної подібності порід, популяцій і стад, що дозволяє оцінити результати селекційної роботи. Порівняння генетичної структури різних груп тварин в сукупності з аналізом динаміки продуктивних якостей служить критерієм вибору селекційної стратегії [1].

Сьогодні найбільш об'єктивним та інформативним критерієм для оцінки генетичної мінливості в популяціях є ступінь різноманітності поліморфних генів. З появою полімеразно-ланцюгової реакції з'явилася можливість досліджувати поліморфні системи на молекулярному рівні. Найперспективнішим виявилось використання в якості маркерних систем поліморфних нуклеотидних послідовностей ДНК (ДНК-маркери), які дозволяють тестувати генетичний поліморфізм безпосередньо на рівні генів, а не їх продуктів. Молекулярні маркери – це фрагменти ДНК, які займають певне місце в геномі. При їх допомозі вирішується проблема насичення генома маркерами і маркування практично любых ділянок ДНК [2, 29].

Ген BoLA-DRB3 кодує антигени класу II головного комплексу гістосумісності ВРХ. Другий екзон гена досить високополіморфний, що дозволяє використовувати його алелі у якості генетичних маркерів, в тому числі для визначення генетичної різноманітності молочних стад.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Використання у породотворенні генофонду кращих світових порід є об'єктивним процесом, який зумовлений соціально-економічними чинниками. Він спостерігається у більшості країн, де розвинене молочне скотарство [3]. Останніми роками із-за необхідності поліпшення молочної продуктивності спостерігається новий виток голштинізації існуючих стад, в тому числі й української чорно-рябої молочної породи (УЧРМ).

Її створено завдяки цілеспрямованому селекційному процесу, методом складного відтворного схрещування. В структуру породи входить п'ять внутрішньопородних (центрально-східний, поліський, західний, південний і сумський) та п'ять заводських типів (київський, харківський, подільський, придніпровський, придністровський). Серед заводських типів значне місце займає подільський заводський тип, який формувався за рахунок відтворного схрещування вихідного маточного поголів'я чорно-рябої худоби з бугаями голландської, датської, німецької, канадської та американської селекції [4].

У генофонді УЧРМ породи поєднується різнорідний спадковий матеріал. На початковому етапі селекційної роботи одним з основних методів оцінки племінного матеріалу за походженням була його характеристика за частками крові вихідних порід. На даний час в активній частині породи частка генетичної інформації поліпшуючої голштинської породи складає в середньому 0,67, а в різних лініях – від 0,54 (в лінії Елевейшна) до 0,84 (в лінії Суддина). Зараз найпоширенішими є наступні голштинські лінії: Чіфа, Елевейшна, Астронавта, Бутмейкера, Віс Бек Айдіала тощо [5].

Складний процес створення популяції чорно-рябої худоби в Україні сприяв формуванню зональних масивів, досить різних за рівнем продуктивних ознак –

молочною продуктивністю, жирномолочністю, типом будови тіла, резистентністю до захворювань тощо. Результативність схрещування з голштинами за цими ознаками неоднозначна і потребує дослідження в кожному конкретному регіоні, а також у порівнянні з іншими голштинізованими породами.

Останні розробки в галузі молекулярної біології дозволяють використовувати генетичні маркери для поліпшення виробничих якостей сільськогосподарських тварин. Алелі гену BoLA-DRB 3.2 у якості ДНК-маркерів, застосовуються в багатьох дослідженнях ВРХ. Найбільшого поширення вони набули в зв'язку з пошуком асоціацій «алель – захворювання». Виявлено алелі тісно пов'язані з лейкозом [6,7,8], маститом [9,10,11,12], вмістом соматичних клітин в молоці [13,14,15], некробактеріозом [16] тощо. Активно проводяться дослідження впливу гену BoLA-DRB3.2 на господарсько-корисні ознаки ВРХ [17, 29]. Встановлено, що наявність в генотипі корови алелів BoLA-DRB 3.2 *22 і *11 впливає на жирність молока, *22 і *24 – на кількісні показники в ньому білка [18]. Алелі *11 і *23 зумовлюють підвищену молочну продуктивність [10].

Генетичний поліморфізм це різноманітність популяцій за ознаками генетичної природи. Вона розглядається як важливий компонент генетичної характеристики популяції, породи або виду. Генетична різноманітність, в залежності від вибору генетичних маркерів, характеризується кількома вимірюваними параметрами: генетична відстань або подібність (схожість), середня гетерозиготність, число алелів на локус. Оцінка різноманітності алелів високополіморфних генів може зрівнятися з оцінкою близько десятка двох- або трьохалельних генів. Тому використання результатів аналізу тільки по одному гену BoLA-DRB3 досить для оцінки рівня біорізноманітності популяції в цілому та порівняння стад різних господарств або порід між собою [19].

Останнім часом зростає кількість публікацій, в яких алель не різноманітності гену BoLA-DRB 3.2 використовується для оцінки генетичної подібності різних популяцій ВРХ [19–23, 29]. В зв'язку з останніми дослідженнями алельного спектру означеного гену для УЧРМ з'явилася можливість провести порівняльний генетичний аналіз породи та виявити наслідки голштинізації на сучасному етапі її селекції. Також відомості про генетичну різноманітність стад і порід великої рогатої худоби за геном BoLA-DRB 3.2 представляють самостійний науковий інтерес.

Мета. Визначення генетичної подібності голштинізованих порід ВРХ та оцінка генетичної різноманітності української чорно-рябої молочної породи за геном BoLA-DRB 3.2.

Методологія дослідження. Виробничі дослідження проведено в ТОВ «Козацька долина 2006» Дунаєвського району Хмельницької області. У 2014 році господарству надано статус племінного заводу української чорно-рябої молочної породи (наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України та Національної академії аграрних наук України від 11 вересня 2014 р. № 344/197). Дослідні вибірки корів склали: 2009-2010 рік – 162 голови, 2015 рік – 114 голів.

Алельний спектр гена BoLADRB 3.2 встановлювали при допомозі ПЛР із застосуванням готових наборів «Gen PakR PCR Core», ТОВ «Лабораторія Ізоген». Для ампліфікації екзона 2 гену BoLA-DRB3 використовували двоетапний метод ПЛР із застосуванням праймерів HLO-30, HLO-31 і HLO-32 та алель-специфічну ПЛР. Рестрикцію фрагменту екзона 2 проводили ендонуклеазами RsaI, HaeIII, BstYI. Отримані фрагменти розділяли за допомогою електрофорезу в 4% агарозному гелі [26]. Всього методами ПЛР-ПДРФ і АС-ПЛР типуються 54 алеля.

Частоти алелів визначали шляхом прямого підрахунку, враховуючи, що в гомозиготі міститься два однакових алелі.

Генетичну дистанцію (відстань) розраховували за формулою:

$$D = -\ln I, \quad (1)$$

де I - генетична подібність;

$$I = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}} \quad (2)$$

де x_i і y_i - частоти i -го алеля в порівнюваних популяціях X і Y .

Статистичний обробіток даних і кластерний аналіз з побудовою дендрограм проводили в стандартному пакеті Microsoft Excel з використанням інтегрованої надбудови програми Statisti XL 2.0 (<http://www.statistixl.com/>).

Результати. Дослідження біорізноманіття наявних порід великої рогатої худоби та їх генетична диференціація є однією з найважливіших проблем генетики сільськогосподарських тварин. В даний час повсюдно відбувається збіднення генофонду ВРХ. Інтенсивна селекція спрямована на створення високопродуктивної молочної худоби привела до тотального переважання однієї породи – голштинської. Чисельність інших порід, особливо аборигенних, різко скорочується, що веде до зниження загального генетичного різноманіття ВРХ.

Голштинізація молочних стад продовжується і в нашій країні. Українська чорно-ряба молочна порода найбільш поширена в Україні. Зараз вона розвивається як «відкрита популяція» і з кожним роком для відтворення високопродуктивного маточного поголів'я все частіше залучають чистопородних бугаїв-плідників голштинської породи.

Аналогічна ситуація характерна для господарства, в якому проводилися дослідження. Для підвищення молочної продуктивності наявного стада використовується сперма бугаїв голштинської породи ліній Чіфа 142738162 (40%), Старбака 35279097 (35%) і Елевейшна 502043 (25%), а також закуповується ремонтний молодняк в племінних заводах.

Для порівняння генетичної різноманітності Голштинів та голштинізованих стад ВРХ визначено алейний спектр гену BoLA-DRB 3.2 для УЧРМ у 2010 і 2015 роках (відповідно УЧРМ10 і УЧРМ15), а також використані дані літературних джерел, де є вичерпна інформація про частоти даного алеля для різних популяцій світових порід (табл. 1). Всі популяції представлені в таблиці (крім чистопородних Голштинів Канади і США), мають у своєму генотипі певну частку голштинської «крові», тобто створені внаслідок селекції місцевих порід з Голштинами.

Таблиця 1

Значення частот алелів гену BoLA-DRB3.2 для різних популяцій ВРХ

Алелі BoLA-DRB3.2	УЧРМ [*]		Голштини та голштинізована худоба									Середнє	
	2010 ¹ (n=162)	2015 ² (n=1114)	Канада (n=835) ³	США (n=1100) ⁴	Іран (n=250) ⁵	РФ (n=524) ⁶	Польща ^{**} (n=752) ⁷	Аргентина ^{***} (n=424) ⁸	Болівія ^{***} (n=159) ⁸	Парагвай ^{***} (n=127) ⁸	Перу ^{***} (n=123) ⁸		Чилі ^{***} (n=113) ⁸
*01	1,54	0,88		9,0	0,2			0,1	1,9		1,1		0,58
*02	2,47	1,75	0,4	0,27	1,0		2,88						0,88
*03	5,86	5,26	5,2	3,96	5,0	3,1	13,7	5,0	10,7	6,3	6,0	8,8	7,89
*04	2,16	1,75											0,39
*05			2,0										0,20
*06		0,44	0,7			0,1		0,50	0,9	0,4		0,4	0,34
*07	4,94	4,39	2,6	5,32	4,4	0,9		3,2	2,8	6,7	2,3	3,5	4,10
*08	7,41	6,14	20,1	14,1	26,6	7,8	13,6	7,3	4,7	5,1	9,8	8,0	13,1

Продовження табл. 1

*09				0,45		1,0		2,0	0,3	2,0			0,58
*10	5,25	6,14	0,9	1,36	0,6	4,0	2,13	3,4	0,3	1,2	1,9	1,3	2,85
*11	1,54	0,88	14,9	8,51	10,4	4,4	3,1	7,6	15,4	8,3	6,7	8,9	9,06
*12	3,7	2,63	0,2	3,14	2,6	3,4	2,08	2,6	1,3	3,2	3,0	2,2	3,01
*13	5,25	3,51	0,2	0,27	0,8	0,16							1,02
*14		0,88	0,4	0,27	0,8	0,8							0,31
*15	1,85	1,75	0,8	0,64	1,2	0,8		0,4		0,8		1,3	0,95
*16	0,62	5,26	9,2	10,01	9,6	17,0	5,65	14,7	18,2	17,7	21,4	21,7	15,1
*17			0,2	0,14									0,03
*18	2,47	1,75	0,5	0,64		0,6		2,2	3,1	1,2	1,9	0,9	1,53
*19		0,88	0,2			0,16							0,12
*20	0,93	0,88	0,4	0,32	1,0			0,1	2,2	0,4	0,4		0,66
*21	1,85	1,32	0,5	0,96	1,0	0,47		1,8	0,3	0,8		0,4	0,94
*22	12,0	7,89	13,7	14,3	3,2	20,1	9,91	12,1	11,3	16,5	16,9	11,9	15,0
*23	1,85	4,39	6,4	9,1	4,4	1,1	4,85	7,7	4,7	6,7	5,3	4,9	7,04
*24	11,7	18,0	19,2	14,3	19,6	16,4	18,9	17,7	5,7	17,7	11,7	12,4	18,3
*25	0,62	0,44		0,23	0,2	4,1							0,56
*26	4,32	2,19	1,4	2,32		1,1		1,7	10,4	0,4	0,4	1,3	2,55
*27			0,8	3,69	1,4	2,2		3,9	1,6	2,0	8,3	9,7	3,36
*28	7,72	7,46	0,6	1,36	0,4	1,1	5,05	1,9	1,6	0,4	1,1	2,2	3,09
*30			0,2										0,02
*31	0,62	0,44								0,8			0,19
*32	3,09	2,19			1,2								0,65
*34			0,2						0,3				0,05
*35			0,2										0,02
*36	3,09	3,07			0,6								0,68
*37	3,40	3,51			0,8								0,77
*38							3,76						0,38
*41	0,62	0,44						0,2		0,4			0,17
*42	0,62	0,88						0,1		0,4			0,20
*43								0,1					0,01
*45										0,8			0,08
*48	2,47	1,75			1,0								0,52
*49								0,1			0,4		0,05
*51		0,88			1,8								0,27
*54					0,2								0,02

*власні дослідження

** голштинно-фризька порода; не враховано алелі з частотою <2%, а також сіквенси *gba (3,4%), *jba (0,8%), *jbb (3,66%), *nbd (3,32%)

*** не враховано алелі *1104, *2006, *4401, *4501 (загальна частота <2,5%)

¹Супрович та інші. [9], ²Супрович та інші. [16], ³Sharif та інші. [13], ⁴Dietz та інші. [14], ⁵Nassiry та інші. [24],⁶Ковалюк та інші. [8] (усереднені дані декількох стад по алелям *01 – *40), ⁷Oprzqdek та інші. [25],⁸Takeshima та інші. [23].

Будь-яка популяція тварин, природна або штучна, завжди перебуває в стані постійного динамічного розвитку. Відбувається перерозподіл генних частот, зміщення генетичної рівноваги в один або інший бік, елімінація генів [28].

У представлених порід з 54 можливих виявляється тільки 44 алеля (відсутні *29, *33, *39, *40, *44, *46, *47, *50, *52, *53). Найбільша їх кількість визначалася в стаді УЧРМ15 (32), найменша у голштинів Перу і Чилі (по 17). Середнє значення (без врахування польської худоби) складає 23,6. Інформативність алелів становить 43,8 і 53,7% у перерахунку на загальну та виявлену їх кількість.

При вивченні алельного спектру основну увагу звертають на «інформативні» алелі, які визначаються з частотою понад 5% (в табл.1 виділено жирним шрифтом). Всього в генотипах розглянутих стад нараховується 7 таких алелів з загальною частотою

85,5% (назвемо їх умовно «голштинізовані»). Для УЧРМ маємо наступні дані: 2010 рік – 7 (55,3%), 2015 рік – 7 (54,4%). Нижча частка консолідованих алелів у вітчизняної популяції зумовлюється значно ширшим алелофондом, що характерно для «відкритих популяцій».

Найбільш розповсюдженими у Голштинів та голштинізованої худоби є алелі *24 (18,3%), *16 (15,1%), *22 (15,0%), *08 (13,1%) і *11 (9,06%). Алелі *22 і *24 також найчастіше виявляються в популяції УЧРМ, а *03 і *08 зустрічаються з частотою понад 5%.

Генеалогічний аналіз родоводів тварин голштинської породи в усіх країнах замикається на 20 бугаїв-засновників. При дії таких чинників, як міграція генів, відбір, інбридинг, прихований генетичний вантаж популяцій здатний різко змінювати частоту виявлення й доставляти чимало проблем, стаючи реальністю. Таким чином, алелофонди початково різних порід з часом стають все більш однаковими й генетично однорідними [8]. Тому генетична картина популяції може суттєво змінитися за невеликий проміжок часу, особливо коли в неї штучно та цілеспрямовано вводиться однаковий генетичний матеріал. З'являються нові алелі, відбувається накопичення одних та елімінація інших.

Якщо північно-американські Голштини є материнською породою до інших розглянутих в дослідженні, то варто розглянути співвідношення їх алельного різноманіття з відповідним спектром УЧРМ. У Голштинів Канади і США (середнє значення) виділяються 6 алелів з частотою понад 5%: *8 (17,1%), *11(11,7%), *16(9,61%), *22(14%), *23(7,75%) і *24(16,8%). Загальна частота «інформативних» алелів 76,9%.

Селекційні заходи останніх п'яти років призвели до появи в генотипі УЧРМ корів 4 нових алелів: *6, *14, *19 і *51 та суттєвої зміни частот деяких з них. Частка кожного з 4 нових алелів не перевищує 0,88%, що швидше всього свідчить про випадковість появи цих алелів в генотипі тварин. З них тільки алель *14 зустрічається в обох північноамериканських породах, але і там його чисельність дуже низька. Зате досить помітні відхилення частотного спектру. Найбільші зміни частоти типування відмічаються для наступних «інформативних» алелів голштинів: зростання *16 (з 0,62 до 5,26%) і *24 (з 11,7 до 18%); скорочення – *22 (з 12 до 7,89%). Тільки один алель *24 по ступеню поширення відповідає голштинським, а всі інші займають значно менше місця в генотипі УЧРМ. Це означає, що незважаючи на масштабну голштинізацію місцева популяція ВРХ все ще зберігає значний рівень генетичної різноманітності [23].

Для з'ясування філогенетичних взаємин між різними видами організмів використовуються метод визначення еволюційної відстані(дистанції), заснований на порівнянні нуклеотидних послідовностей гомологічних генів або амінокислотних послідовностей відповідних білків. Цей метод базується на припущенні, що генетична відмінність виникає за рахунок мутацій і генетичного дрейфу. Запропонований в 1972 році М. Nei спосіб, де одиницею генетичної відстані є число генних замін на локус, базується на вимірах кількості нуклеотидних або амінокислотних замін в локусі, що виникли після розходження двох розглянутих популяцій. При відомих частотах алелів певного гену двох популяцій генетична відстань покаже фактичну оцінку середнього числа замін алелів в кожному локусі, які відбулися за час їх роздільної еволюції, виражену у числовій формі.

Генетичні дистанції та генетичну подібність одинадцяти популяцій голштинської та голштинізованої худоби розраховані на основі частот алелів BoLA-DRB 3.2 за формулами 1 і 2 представлено в табл. 2.

Генетична подібність стада УЧРМ за спектрами гену BoLA-DRB 3.2 отриманими в 2010 і 2015 році в порівнянні з популяціями Голштинів і голштинізованих порід має суттєві розбіжності. Перш за все необхідно відмітити, що за 5 років відбулися певні

зміни алельного різноманіття в стаді УЧРМ породи, що підтверджується генетичною подібністю нарівні $I = 0,922$. В алельному фонді стада змінилося близько 8% алелів. Чим пояснити такий помітний «генетичний дрейф»? Очевидно, що зміна алелофонду відбулася за рахунок інтенсивної селекційної роботи з популяцією.

Таблиця 2

Генетична подібність (ГП) та генетичні дистанції (ГД) у досліджених стад великої рогатої худоби (по M. Nei)

ГП ГД		досліджені стада великої рогатої худоби										
		УЧРМ10	УЧРМ15	Канада	США	Іран	РФ	Польща	Аргентина	Болівія	Парагвай	Перу
УЧРМ10	-	0,922	0,708	0,758	0,634	0,702	0,791	0,722	0,547	0,691	0,624	0,594
УЧРМ15	0,081	-	0,753	0,795	0,718	0,78	0,854	0,838	0,559	0,787	0,691	0,691
Канада	0,346	0,284	-	0,953	0,926	0,831	0,864	0,888	0,737	0,846	0,818	0,804
США	0,278	0,23	0,048	-	0,863	0,918	0,848	0,944	0,775	0,917	0,901	0,875
Іран	0,456	0,332	0,076	0,148	-	0,682	0,829	0,782	0,589	0,71	0,707	0,717
РФ	0,354	0,248	0,186	0,086	0,382	-	0,781	0,95	0,755	0,948	0,933	0,882
Польща	0,235	0,158	0,146	0,165	0,188	0,247	-	0,837	0,622	0,788	0,744	0,746
Аргентина	0,326	0,177	0,119	0,057	0,246	0,051	0,178	-	0,811	0,974	0,935	0,932
Болівія	0,604	0,582	0,305	0,256	0,53	0,281	0,475	0,209	-	0,825	0,839	0,871
Парагвай	0,369	0,239	0,167	0,086	0,342	0,053	0,238	0,026	0,192	-	0,938	0,928
Перу	0,471	0,37	0,201	0,105	0,347	0,069	0,296	0,068	0,175	0,064	-	0,977
Чилі	0,52	0,369	0,218	0,134	0,333	0,125	0,293	0,07	0,138	0,075	0,023	-

Оцінка напряму генетичної дивергенції стає помітною при порівнянні подібності стада УЧРМ15 з породами представленими в табл. 2. Селекційні заходи в господарстві привели до того, що генетична схожість з північноамериканськими голштинами канадської селекції зросла з 0,708 до 0,753 (6,36%), американської з 0,758 до 0,795 (4,88%). Збільшення генетичної подібності спостерігається й в порівнянні з іншими голштинізованими популяціями. Ріст значення I складає від 2,9% для болівійської популяції до 16,3% для чилійської худоби. Зрозуміло, що таке зростання спорідненості різних популяцій можливо лише при внесенні в їх генотип однакової спадкової інформації, в даному випадку голштинської. Аналогічні наслідки виявлено при порівнянні генетичних дистанцій досліджених популяцій, що свідчить про насичення стада УЧРМ породи спадковим матеріалом голштинської селекції, тобто голштинізація популяції дійсно відбувається.

Візуалізація філогенезу здійснюється за допомогою дендрограм. По суті це спеціальний механізм для відображення послідовних зв'язків між об'єктами за результатами кластерного аналізу, проведеного ієрархічними методами. Результати кластерного аналізу використовуються для оцінки розбіжності різних популяцій, які виникають під тиском селекційного процесу. В нашому дослідженні дендрограма показує ступінь генетичної близькості окремих популяцій, а також наочно демонструє в графічному вигляді послідовність їх об'єднання.

На рис. 1 показано дві дендрограми, побудовані за даними генетичних дистанцій з

використанням методу незваженого попарного арифметичного середнього (UPGMA) (табл. 2). Дендрограма на рис. 1а побудована за даними генетичних дистанцій визначених відносно популяції УЧРМ10, а на рис. 1б – популяції УЧРМ15.

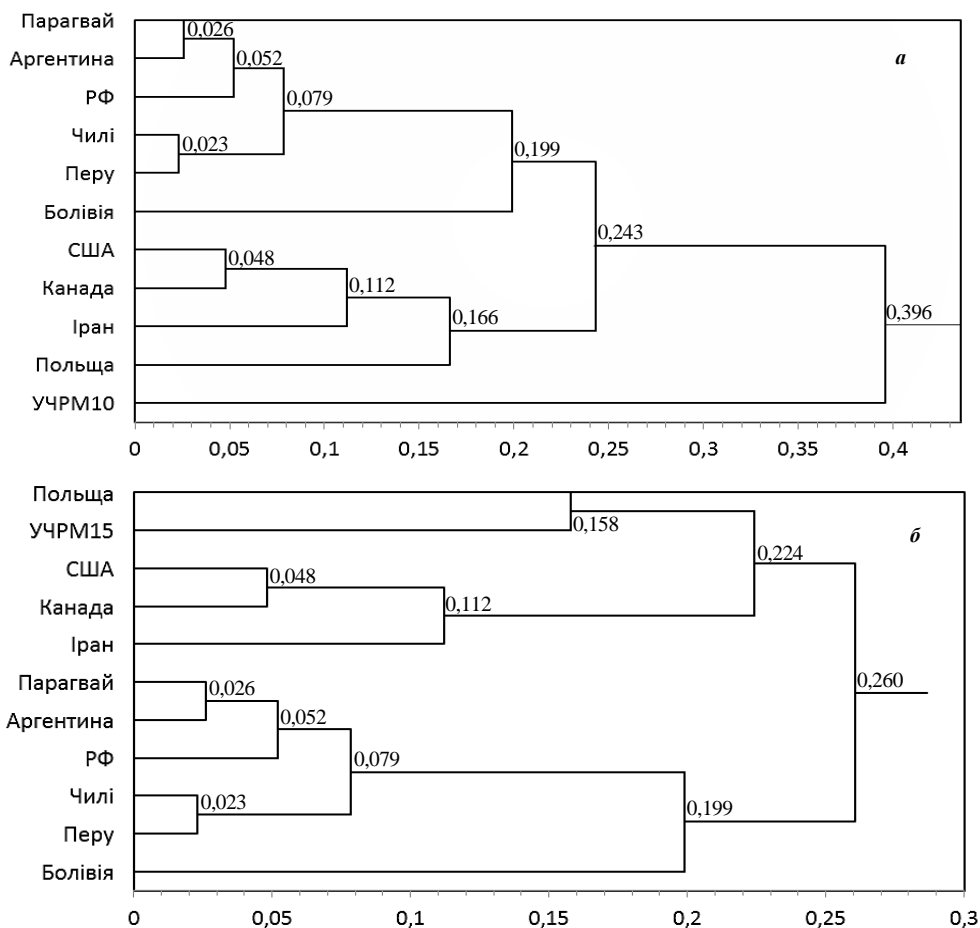


Рис. 1. Дендрограми генетичних взаємовідносин між популяціями УЧРМ10 (а), УЧРМ15 (б) і дослідженими стадами ВРХ за даними генетичних дистанцій (Cophenetic Correlation: $R_a=0,757, R_b=0,631$; DF= 53; P=0. Distance Matrix; Cluster Method = Group Average (UPGMA))

На верхній діаграмі виділяється три кластери, які вказують на мінімальну генетичну дивергенцію між популяціями: Чилі-Перу (0,023), Аргентина-Парагвай (0,026), Канада-США (0,048). Поєднання цілком логічні з точки зору географічного розташування країн. Виняток полягає лише в тому, що об'єднання в єдиний кластер голштинської популяції з Росії та кластеру Аргентина-Парагвайне має логіки. Маємо хибне рішення, суть якого полягає в тому, що алелофонд даного стада визначався лише за алелями *01–*40. Аналогічні результати отримані в дослідженні Takeshima та інш. (2015) для південноамериканських популяцій [22]. Вони об'єднуються в єдиний пул на рівні $D = 0,199$. Такий союз має консеквентне розуміння, тому що креольська худоба є

материнською породою більшості південноамериканських популяцій. Болівійська популяція генетично найбільше віддалена від південноамериканських, так як розводиться у гірських районах, має іншу материнську породу і її голштинізація розпочалася найпізніше.

У другому великому кластері на рівні $D = 0,166$ сполучені Голштини, польська голштино-фризька та іранська голштинська худоба. Географічний чинник в цьому випадку не має сенсу. Спорідненість корів в даному кластері пояснюється досить тривалими термінами та інтенсивністю голштинізації стад, що призвело до накопичення генів північноамериканської породи.

Досліджене в 2010 стадо УЧРМ мало найменшу спорідненість з розглянутими популяціями. Дещо змінилася ситуація за останні 5 років в зв'язку з проведеними селекційними заходами. На діаграмі 1б, як і в першому випадку, вирізняється три анологічних кластери першого ієрархічного рівня з однаковими значеннями D . Також, цілком без змін залишається кластер, в якому об'єднуються південноамериканські популяції ВРХ.

В другій частині діаграми відбувається зміна зв'язків між дослідженими стадами. З'являється новий кластер першого рівня, в якому об'єднуються УЧРМ15 і польська голштино-фризька популяції. Їх спорідненість необхідно шукати в попередніх етапах створення чорно-рябої породи на Україні. Як зазначають ряд авторів, на певних стадіях формування чорно-рябої породи інтенсивно використовувалася остфризька худоба німецької селекції [30] і плідники британо-фризької чорно-рябої породи [4]. Чому при голштинізації стада УЧРМ в ньому проявилася спорідненість з остфризьким алелофондом? Аналіз частот «інформативних» алелів гену *BoLA-DRB 3.2* польської худоби показує, що вони знаходяться на рівні відповідних алелів голштинів, крім *03, *16, *22 і *28. З них тільки алель *28 має суттєву різницю і співставну величину з частотою УЧРМ15. Очевидно, що в цьому випадку необхідно порівнювати весь спектр алелів між собою, тому що кожен з них, навіть при невисокій різниці в частоті визначення, вносить свій маленький вклад в спорідненість стад. Саме тому генетична дистанція між УЧРМ15 і польською популяцією для кластерів першого рівня найбільша ($D = 0,158$).

Розглянутий кластер на дистанції $D = 0,224$ об'єднується в один пул з кластером Голштини-Іран, який не зазнав змін. Загалом генетична дистанція між Голштинами і УЧРМ15 скоротилася в порівнянні з УЧРМ10 на 42%, що підтверджує інтенсивну селекційну роботу в напрямі голштинізації популяції української чорно-рябої молочної породи.

Висновки і перспективи. Селекційні заходи, спрямовані на покращення молочної продуктивності, шляхом схрещування з биками голштинської породи, які проводилися протягом останніх 5 років у дослідному стаді української чорно-рябої молочної породи, призвели до зміни його генетичного спектру та генетичної подібності за геном *BoLA-DRB3.2*:

1. В алелофонді стада з'явилися 4 нових алеля: *06, *14, *19 і *51.
2. Відбулася кількісна зміна в частотах «інформативних» алелів характерних для голштинських порід. Найбільші відхилення зафіксовані для алелів *16 (з 0,62 до 5,26%) і *24 (з 11,7 до 18%) – зростання і алеля *22 (з 12 до 7,89%) – зменшення.
3. Між стадами УЧРМ10 і УЧРМ15 з'явилася генетична дистанція $D = 0,081$.
4. Генетична спорідненість популяції УЧРМ15 з Голштинами та голштинізованими породами інших країн зросла, що підтверджується збільшенням генетичної подібності між даними популяціями в порівнянні з популяцією УЧРМ10.

Чи є необхідність поглиблювати розпочату селекційну роботу? Адже

голштинізація має і негативні наслідки, які проявляються у зростанні захворюваності, скороченні продуктивного віку, збільшенні витрат на обслуговування стада тощо. Вихід, як завжди, має бути компромісним. Незважаючи на масштабну голштинізацію місцева популяція ВРХ зберігає значний рівень генетичної різноманітності. Вважаємо, що головний напрямок удосконалення сучасної популяції української чорно-рябої молочної породи полягає в консолідації основних селекційних ознак при збереженні достатньо високої генетичної мінливості. Відкрита популяція потребує наукового підходу в селекційній роботі, постійного контролю та диференційованого підходу для різних господарств і регіонів. Голштинізація має бути науково обґрунтованою.

Список використаних джерел

1. Эрнст, Л.К. & Зиновьева Н.А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. Москва: РАСХН, 2008. 508 с.
2. Моисеева, И.Г., Уханов, С.В., Столповский, Ю.А., Сулимова, Г.Е. & Каштанов, С.Н. Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства / отв. ред. И. А. Захаров; Ин-т общ. генетики им. Н.И.Вавилова РАН. Москва: Наука, 2006. 462 с.
3. Пелехатий, М.С. Породоутворювальні процеси в молочному скотарстві України. Вісник аграрної науки. 1994. №11. С.58-64.
4. Богач, Д.В. Селекційно-генетичні аспекти удосконалення тварин подільського заводського типу української чорно-рябої молочної породи за продуктивними і технологічними ознаками. Зоотехнічна наука: історія, проблеми, перспективи [Мат. II міжн. наук.-практ. конф.]. Кам'янець-Подільський: Видавець ПП Зволейко Д.Г. 2012. С.162-163.
5. Новак, І.В. Українська чорно-ряба молочна порода та шляхи її створення. *Наук. вісн. ЛНУВМБТ ім. Гжицького. Львів. 2012. т.14. №3 (53,3). С.113-118.*
6. Удина, И.Г., Карамышева, Е.Е., Туркова, С.О., Орлова, А.Р. & Сулимова, Г.Е. Генетические механизмы устойчивости и чувствительности к лейкозу у айрширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота, установленные на основе распределения аллелей гена BoLA-DRB3. *Генетика. 2003. №3. С.383-396.*
7. Juliarena, M.A., Poli, M., Sala, L., Ceriani, C., Gutierrez, S., Dolcini, G., Rodriguez, E.M., Marino, B., Rodriguez-Dubra, C. & Esteban, E.N. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Animal genetics. 2008. V. 39. P.432-439.*
8. Ковалюк, Н.В. Молекулярно-генетические аспекты в ранней диагностике лейкоза крупного рогатого скота и селекционно-племенной работе: дисс. ... докт. биол. наук : спец. 03.00.23. Дубровицы, Московская область, 2008. 174 с.
9. Супрович, Т.М. & Копилов, К.В. Визначення ДНК-маркерів у схильних та резистентних до маститів корів української чорно-рябої молочної породи. *Розведення і генетика тварин. 2014. № 48. С.214-222.*
10. Rupp, R., Hernandez, A. & Mallard, B. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci. 2007. V.90 (2). P.1029-1038.*
11. Nikbakht, Gh., Ranjbar, M.M. & Ghasemi, F. (2012). Allelic polymorphism in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Iranian Holstein cows. *Animal Production Research, V.1, №2, P.33-41.*
12. Duangjinda, M., Buayai, D., Pattarajinda, V., Phasuk, Y., Katawatin, S., Vongpralub, T. & Chaiyotvittayakul A. Detection of bovine leukocyte antigen DRB3 alleles as candidate markers for clinical mastitis resistance in Holstein × Zebu. *J. Anim. Sci. 2009. №87(2). P.469-476.*
13. Sharif, S., Mallard, B.A., Wilkie, B.N., Sargeant, J.M., Scott, H.M., Dekkers, J.C. & K.E. Leslie. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics. 1998. № 29. P.185-193.*
14. Dietz, A.B., Cohen, N.D., Timms, L. & Kehrli M.E. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci. 1997. V.80(2). P.406-412.*
15. Sender, G., Hameed, K., Korwin-Kossakowska, A., & Sobczynska, M. Association of the BoLA-DRB3 alleles with estimated breeding value for somatic cell count in Polish dairy cattle. *Archiv*

fur tierzucht. 2008. V.51(2). P.111-119.

16. Супрович, Т.М., Супрович, М.П. & Колінчук Р.В. Алельний поліморфізм гена BoLA-DRB3.2 у здорових і хворих на некробактеріоз корів. *Наук.-техн. бюл. ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок Інституту біології тварин*. 2015. Вип. 16(2). С.344-350.

17. Ковалюк, Н.В., Сацук, В.Ф. & Мачульская Е.В. Использование генетических маркеров для повышения молочной продуктивности коров. *Зоотехния*. 2007. № 8. С.2-4.

18. Pashmi, M., Qanbari, S., Ghorashi, S.A. & Salehi, A. PCR based RFLP genotyping of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 in Iranian Holstein population. *Pak. J. Biol. Sci.* 2007. V.10(3). P.383-387.

19. Козлов А.Л. Полиморфизм гена BoLA-DRB3 как маркер оценки генетического разнообразия и устойчивости к вирусу лейкоза молочного скота брянской области : автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук : спец.06.02.07. Ставроп. гос. аграр. ун-т. Ставрополь. 2016. 24 с.

20. Nassiry, M.R., Eftekhari Shahroudi, F., Tahmoorespur, M. & Javadmanesh A. The Diversity of BoLA-DRB3 Gene in Iranian Native Cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2008. Vol. 21(4). P.465-470.

21. Behl, J.D., Verma, N.K., Behl, R. & Sodhi M. Genetic Variation of the Major Histocompatibility Complex DRB3.2 Locus in the Native Bos indicus Cattle Breeds. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2009. Vol. 22(11). P.1487-1494.

22. Takeshima, S.N., Miyasaka, T., Polata, M., Kikuya, M., Matsumoto, Y., Mingala, C.N., Villanueva, M.A., Salces, A.J., Onuma, M. & Y. Aida. The great diversity of major histocompatibility complex class II genes in Philippine native cattle. *Meta Gene*. 2014. Vol. 2. P.176-190.

23. Takeshima, S.N., Giovambattista, G., Okimoto, N., Matsumoto, Y., Rogberg-Muñoz, A., Acosta, T.J., Onuma, M. & Aida Y. Characterization of bovine MHC class II DRB3 diversity in South American Holstein cattle populations. *Tissue Antigens*. 2015. Vol.86(6). P.419-430.

24. Nassiry, M.R., Shahroodi, F.E., Mosafer, J., Mohammadi, A., Manshad, E., Ghazanfari, S., Mohammad Abadi, M. & Sulimova G.E. Analysis and Frequency of Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA-DRB3) Alleles in Iranian Holstein Cattle. *Russian J. of Genetics*. 2005. V.41(6). P.664-668.

25. Oprządek, J., Urtnowski, P., Sender, G., Pawlik, A. & Łukaszewicz M. Frequency of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Polish Holstein cattle. *Animal Sc. Papers and Rep.* 2012. Vol. 30(2). P.91-101.

26. Сулимова, Г.Е. & Зинченко, В.В. Анализ полиморфизма ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции: мет. пособие Москва: Цифровичок, 2011. 94 с.

27. Nei, M. The genetic distance between populations. *American Naturalist*. 1972. Vol. 106. P. 283-295.

28. Димань Т.М. Генетична мінливість біохімічних маркерів у доместикованих та диких видів копитних. *Вісн. аграр. науки*. 2002. № 3. С. 49.

29. Singh, U., Deb, R., Alyethodi, R., Alex, R., Kumar, S., Chakraborty, S., Dhama, K. & Sharma A. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine*. 2014. V.6(2). P.49-58.

30. Піддубна Л.М. Голштинізація відкритої регіональної популяції чорно-рябої молочної худоби та перспективи її подальшого удосконалення. *Біологія тварин*. 2014. Т.16(4). С.121-132.

*Дата надходження статті до редакції : 20.03.2017
1 рецензування 30.03.2017 Прийняття в друк: 15.06.2017*

Suprovych T.M.

Dr. Sc. (in Agriculture), Full Professor

Department of microbiology, pharmacology and hygiene of animals

State Agrarian and Engineering University in Podilya

Kamianets-Podilskyi, Ukraine

E-mail : suprovycht@gmail.com

Suprovych M.P.

Ph.D. (Technics), Associate Professor

Department of Labour Protection and Physical Education

State Agrarian and Engineering University in Podilya

Kamianets-Podilskyi, Ukraine

E-mail : kokas2008@ukr.net

Kopylov K.V.

Dr. Sc. (in Agriculture), Full Professor

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAS

Chubynske, Ukraine

E-mail : kopylkir@ukr.net

Kolinchuk R.V.

Postgraduate

State Agrarian and Engineering University in Podilya

Kamianets-Podilskyi, Ukraine

E-mail : kolinchuk2014@mail.ru

GENETIC SIMILARITIES BETWEEN UKRAINIAN BLACK-SPOTTED MILK AND HOLSHTAIN BREEDS ACCORDING TO THE GENUS BOLA-DRB 3.2

Abstract

DNA markers using to assess the genetic variation. In cattle second exon of gene BoLA-DRB3 is highly polymorphic, allowing the use of its alleles to determine genetic diversity. To increase milk production Ukrainian Black Pied dairy cattle is widely used hereditary material Holstein breed. In their study, we revealed allelic spectrum for gene BoLA-DRB3.2. His comparing with fund of alleles Holstein and holstein breeds we can use to set the genetic similarity of populations of cattle, evaluate the direction and its accuracy.

The study performed at the breeding farm "Cossack Valley 2006". Here intensive carry out selection using semen of bulls Holstein. Experiments conducted at intervals of five years, respectively: 2010 (162 heads) and 2015 (114 heads). The allelic spectrum of gene BoLA-DRB3.2 detected by means of two-step (HLO-30 primers, HLO-31 and HLO-32) and allele-specific PCR. Restriction executed by endonucleases RsaI, Hae III and Bst YI. Received fragments separated by electrophoresis in 4% agarose gel. For the analysis determined the frequency of alleles, genetic distance and similarity. Statistical treatment and cluster analysis for building dendrograms performed in the standard package Microsoft Excel and integrated program Statisti XL 2.0. The consequences of Holstein selection detected by comparing the genetic distances eleven populations Holstein and holstein cattle other countries, which are calculated based on allele frequencies.

*The selection measures over the last five years have led the emergence in genotype of cow's new four alleles: *06 *14 *19 and *51. There is accumulation of "informative" alleles specific to Holstein *16 (from 0,62 to 5,26%) and *24 (from 11,7 to 18%) and the elimination of allele *22 (from 12 to 7,89%). Between 2010 and 2015 in herds appeared a genetic difference ($D = 0,081$). At the same time is increasing the genetic relationship of populations of 2015 and Holstein and holstein breeds other countries. This confirmed by the growth of genetic similarity between populations compared with data for the herds studied in 2010 and dendrograms, building based on cluster analysis of genetic distances. The research and comparisons confirm positive breeding measures using Holstein. However, currently Ukrainian black-pied dairy breed retains a significant level of genetic diversity.*

Keywords: *Ukrainian black-pied dairy breed, Holstein, holstein breed, gene BOLA DRB3.2, alleles, genetic similarity and genetic distance.*

References

1. Ernst, L.K. & Zinov'eva N.A (2008). *Biologicheskije problemy zhivotnovodstva v XXI veke* [Role of biology in the livestock sector development in the xxi century]. Moscow: RASKhN.
2. Moiseeva, I., Ukhanov, S., Stolpovskiy, Yu., Sulimova, G. & Kashtanov S. (2006). *Genofondy sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh: geneticheskie resursy zhivotnovodstva* [Gene pools of farm animals: genetic resources of animal husbandry in Russia] Moscow: In-t obshch. genetiki Vavilova. Nauka.
3. Pelekhayy, M.S. (1994). *Porodoutvoryval'ni protsesy v molochnomu skotarstvi Ukrayiny* [Breed forming processes in dairy farming Ukraine]. *Visnyk ahrarnoyi nauky*, 11, 58-64.
4. Bohach, D.V. (2012). *Selektsiyno-henetychni aspekty udoskonalennya tvaryn podil's'koho*

zavodskoho typu ukrayins'koyi chorno-ryaboyi molochnoyi porody za produktyvnymy i tekhnolohichnymy oznakamy [Selection and genetic aspects improvement of animalspodolsk Ukrainian factory type black-pied dairy breed for the productive and technological features]. *Zootekhnichna nauka: istoriya, problemy, perspektvy*, Kam"yanets'-Podil's'kyy: Vydavets' Zvol'kyo, 162-163.

5. Novak, I.V. (2012). Ukrayins'ka chorno-ryaba molochna poroda ta shlyakhy yiyi stvorennya [Ukrainian black-and-white dairy breed and ways of its creation]. *Nauk. visn. LNUVMBT im. Gzhyts'koho*, 14, 3(53), 3, 113-118.

6. Udina, I.G., Karamysheva, E.E., Turkova, S.O., Orlova, A.R., & Sulimova, G.E. (2003). Geneticheskie mekhanizmy ustoychivosti i chuvstvitel'nosti k leykozu u ayrshirskoy i chorno-pestroy porod krupnogo rogatogo skota, ustanovlenne na osnove raspredeleniya alleley gena BoLA-DRB3 [The genetic mechanisms of resistance and susceptibility to leukemia in ayrshire and black-pied breeds of cattle, established on the basis of the distribution of the alleles of the gene BOLA-DRB3]. *Genetika*, 3, 383-396.

7. Juliarena, M.A., Poli, M., Sala, L., Ceriani, C., Gutierrez, S. ... Esteban E.N. (2008). Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Animal genetics*, 39, 432-439.

8. Kovalyuk, N.V. (2008). Molekulyarno-geneticheskie aspekty v ranney diagnostike leykoza krupnogo rogatogo skota i selektsionno-plemenny rabote. *Doctor's thesis*. Dubrovitsy.

9. Suprovych, T.M., & Kopylov, K.V. (2014). Vyznachennya DNK-markery u skhyl'nykh ta rezystentnykh do mastytiv koriv ukrayins'koyi chorno-ryaboyi molochnoyi porody [Determination of dna-markers for receptive and resistance to mastitis cows of Ukrainian black-pied dairy breed]. *Rozvedennya i henetyka tvaryn*, 48, 214-222.

10. Rupp, R., Hernandez, A., & Mallard B. (2007). Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 90(2), 1029-1038.

11. Nikbakht, Gh., Ranjbar, M.M., & Ghasemi, F. (2012). Asadian Allelic polymorphism in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Iranian Holstein cows. *Animal Production Research*. 1(2), 33-41.

12. Duangjinda, M., Buayai, D., Pattarajinda, V., Phasuk, Y., Katawatin, S., Vongpralub, T. & Chaiyotvittayakul A. (2009). Detection of bovine leukocyte antigen DRB3 alleles as candidate markers for clinical mastitis resistance in Holstein × Zebu. *J. Anim. Sci.* 87(2). P. 469-476.

13. Sharif, S., Mallard, B.A., Wilkie, B.N., Sargeant, J.M., Scott, H.M., Dekkers, J.C., & Leslie, K.E. (1998). Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*, 29, 185-193.

14. Dietz, A.B., Cohen, N.D., Timms, L., & Kehrl, M.E. (1997). Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80(2), 406-412.

15. Sender, G., Hameed, K., Korwin-Kossakowska, A., & Sobczynska, M. (2008). Association of the BoLA-DRB3 alleles with estimated breeding value for somatic cell count in Polish dairy cattle. *Archiv fur tierzucht*, 51(2), 111-119.

16. Suprovych, T.M., Suprovych, M.P. & Kolinchuk R.V. (2015). Alel'nyy polimorfizm hena BoLA-DRB3.2 u zdorovykh i khvorykh na nekrobakterioz koriv [Allelic polymorphism of gene BOLA-DRB3.2 healthy and sick cows with necrobacteriosis]. *Nauk.-tekhn. byul. DNDKI vetpreparativ ta kormovykh dobavok Instytutu biolohiyi tvaryn*, 16(2), 344-350.

17. Kovalyuk, N.V., Satsuk, V.F., & Machul'skaya, E.V. (2007). Ispol'zovanie geneticheskikh markerov dlya povysheniya molochnoy produktivnosti korov [Using genetic markers to improve the productivity of dairy cows] *Zootekhnika*, 8, 2-4.

18. Pashmi, M., Qanbari, S., Ghorashi, S.A. & Salehi A. (2007). PCR based RFLP genotyping of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 in Iranian Holstein population. *Pak. J. Biol. Sci.*, 10(3), 383-387.

19. Kozlov, A.L. (2016). *Polimorfizm gena BoLA-DRB3 kak marker otsenki geneticheskogo raznoobraziya i ustoychivosti k virusu leykoza molochnogo skota bryanskoj oblasti (Candidate's thesis)*. Stavropol'. [in Russian].

20. Nassiry, M.R., Eftekhari Shahroudi, F., Tahmoorespur, M., & Javadmanesh, A. (2008). The Diversity of BoLA-DRB3 Gene in Iranian Native Cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 21(4), 465-470.

21. Behl, J.D., Verma, N.K., Behl, R. & Sodhi, M. (2009). Genetic Variation of the Major

Histocompatibility Complex DRB3.2 Locus in the Native *Bos indicus* Cattle Breeds. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 22(11), 1487-1494.

22. Takeshima, S.N., Miyasaka, T., Polata, M., Kikuya, M., Matsumoto ... Y. Aida (2014). The great diversity of major histocompatibility complex class II genes in Philippine native cattle. *Meta Gene*, 2, 176-190.

23. Takeshima, S.N., Giovambattista, G., Okimoto, N., Matsumoto, Y., Rogberg-Muñoz, A., Acosta, T.J., Onuma, M. & Aida, Y. (2015). Characterization of bovine MHC class II DRB3 diversity in South American Holstein cattle populations. *Tissue Antigens*. 86(6), 419-430.

24. Nassiry, M.R., Shahroodi, F.E., Mosafer, J., Mohammadi, A., Manshad, E., Ghazanfari, S., Mohammad Abadi, M., & G.E. (2005). Analysis and Frequency of Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA-DRB3) Alleles in Iranian Holstein Cattle. *Russian J. of Genetics*. V.41(6), 664-668.

25. Oprządek, J. Urtnowski, P. Sender, G. Pawlik, A., & Łukaszewicz M. (2012). Frequency of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Polish Holstein cattle. *Animal Sc. Papers and Rep.*, 30(2), 91-101.

26. Sulimova, G.E., & Zinchenko, V.V. (2011). *Analiz polimorfizma DNK s ispol'zovaniem metoda polimeraznoy tsepnoy reaktsii: met. Posobie* [Analysis of DNA polymorphism using polymerase chain reaction]. Moscow: Tsifrovichok.

27. Nei, M. The genetic distance between populations (1972). *American Naturalist*, 106, 283-295.

28. Dyman', T.M. (2002). Henetychna minlyvist' biokhimichnykh markeriv u domestykovanykh ta dykykh vydiv kopytynykh [Genetic variability of biochemical markers in domestyc and wild ungulates]. *Visn. ahrar. Nauky*, 3, 49.

29. Singh, U., Deb, R., Alyethodi, R., Alex, R., Kumar, S., Chakraborty, S., Dhama, K. & Sharma, A. (2014). Molecular markers and their applications in cattle genetic research: a review. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6(2), 49-58.

30. Piddubna, L.M. (2014). Holshtynizatsiya vidkrytoyi rehional'noyi populyatsiyi chorno-ryaboyi molochnoyi khudoby ta perspektyvy yiyi podal'shohe udoskonalennya [Holsteinization of open regional population of black-and-white cattle and prospects of its further improvement]. *Biolojiya tvaryn*, 16(4), 121-132.

Received: March 20, 2017

1st Revision: March 30, 2017 Accepted: June 15, 2017