На правах рукописи

ГИЛЬМАНОВ ХАМИД ХАЛИМОВИЧ

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО ГЕНАМ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИМ УСТОЙЧИВОСТЬ К ЛЕЙКОЗУ, И ГЕНОИДЕНТИФИКАЦИЯ ЕГО ЭТИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТА

06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Научный руководитель: **Ахметов Тахир Мунавирович**
доктор биологических наук, профессор

Научный консультант **Вафин Рамиль Ришадович**
доктор биологических наук, профессор РАН

Официальные оппоненты: **Калашникова Любовь Александровна**
доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией ДНК-технологий ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела»

Чернов Альберт Николаевич
доктор биологических наук, заместитель директора по НИР и биологической безопасности ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет»

Защита диссертации состоится «23» апреля 2019 года в 14^{30} часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте http://kazanveterinary.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г. и размещен на сайтах: http://www.vak.ed.gov.ru и http://kazanveterinary.ru

Ученый секретарь
диссертационного совета Резиля Ахметовна Асрутдинова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из приоритетных задач в молочном скотоводстве нашей страны является повышение экономической эффективности отрасли. При этом повышенная молочная продуктивность коров, как правило, сопряжена со снижением устойчивости к различным заболеваниям крупного рогатого скота, что негативно сказывается на процессе производства из-за увеличения стоимости выходной продукции (Гулюкин М.И. и др., 2001; Ingvartsen K.L., 2003), выбраковки животных с клиническими признаками заболевания, а также уменьшения среднего уровня молочной продуктивности по стаду (Erskine R.J. et al., 2012).

В селекционно-племенной работе для формирования популяций высокопродуктивных молочных стад ведется скрининг по различным вариантам генов хозяйственно-значимых признаков (Тюлькин С.В. и др., 2012), в т.ч. определяющих устойчивость к различным заболеваниям, включая лейкоз крупного рогатого скота, этиологическим агентом которого является вирус бычьего лейкоза, циркулирующий на территории и Российской Федерации (Вафин Р.Р. и др., 2014).

Поэтому в системе противолейкозных мероприятий, наряду с применением методов ранней диагностики вируса бычьего лейкоза (Ковалюк Н.В., 2008), особого внимания заслуживает маркер-ориентированная селекция на устойчивость к лейкозу крупного рогатого скота (Удина И.Г. и др., 2003).

Важную роль в резистентности к вирусу бычьего лейкоза играет главный комплекс гистосовместимости (сокр. ГКГ, англ. *MHC, Major Histocompatibility Complex*) (Ellis S. et al., 2012), представленный группой генов, ключевым из которых является *BoLA-DRB3*, ассоциированный с развитием иммунного ответа организма на вирусную инфекцию (Gutierrez S.E. et al., 2017).

Высокий полиморфизм *BoLA-DRB3* (Takeshima S. et al., 2011), чьи аллели связаны с устойчивостью или восприимчивостью к лейкозу крупного рогатого скота (Сулимова Г.Е., 1995; Эрнст Л.К., 1997), позволяет рассматривать анализируемый ген в качестве молекулярного маркера, используемого в селекционно-генетических исследованиях (Зиновьева Н.А., 2006).

В качестве потенциального ДНК-маркера резистентности крупного рогатого скота к лейкозу рассматривается и индуцибельная синтаза оксида азота (*iNOS*), чей аллель *A* и гомозиготный вариант *AA* полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* ассоциирован с устойчивостью, а аллель *B* и генотип *BB* сопряжен с восприимчивостью к инфицированию вирусом бычьего лейкоза (Чичинина С.В., 2005).

Данное направление исследования является актуальным, в том числе в контексте влияния генотипов по генам *BoLA-DRB3* (Туркова С.О., 2003, Ковалюк Н.В. и др., 2010; Гладырь Е.А. и др., 2012, Рузина М.Н., 2012) и

iNOS на показатели молочной продуктивности крупного рогатого скота, до настоящего времени до конца не изученные.

Молекулярно-генетические методы исследования позволяют оценить генетическое многообразие вируса бычьего лейкоза (Donnik I.M. et al., 2016), и являются наиболее информативными подходами к его геноидентификации, как при использовании филогенетического анализа секвенируемых нуклеотидных последовательностей ДНК провируса, так и ПЦР-ПДРФ-анализа в соответствии с филогенетической классификацией возбудителя (Vafin R.R. et al., 2014).

Степень разработанности темы. Изучение гена *iNOS Bos taurus* с описанием его гаплотипов и возможности использования в качестве SNP маркеров для идентификации крупного рогатого скота отражено в работе Heaton M.P. et al. (2002). В работе Чичининой С.В. (2005) осуществлена постановка метода генотипирования маркера AH13-1 гена *iNOS* с использованием локус-специфичной и аллель-специфичной ПЦР с последующей оценкой распределения частот встречаемости аллелей и генотипов этого полиморфизма в изучаемых группах животных в контексте генетической устойчивости и чувствительности к лейкозу крупного рогатого скота. При этом ассоциативная связь генотипов полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* крупного рогатого скота с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности не изучена.

BoLA-типирование методом секвенирование (*SBT, Sequence Based Typing*), как наиболее информативный подход к генотипированию крупного рогатого скота по гену *BoLA-DRB3* впервые отражен в исследовании Miltiadou D. et al. (2003) по расшифровке всего экзона 2 *DRB3*, предварительно амплифицированного в двухраундной ПЦР (nested PCR). В последующем, Baxter R. et al. (2008) оптимизировали протокол проведения PCR-SBT до уровня проведения однораундной ПЦР с применением набора праймеров DRB3FRW и DRB3REV, фланкирующих анализируемый экзон 2 *DRB3*. Позже, Takeshima S.N. et al. (2011), комбинацией двух общеизвестных способов предложил усовершенствованную технику PCR-SBT для *BoLA*-типирования, где праймеры DRB3FRW и DRB3REV, инициирующую амплификацию локуса *BoLA-DRB3*-гена длиной 319 bp, также используются в качестве сиквенсных при расшифровке анализируемой нуклеотидной последовательности каппилярным секвенатором для последующей оценки аллельного полиморфизма анализируемого гена и установления генотипической структуры исследуемой популяции.

Ассоциативная связь групп генотипов *BoLA-DRB3* крупного рогатого скота с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности отражена в трудах Ковалюк Н.В. и др. (2010), Гладырь Е.А. и др. (2012) и Рузиной М.Н. (2012).

Современная филогенетическая классификация ВБЛ регламентирует наличие десяти генотипов, первые семь из которых впервые описаны аргентинскими учеными в 2009 г. (Rodriguez S.M. et al., 2009), восьмой

генотип – исследователями из России (Шаева А.Ю. и др., 2011; Шаева А.Ю. и др., 2012; Вафин Р.Р. и др., 2013), Хорватии (Balić D. et al., 2012) и коллаборацией европейских ученых (Rola-Łuszczak M. et al., 2013) в 2011-2013 гг., девятый генотип – группой японских, чилийских и аргентинских ученых в 2016 г. (Polat M. et al., 2016), и десятый генотип – коллективом исследователей из Южной Кореи и Тайланда (Lee E. et al., 2016), в том же году.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы – оценка полиморфизма генов *iNOS* и *BoLA-DRB3* в их ассоциативной связи с хозяйственно-полезными признаками в контексте научно-методических подходов к генотипированию крупного рогатого скота по аллельным вариантам генов, определяющих устойчивость и чувствительность к лейкозу, а также геноидентификации его этиологического агента – вируса бычьего лейкоза.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

– оценить аллельный полиморфизм гена *iNOS* у исследуемой выборки животных на основе разрабатываемого способа проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* полиморфного маркера AH13-1 анализируемого гена;

– изучить ассоциативную связь генотипов полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков;

– оптимизировать условия проведения ПЦР-амплификации локуса экзона 2 гена *BoLA-DRB3 Bos taurus*, пригодной для дальнейшей процедуры типирования методом секвенирования (SBT);

– оценить аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* в исследуемой выборке быков-производителей с помощью *BoLA*-типирования методом секвенирования (SBT) с установлением генотипической структуры анализируемой популяции животных в контексте генетической устойчивости и чувствительности к лейкозу крупного рогатого скота;

– изучить ассоциативную связь групп генотипов *BoLA-DRB3* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков;

– проанализировать эпизоотическую ситуацию по лейкозу крупного рогатого скота в Республике Татарстан;

– установить генотипическую принадлежность изолятов вируса бычьего лейкоза, циркулирующих в популяциях крупного рогатого скота Республики Татарстан;

– провести типизацию изолятов ВБЛ с расшифрованными нуклеотидными последовательностями фрагмента *env*-гена в зависимости от выбранной стратегии геноидентификации возбудителя;

– усовершенствовать стратегию ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ, согласуемую с современной филогенетической классификацией изучаемого возбудителя.

Научная новизна работы. Разработан способ проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* полиморфного маркера AH13-1 анализируемого гена, а также оптимизированы условия проведения ПЦР-амплификации локуса экзона 2 гена *BoLA-DRB3 Bos taurus* до уровня, пригодного для дальнейшей процедуры типирования методом секвенирования (SBT). Оценен аллельный полиморфизм генов *iNOS* и *BoLA-DRB3* и установлена генотипическая структура анализируемой популяции животных в контексте генетической устойчивости и чувствительности к лейкозу крупного рогатого скота. Изучена ассоциативная связь генотипов полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* и групп генотипов *BoLA-DRB3* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков. Установлена генотипическая принадлежность изолятов вируса бычьего лейкоза, циркулирующих в популяциях крупного рогатого скота Республики Татарстан, в т.ч. на основе усовершенствованной стратегии ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ, согласуемой с современной филогенетической классификацией изучаемого возбудителя.

Теоретическая и практическая значимость работы. Основные положения и выводы научно-квалификационной работы пополняют теоретические данные относительно маркер-ориентированной селекции крупного рогатого скота на устойчивость к лейкозу и геноидентификации его этиологического агента – вируса бычьего лейкоза. Предложенные научно-методические подходы к генотипированию крупного рогатого скота по генам *iNOS* и *BoLA-DRB3*, а также геноидентификации вируса бычьего лейкоза будут внедрены в систему скрининговых исследований поголовья по ДНК-маркерам, определяющим генетическую резистентность и восприимчивость к лейкозу, а также в систему молекулярного мониторинга инфицированности стад генотипами ВБЛ. Изученная ассоциативная связь генотипов полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* и групп генотипов *BoLA-DRB3* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков будет учитываться в селекционно-племенной работе при воспроизводстве молочного стада с генетической устойчивостью к лейкозу крупного рогатого скота.

Методология и методы исследований. При выполнении научно-квалификационной работы использован комплекс общенаучных и специальных методов исследований. Примененные общенаучные методы включали в себя теоретическую (аналогия, синтез, индукция, дедукция) и практическую (наблюдение, сравнение, моделирование) составляющую. В арсенал специальных методов входили зоотехнические, эпизоотологические, молекулярно-генетические методы исследований с применением математических и статистических методов при расчёте количественных показателей, что в совокупности обеспечило получение объективных результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

– Апробацией разработанного способа проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* обеспечена корректная процедура оценки его аллельного полиморфизма и определения генотипической принадлежности исследуемой выборки быков-производителей.

– Изучением ассоциативной связи генотипов полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков выявлена взаимосвязь повышенной молочной продуктивности с генетической восприимчивостью к инфицированию вирусом бычьего лейкоза и заболеванию лейкозом крупного рогатого скота.

– Апробацией оптимизированных условий проведения ПЦР-амплификации локуса экзона 2 гена *BoLA-DRB3 Bos taurus*, пригодной для дальнейшей процедуры типирования методом секвенирования (SBT), обеспечена корректная процедура оценки его аллельного полиморфизма и установления генотипической структуры анализируемой популяции животных в контексте генетической устойчивости и чувствительности к лейкозу крупного рогатого скота.

– Изучением ассоциативной связи групп генотипов *BoLA-DRB3* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков наблюдалась взаимосвязь сниженной молочной продуктивности с генетической резистентностью к инфицированию вирусом бычьего лейкоза и заболеванию лейкозом крупного рогатого скота, а также положительная корреляция между повышенной молочной продуктивностью и генетической предрасположенностью к повышенным объемам удоев.

– Установлением генотипической принадлежности изолятов ВБЛ, циркулирующих в популяциях крупного рогатого скота Республики Татарстан, с использованием ПЦР-ПДРФ и филогенетического анализа секвенируемых последовательностей фрагмента *env*-гена возбудителя констатируется факт циркуляции в исследуемом ареале четырех из десяти открытых генотипов ВБЛ – представителей 1-го, 4-го, 7-го и 8-го генотипов, соответственно.

– Типизацией 505 изолятов ВБЛ с расшифрованными нуклеотидными последовательностями фрагмента *env*-гена в зависимости от выбранной стратегии геноидентификации и последующей оценкой степени согласованности генотипических подходов подтверждена несогласованность ряда использованных ранее стратегий ПЦР-ПДРФ-типизации с нынешним подходом в оценке его генотипического многообразия филогенетическим анализом.

– Усовершенствованной стратегией ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ, согласуемой с его филогенетической классификацией идентифицируются все десять открытых на сегодняшний день генотипов изучаемого вирусного

патогена диагностически значимой интерпретацией генерируемых 57 генотип-ассоциированных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность исследований подтверждена использованием комплекса методов и программ, а также выраженной согласованностью полученных результатов и выводов.

Основные положения диссертации доложены, обсуждены и одобрены: на ежегодных отчётах кафедры технологии животноводства ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» (г. Казань, 2016-2018 гг.); Международной научно-практической конференции «Наука сегодня: глобальные вызовы и механизмы развития» (г. Вологда, 2017 г.); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (г. Санкт-Петербург, 2016-2017 гг.); Международной научно-практической конференции «Вопросы современных научных исследований» (г. Омск, 2018 г.); Международной научно-практической конференции, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова «Инновационно-технологическое развитие пищевой промышленности – тенденции, стратегии, вызовы» (г. Москва, 2018 г.).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 12 статей, в том числе 4 публикации в ведущих рецензируемых научных изданиях рекомендованного перечня ВАК, и 1 публикация в рецензируемом научном издании, входящего в международную реферативную базу данных и систему цитирования (Web of Science / Scopus).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 163 страницах компьютерного текста и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, заключение, практические предложения, список сокращений и условных обозначений, список литературы (196 источников, в т.ч. 73 отечественных и 123 зарубежных) и приложения. Диссертация иллюстрирована 18 рисунками и включает 29 таблиц.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в 2016-2018 годы на базе межкафедральной лаборатории иммунологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», в ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан, НПК «Синтол» (г. Москва), а также в сельскохозяйственных предприятиях районов Республики Татарстан.

Исследования по оценке аллельного полиморфизма генов *iNOS* и *BoLA-DRB3* проводили на выборке из 68 быков-производителей молочного и мясного направления продуктивности, принадлежащих ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан.

Для экстракции ДНК из цельной консервированной крови крупного рогатого скота использовали комплект реагентов «ДНК-сорб В» (ЦНИИ Эпидемиологии).

Постановку ПЦР для амплификации локуса гена *iNOS* длиной 258 bp осуществляли набором реактивов «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген») с применением набора специфических праймеров (iNOS-F и iNOS-R).

При постановке ПЦР для амплификации локуса экзона 2 гена *BoLA-DRB3 Bos taurus* использовали набор реактивов «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген») с применением набора специфических праймеров (DRB3FRW и DRB3REV).

Выравнивание частичных нуклеотидных последовательностей аллельных вариантов *A* и *B* полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS*: CLUSTAL W (v. 1.83) (http://www.genome.jp/tools/clustalw/).

Моделирование ПЦР-ПДРФ-профилей: NEBcutter v.2.0.

Для *BoLA*-типирования методом секвенирования (SBT) ампликоны анализируемого локуса секвенировали на генетическом анализаторе "ABI PRISM 3100" (Applied Biosystems, США) с последующим их выравниванием в BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgic) с соответствующими частичными нуклеотидными последовательностями аллелей *BoLA-DRB3*.

При проведении эпизоотологического исследования обрабатывались статистические материалы ветеринарной отчетности, а также результаты лабораторной диагностики лейкоза крупного рогатого скота реакцией иммунодиффузии (РИД) и гематологией.

Молекулярно-генетическим исследованиям было подвергнуто 179 образцов крови РИД-положительных коров из сельхозпредприятий 21 района Республики Татарстан Российской Федерации на предмет геноидентификации выявляемых представителей вируса бычьего лейкоза (ВБЛ) филогенетическим анализом секвенируемых нуклеотидных последовательностей фрагмента *env*-гена возбудителя, а также ПЦР-ПДРФ-генотипированием, согласуемым с филогенетической классификацией инфекционного агента.

При постановке nested ПЦР с экстрагированными пробами провирусной ДНК ВБЛ применены «внешние» («env5032» и «env5608») и «внутренние» («env5099» и «env5521») праймеры, инициируемые на завершающем этапе реакции наработку фрагмента *env*-гена возбудителя длиной 444 bp.

Соответствующие эндонуклеазы рестрикции (*Pvu*II, *Ssp*I, *Hph*I (изошизомер *Asu*HPI), *Hae*III, *Bst*YI (изошизомер *Bst*X2I)) использованы при ПЦР-ПДРФ-генотипировании ВБЛ, согласуемой с его филогенетической классификацией. Для ПЦР-ПДРФ-моделирования использован web-ресурс NEBcutter v.2.0 (http://nc2.neb.com/NEBcutter2/).

Для детекции полученных результатов ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа применен горизонтальный электрофорез в 2,5 % агарозном геле с буфером ТВЕ (pH 8,0), содержащим бромистый этидий, с последующим

рассмотрением электрофореграмм в УФ-трансиллюминаторе (λ=310 нм). Размеры генерируемых фрагментов ДНК были оценены сопоставлением со стандартными маркерами молекулярного веса ДНК (ООО «СибЭнзим»).

Секвенирование продуктов ПЦР-амплификации фрагмента *env*-гена выявляемых провирусных изолятов ВБЛ проведено на генетическом каппилярном анализаторе (секвенаторе) «ABI PRISM 3100» («Applied Biosystems», США) в лаборатории НПК «Синтол» (Россия) с применением «внутренних» олигонуклеотидных праймеров «env5099» и «env5521» в качестве сиквенсных. Выравнивание секвенируемых последовательностей фрагмента *env*-гена провирусных изолятов ВБЛ с соответствующими нуклеотидными последовательностями референсных изолятов ВБЛ, ранее депонированных в GenBank, осуществлено с использованием программ BLAST и MEGA-4 с последующим филогенетическим анализом

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Оценка аллельного полиморфизма гена *iNOS* у исследуемой выборки животных на основе разрабатываемого способа проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* полиморфного маркера AH13-1 анализируемого гена

Оценку аллельного полиморфизма гена *iNOS* у исследуемой выборки животных выполнили на основе разработанного нами способа проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* полиморфного маркера AH13-1 анализируемого гена.

Так, праймеры iNOS-F и iNOS-R инициируют амплификацию локуса полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* крупного рогатого скота длиной 258 п.н., а *Hinf*I-ПДРФ-анализ генерируемых генотип-специфичных фрагментов (*AA*=192/66 п.н., *BB*=258 п.н. и *AB*=258/192/66 п.н.) обеспечивает корректную процедуру генотипирования (рис. 1).

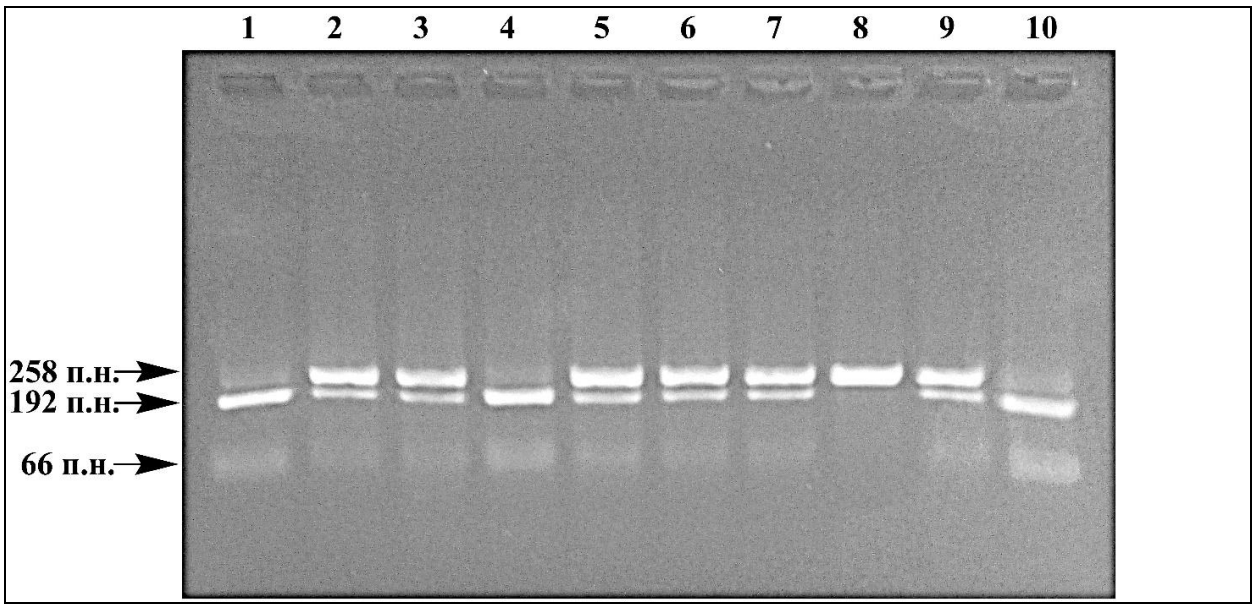

Рисунок 1 – Электрофореграмма технического результата разработанного способа проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS*

Обозначения: 1-10) генерируемые *HinfI*-ПДРФ-профили: 1,4,10) генотип *AA* (192/66 п.н.); 8) генотип *BB* (258 п.н.); 2, 3, 5, 6, 7, 9) генотип *AB* (258/192/66 п.н.).

Результаты оценки аллельного полиморфизма гена *iNOS* у исследуемой выборки животных представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Аллельный полиморфизм гена *iNOS* у исследуемой выборки быков-производителей ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан

Быки-производители: *молочного направления продуктивности	n = 60 гол.	Частота встречаемости								χ^2
		генотипов						аллелей		
		AA		*AB*		*BB*		*A*	*B*	1,72
		n	%	n	%	n	%			
	H	14	23,3	35	58,3	11	18,4	0,525	0,475	
	O	16	26,7	30	50	14	23,3			
**мясного направления продуктивности	n = 8 гол.	*AA*		*AB*		*BB*		*A*	*B*	0,89
		n	%	n	%	n	%			
	H	4	50	4	50	-	-	0,75	0,25	
	O	4,5	56,25	3	37,5	0,5	6,25			

Примечание: H – наблюдаемое распределение генотипов, O – ожидаемое распределение генотипов. *Помесный и чистопородный голштинский скот. **Породы мясного направления (герефорд, обрак, лимузин).

У быков-производителей молочного направления продуктивности, представляющих собой помесный и чистопородный голштинский скот, частота аллеля *A* составила 0,525, аллеля *B* – 0,475, а распределение генотипов было следующее: *AA* – 14 гол. (23,3 %), *AB* – 5 гол. (58,3 %), *BB* – 11 гол. (18,4 %) (табл. 1).

У быков-производителей мясного направления продуктивности, представленных породой герефорд, обрак и лимузин, частота аллеля *A* составила 0,75, аллеля *B* – 0,25, с равным распределением генотипов *AA* и *AB* по 4 гол. (50 % каждого) и отсутствием генотипа *BB* (табл. 1).

Наблюдаемое распределение частот генотипов полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* в исследуемой выборке соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

2.2.2 Изучение ассоциативной связи генотипов полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков.

Распределение быков-производителей молочного направления продуктивности, представляющих собой помесный и чистопородный

голштинский скот, по генотипам полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* было следующим: *AA* – 14 гол. (23,3 %), *AB* – 35 гол. (58,3 %), *BB* – 11 гол. (18,4 %). Частота аллеля *A* составила 0,525, аллеля *B* – 0,475 (табл. 2).

Таблица 2 – Аллельный полиморфизм гена *iNOS* у исследуемой выборки быков-производителей ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан

Быки-производители: *молочного направления продуктивности	n = 60 гол.	Частота встречаемости								χ^2
		генотипов						аллелей		
		AA		*AB*		*BB*		*A*	*B*	
		n	%	n	%	n	%			
	H	14	23,3	35	58,3	11	18,4	0,525	0,475	1,72
	O	16	26,7	30	50,0	14	23,3			

Примечание: H – наблюдаемое распределение генотипов, O – ожидаемое распределение генотипов. *Помесный и чистопородный голштинский скот.

Для оценки быков-производителей по происхождению использованы индексы племенной оценки быков, в которые входили показатели ближайших женских предков (табл. 3).

Таблица 3 – Характеристика быков-производителей с разными генотипами полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* по молочной продуктивности женских предков

Показатель		Генотип		
		AA	*AB*	*BB*
Число быков		14	35	11
Матери (М)	удой, кг	7726±1205,2	8678±1658,4	9611±1741,2
	жир, %	3,9±0,25	3,85±0,17	3,92±0,18
	жир, кг	301,3±55,6	334,1±69,2	376,8±69,5
Матери Матерей (ММ)	удой, кг	6763±2463,6	7168±1865,8	7827±1877,7
	жир, %	3,87±0,3	3,91±0,36	3,8±0,23
	жир, кг	261,7±107,6	280,3±72,2	297,4±76,6
Матери Отцов (МО)	удой, кг	10048±2151,1	10249±2051,5	12654±4544,2
	жир, %	3,91±0,25	4,06±0,34	4,11±0,53
	жир, кг	392,9±95,8	416,1±105,3	520,1±201,4
Родословный индекс быка (РИБ)	удой, кг	8066±1597,8	8693±1373,1	9926±2063,1
	жир, %	3,89±0,19	3,92±0,2	3,93±0,16
	жир, кг	313,8±72,3	340,8±60,2	390,1±83,9

Анализ табл. 3 показывает, что наибольшие показатели по удою и содержанию жира в молоке отмечены в группе матерей (М) быков с генотипом *BB* (9611 кг и 3,92 %), которые были выше, чем у матерей быков с генотипом *AB* на 933 кг и 0,07 %, а также генотипом *AA* на 1885 кг и 0,02 %, соответственно.

Оценка быков по родительскому индексу показала, что наибольший РИБ по показателям молочной продуктивности и качества молока оказался в группе быков с генотипом *BB*.

2.2.3 Оптимизация условий проведения ПЦР-амплификации локуса экзона 2 гена *BoLA-DRB3 Bos taurus*, пригодной для дальнейшей процедуры типирования методом секвенирования (SBT)

Установлено, что ПЦР с Encyclo GC буфером является наиболее оптимальным вариантом для накопления специфического продукта амплификации изучаемой мишени в сравнении с двумя другими буферами из набора реактивов «Encyclo Plus PCR kit».

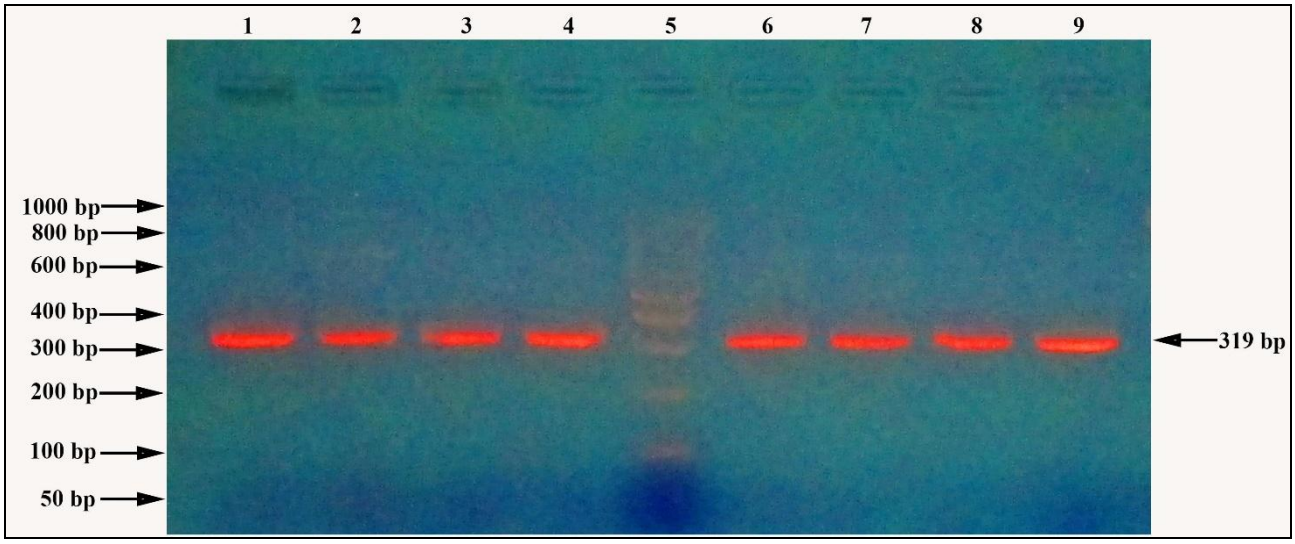

Рисунок 2 – Электрофореграмма результата ПЦР-амплификации локуса экзона 2 гена *BoLA-DRB3 Bos taurus* (Encyclo GC буфер)

Обозначения: 1-4) ПЦР-пробы, амплифицированные в режиме термоциклирования №4; 5) ДНК-маркеры 100 bp + 50 bp; 6-9) ПЦР-пробы, амплифицированные в режиме термоциклирования №5.

Как видно из электрофореграммы рис. 2, применение в реакции Encyclo GC буфера обеспечивает сравнительно высокий выход специфичного ПЦР-продукта локуса экзона 2 гена *BoLA-DRB3* длиной 319 bp без образования шмеров и неспецифики.

2.2.4 Полиморфизм гена *BoLA-DRB3* и генетический статус выборки быков-производителей по отношению к лейкозу крупного рогатого скота

При проведении ПЦР-амплификации локуса экзона 2 гена *BoLA-DRB3* на уровне, пригодном для дальнейшей процедуры типирования методом секвенирования (SBT), получен специфичный ПЦР-продукт длиной 319 п.н.

Последующей расшифровкой нуклеотидных последовательностей амплифицированной ДНК анализируемого локуса реализована стратегия *BoLA*-типирования методом секвенирования (SBT), обеспечившая оценку

аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* в исследуемой выборке животных с установлением генотипической структуры анализируемой популяции в контексте генетической чувствительности и устойчивости к лейкозу крупного рогатого скота.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей гена *BoLA-DRB3*, ассоциированных с восприимчивостью и резистентностью к лейкозу крупного рогатого скота в исследуемой выборке быков-производителей, представлен в табл. 4.

Таблица 4 – Частота встречаемости аллелей гена *BoLA-DRB3* в выборке быков производителей ГУП ГПП "Элита" Высокогорского района Республики Татарстан

№ аллеля	Количество животных-носителей определенных аллелей *BoLA-DRB3*		Количество определенных аллелей	Частота аллелей, %	
				"Элита" (n=68)	
Ч-аллели, определяющие чувствительность к лейкозу крупного рогатого скота					
*8 (*1201)	15	55,2	17	12,5	55,88
*16 (*1501, *1505)	17		17	12,5	
*22 (*1101)	9		9	6,62	
*24 (*0101)	28		33	24,26	
У-аллели, определяющие устойчивость к лейкозу крупного рогатого скота					
*7 (*0201)	4	16	5	3,68	15,45
*11 (*0902)	5		5	3,68	
*23 (*2701, *2703)	8		8	5,88	
*28 (*0701)	3		3	2,21	
Н-аллели, нейтральные по отношению к лейкозу крупного рогатого скота					
*1 (*0501)	2	28,8	2	1,47	28,67
*2 (*1301)	1		1	0,73	
*3 (*1001)	10		11	8,09	
*10 (*1601)	4		6	4,41	
*12 (*1701, *3202)	2		2	1,47	
*18 (*1801)	3		3	2,21	
*20 (*3601)	1		1	0,73	
*21 (*0801)	5		5	3,68	
*27 (*14011)	8		8	5,88	
Всего	125	100 %	136	100 %	

Распределение представленных аллелей (табл. 4) в порядке убывания частоты их встречаемости имеет следующую конфигурацию:

24>*8=*16>*3>*22>*23=*27>*10>*7=*11=*21>*18=*28>*1=12>*2=*20.

Так, максимальная частота встречаемости выявлена у аллеля *24, а минимальная у аллелей *2 и *20, соответственно.

Распределение ассоциированных групп генотипов по гену *BoLA-DRB3* с различной частотой их встречаемости представлено на рис. 3.

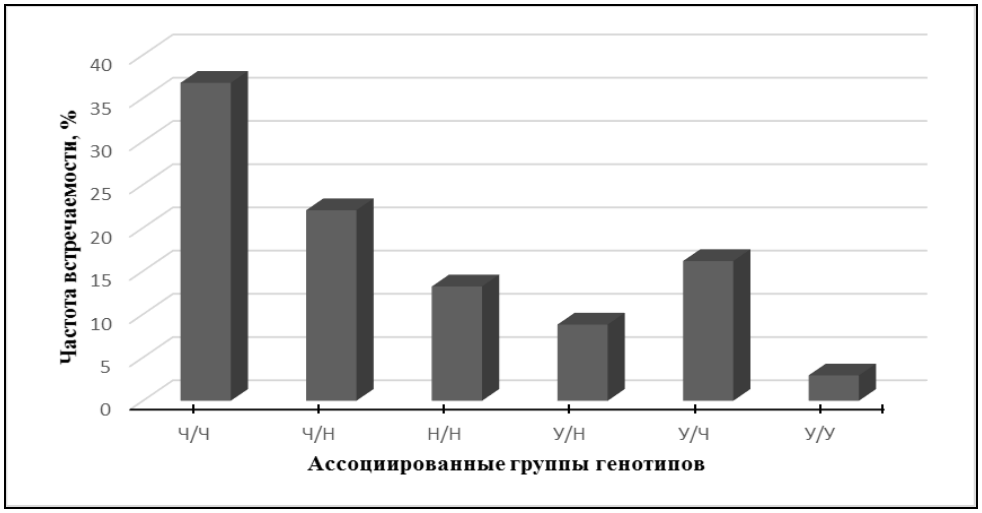

Рисунок 3 – Распределение ассоциированных групп генотипов по гену *BoLA-DRB3*

Распределение ассоциированных групп генотипов в порядке убывания суммарной доли частоты их встречаемости имеет следующую конфигурацию: Ч/Ч>Ч/Н>У/Ч>Н/Н>У/Н>У/У.

Распределение выборки быков-производителей согласно их генетическому статусу по отношению к лейкозу крупного рогатого скота представлено в табл. 5.

Таблица 5 – Распределение выборки быков-производителей ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан согласно их генетическому статусу по отношению к лейкозу крупного рогатого скота

Статус	Ассоциированная группа генотипов	Количество Животных		Процентное соотношение, %
генетической чувствительности	Ч/Ч	25	40	58,82
	Ч/Н	15		
генетической устойчивости	У/Н	6	19	27,94
	У/Ч	11		
	У/У	2		
нейтральный	Н/Н	9	9	13,24

Статусом генетической чувствительности к лейкозу крупного рогатого скота с ассоциированной группой генотипов Ч/Ч и Ч/Н обладали 40 быков-производителей, в том числе 39 молочного направления продуктивности (помесный (33) и чистопородный (6) голштинский скот) и 1 мясного направления продуктивности (1 обрак).

Статусом генетической устойчивости к лейкозу крупного рогатого скота с ассоциированной группой генотипов У/Н, У/Ч и У/У обладали 19 быков-производителей, в том числе 17 молочного направления продуктивности (помесный (13) и чистопородный (4) голштинский скот) и 2 мясного направления продуктивности (2 герефорда).

Нейтральным статусом по отношению к лейкозу крупного рогатого скота с ассоциированной группой генотипов Н/Н обладали 9 быков-производителей, в том числе 4 молочного направления продуктивности (помесный голштинский скот) и 5 мясного направления продуктивности (1 обрак, 2 герефорда и 2 лимузина).

2.2.5 Изучение ассоциативной связи групп генотипов *BoLA-DRB3* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков

При оценке быков-производителей молочного направления продуктивности по происхождению использованы индексы племенной оценки быков. Анализ родительского индекса быка (РИБ) показывает степень возможной передачи потомству признаков молочной продуктивности (табл. 6).

Таблица 6 – Оценка быков-производителей разных групп генотипов *BoLA-DRB3*, ассоциированных с восприимчивостью или резистентностью к лейкозу, по показателям молочной продуктивности женских предков

Ассоциированная группа генотипов		Показатели молочной продуктивности		
		удой, кг	жир, %	жир, кг
n=60		Матери (М)		
Ч/Ч	25	8561,0±1956,7	3,82±0,19	327,1±77,1
Ч/Н	14	8800±1454,2	3,90±0,13	344,0±64,8
Н/Н	4	9918±668,5	4,03±0,18	399,8±41,1
У/Н	4	8508±1268,8	3,95±0,22	334,3±35,7
У/Ч	11	8460±1570,5	3,84±0,18	326,6±71
У/У	2	6803±607,4	4,15±0,45	283,3±55,5
n=60		Матери Матерей (ММ)		
Ч/Ч	25	7731±2280,7	3,90±0,38	300,2±88,1
Ч/Н	14	6517±1640,6	3,89±0,22	253,9±69,8
Н/Н	4	8003±2834,5	3,71±0,17	300,2±119,1
У/Н	4	7087±1207	3,96±0,11	279,80±41,2
У/Ч	11	6736±1644,3	3,85±0,42	261,2±78,8
У/У	2	6347±2045	3,80±0	241,2±77,7
n=60		Матери Отцов (МО)		
Ч/Ч	25	10591±3272,7	3,95±0,22	419,4±131,2
Ч/Н	14	9579±1113,6	3,97±0,34	382,6±71,6
Н/Н	4	13816±2226,5	4,4±0,69	604,9±133,5
У/Н	4	11490±2612,5	3,91±0,07	447,3±92,1
У/Ч	11	10854±3052,7	4,20±0,51	463,1±170,7
У/У	2	9533±951,8	4,16±0,34	395±7,2
n=60		Родительский индекс быка (РИБ)		
Ч/Ч	25	9251±2530,3	3,87±0,16	358±94,6
Ч/Н	14	8424±995,5	3,91±0,16	329,4±51,2
Н/Н	4	10414±825,6	4,04±0,19	420,7±47,1
У/Н	4	8898±1403	3,94±0,15	350,6±43,4
У/Ч	11	8628±1505,5	3,93±0,24	339,1±79,7
У/У	2	7371±1052,9	4,06±0,14	299,3±49

Примечание: Ч – аллели, ассоциированные с устойчивостью к лейкозу; У – аллели, ассоциированные с чувствительностью к лейкозу; Н – аллели, нейтральные по отношению к лейкозу крупного рогатого скота.

По результатам оценки родительского индекса быка (РИБ) распределение групп генотипов, ассоциированных с устойчивостью (У) и/или чувствительностью (Ч) и/или нейтральным (Н) состоянием по отношению к лейкозу крупного рогатого скота, имело следующую конфигурацию в порядке убывания значений показателей:

по удою – Н/Н>Ч/Ч>У/Н>У/Ч>Ч/Н>У/У;

по содержанию молочного жира – У/У>Н/Н>У/Н>У/Ч>Ч/Н>Ч/Ч;

по выходу молочного жира – Н/Н>Ч/Ч>У/Н>У/Ч>Ч/Н>У/У (табл. 6).

Оценка быков-производителей разных групп генотипов *BoLA-DRB3*, ассоциированных с признаками молочной продуктивности, по одноименным показателям женских предков представлена в табл. 7.

Таблица 7 – Оценка быков-производителей разных групп генотипов *BoLA-DRB3*, ассоциированных с признаками молочной продуктивности по одноименным показателям женских предков

Ассоциированная группа генотипов		Показатель молочной продуктивности		
		удой, кг	жир, %	жир, кг
n=60		Матери (М)		
П/П	5	8545±2381,8	3,85±0,26	329 ±105,9
С/С	-	-	-	-
Н/Н	32	8817±1568,2	3,87±0,18	341,2±65,6
П/С	3	6943±2103,8	3,79±0,05	263,1±82,3
С/Н	5	8990±564,3	3,9±0,05	350,6±25,2
П/Н	15	8462±1792,3	3,89±0,25	336,8±71,7
n=60		Матери Матерей (ММ)		
П/П	5	7829±2748,2	3,92±0,35	306,9±129,1
С/С		-	-	-
Н/Н	32	7035±1983,3	3,82±0,27	268,7±78,2
П/С	3	7255±4002,1	3,92±0,29	284,4±137,4
С/Н	5	7735±1990,9	4,02±0,62	310,9±78,29
П/Н	15	7129±1584,5	3,93±0,32	279,97±66,2
n=60		Матери Отцов (МО)		
П/П	5	11379±2288,4	4,54±0,64	516,6±160,9
С/С	-	-	-	-
Н/Н	32	10826±3049,2	3,97±0,31	429,8±129,7
П/С	3	8433±2225,1	4,1±0,29	345,7±118,7
С/Н	5	9537±1656,8	3,9±0,05	371,9±67
П/Н	15	10816±2797,6	4,03±0,33	435,9±138,5
n=60		Родительский индекс быка (РИБ)		
П/П	5	9075±2262,1	4,04±0,32	366,6±118,42
С/С	-	-	-	-
Н/Н	32	8874±1662	3,88±0,15	349,6±67,8
П/С	3	7394±2556,9	3,9±0,05	288,4±102,4
С/Н	5	8813±867,7	3,93±0,18	345,9±37,5
П/Н	15	8717±1480,7	3,94±0,22	343,4±67,3

Примечание: П – аллели, ассоциированные с повышенным объемом удоев; С – аллели, ассоциированные со сниженным объемов удоев; Н – аллели, нейтральные по отношению к объему удоев.

По результатам оценки родительского индекса быка (РИБ) распределение групп генотипов, ассоциированных с повышенным (П) и/или со сниженным (С) объемом удоев и/или их нейтральным (Н) состоянием, имело следующую конфигурацию в порядке убывания значений показателей:

по удою – П/П>Н/Н>С/Н>П/Н>П/С;

по содержанию молочного жира – П/П>П/Н>С/Н>П/С>Н/Н;

по выходу молочного жира – П/П>Н/Н>С/Н>П/Н>П/С (табл. 7).

2.2.7 Генотипическая принадлежность изолятов вируса бычьего лейкоза, циркулирующих в популяциях крупного рогатого скота Республики Татарстан

ПЦР-ПДРФ-генотипированием и сравнительным филогенетическим анализом выравниваемых последовательностей фрагмента *env*-гена провирусных изолятов ВБЛ, выявляемых у крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах 21 района Республики Татарстан, определена их генотипическая принадлежность (табл. 9).

Таблица 9 – Распределение 179 генотипированных проб провирусной ДНК ВБЛ в 21 исследованном районе Республики Татарстан Российской Федерации

Район Республики Татарстан		**Исследовано**	**ГЕНОТИП ВБЛ**									
			1-й	**2-й**	**3-й**	**4-й**	**5-й**	**6-й**	**7-й**	**8-й**	**9-й**	**10-й**
1	Азнакаевский	10	-	-	-	9	-	-	1	-	-	-
2	Алькеевский	13	-	-	-	5	-	-	8	-	-	-
3	Арский	7	-	-	-	6	-	-	1	-	-	-
4	Буинский	7	-	-	-	2	-	-	3	2	-	-
5	Высокогорский	4	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-
6	Дрожжановский	12	-	-	-	4	-	-	7	1	-	-
7	Заинский	8	-	-	-	7	-	-	-	1	-	-
8	Кайбицкий	7	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-
9	Лаишевский	13	-	-	-	12	-	-	1	-	-	-
10	Лениногорский	19	-	-	-	15	-	-	4	-	-	-
11	Мамадышский	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Мензелинский	6	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-
13	Муслюмовский	4	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
14	Нижнекамский	14	-	-	-	8	-	-	5	1	-	-
15	Пестречинский	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
16	Рыбнослободский	8	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-
17	Сармановский	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
18	Спасский	9	-	-	-	3	-	-	6	-	-	-
19	Тукаевский	9	-	-	-	4	-	-	3	2	-	-
20	Тюлячинский	6	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-
21	Чистопольский	10	-	-	-	3	-	-	6	1	-	-
ВСЕГО ПРОБ		179	10	-	-	106		-	55	8	-	-

Так, из 179 проидентифицированных изолятов десять относились к 1-му генотипу ВБЛ, 106 изолятов имели принадлежность к кластеру 4-го

генотипа ВБЛ, 55 были охарактеризованы признаком 7-го генотипа, а другие восемь происследованных провирусных изолятов являлись представителями 8-го генотипа изучаемого вирусного патогена.

2.2.8 Типизация изолятов ВБЛ с расшифрованными нуклеотидными последовательностями локуса *env*-гена в зависимости от выбранной стратегии геноидентификации возбудителя

Сравнительный анализ 505 нуклеотидных последовательностей фрагмента *env*-гена ВБЛ, в т.ч. депонированных в GenBank NCBI, подтверждает несогласованность ряда использованных ранее стратегий ПЦР-ПДРФ-типизации с нынешним подходом в оценке его генотипического разнообразия филогенетическим анализом.

Так, изоляты ВБЛ, типированные по стратегии D. Beier et al. (2001) в качестве представителей Бельгийской подгруппы, согласно филогенетической классификации принадлежат четвёртому генотипу ВБЛ; Австралийской подгруппы – первому, третьему, шестому, седьмому, восьмому или девятому генотипам ВБЛ; Японской подгруппы – первому, шестому или седьмому генотипам ВБЛ. Помимо этого, для указанной стратегии типизации дополнительно определено 11 уникальных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей, условно тождественных 11 неклассифицируемым подгруппам ВБЛ (табл.10).

Таблица 10 – Сопоставление данных *in silico* ПЦР-ПДРФ (типизация по D. Beier et al., 2001) и филогенетического анализа фрагмента *env*-гена ВБЛ

ПЦР-ПДРФ-типизация ВБЛ		ПЦР-продукт (bp)	ПДРФ-фрагменты (bp)			Генотипы										N
			*Pvu*II	*Bam*HI	*Bcl*I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ПОДГРУППА	Бельгийская	444	280/164	444	225/219	-	-	-	142	-	-	-	-	-	-	142
	Австралийская	444	444	316/128	225/219	57	-	4	-	-	28	70	21	19	-	199
	Японская	444	444	316/128	219/121/104	8	-	-	-	-	6	1	-	-	-	15
	?	444	444	444	225/219	43	-	-	1	-	-	2	-	3	17	66
	?	444	444	316/128	444	1	-	-	-	-	14	2	-	-	-	17
	?	444	444	316/128	225/191/28	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	?	444	280/164	316/128	225/219	-	36	-	-	10	-	3	-	-	-	49
	?	444	280/164	316/128	444	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	?	444	280/164	316/128	219/189/36	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
	?	444	280/164	444	444	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	?	444	208/164	253/191	225/219	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	?	444	280/164	444	219/121/104	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	4
	?	444	444	242/128/74	225/219	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
	?	444	444	444	444	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7

2.2.9 Совершенствование стратегии ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ согласуемой с филогенетической классификацией возбудителя

Интерпретация *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей 505 изолятов ВБЛ, сгенерированных в ходе анализа рестрикционных картирований локуса *env*-гена по 5 рестриктазам, фактически отражает стратегию ПЦР-ПДРФ-генотипирования вируса бычьего лейкоза в соответствии с его филогенетической классификацией.

Усовершенствованная нами стратегия ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ согласуется с его филогенетической классификацией, позволяя идентифицировать все десять известных на сегодняшний день генотипов изучаемого вирусного патогенна (табл. 11).

Таблица 11 – Усовершенствованная стратегия ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ, согласованная с его филогенетической классификацией

Г	Изолят ВБЛ	GenBank A/N	ПЦР-продукт (bp)	ПДРФ-фрагменты (bp)					К	N
				*Pvu*II	*Ssp*I	*Hph*I	*Hae*III	*Bst*YI		
1	AL-63	FJ808571	444	444	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	198/128/118	1	56
1	Cow 527	AF007764	444	444	399/45	224/220	285/94/32/27/6	198/128/118	2	8
1	23	U87873	444	444	399/45	224/220	312/94/32/6	198/128/118	3	1
1	AL-2106	FJ808578	444	444	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	246/198	4	42
1	UruC06II	FM955558	444	444	399/45	224/220	285/94/32/27/6	246/198	5	1
1	VdM	M35239	444	444	399/45	224/181/39	198/94/87/32/27/6	316/128	6	1
1	Kurdistan	EU266062	444	444	399/45	220/196/28	198/119/94/27/6	198/128/118	7	1
2	AL-164	FJ808574	444	280/164	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	198/128/118	8	34
2	PL-4960	FJ808590	444	280/164	399/45	224/220	198/87/49/45/32/27/6	198/128/118	9	1
2	ARGSF8	AF485773	444	280/164	399/45	444	198/94/87/32/27/6	198/128/118	10	1
2	AL-1453	FJ808577	444	280/164	444	224/220	198/94/87/32/27/6	198/128/118	11	1
3	USCA-1	EF065647	444	444	399/45	444	285/94/32/21/6/6	198/128/96/22	12	1
3	USCA-2	EF065648	444	444	399/45	444	285/94/32/27/6	198/128/96/22	13	2
3	JPFU	EF065650	444	444	399/45	444	285/94/32/27/6	198/128/118	14	1
4	BG	EF065638	444	280/164	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	444	15	115
4	3	U87872	444	444	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	444	16	1
4	1S-c16	JQ353652	444	280/164	399/45	444	198/94/87/32/27/6	444	17	16
4	N023	KC867149	444	280.164	399.45	224.220	198/94/87/32/27/6	253/191	18	1
4	1_BY	HQ902258	444	280/164	444	224/220	198/94/87/32/27/6	444	19	7
4	N034	KC886611	444	280/164	399/45	224/220	198/121/87/32/6	444	20	1
4	1S-c9	JQ353640	444	280/164	399/45	224/220	198/119/94/27/6	444	21	1
4	NK11	JQ686117	444	280/164	399/45	224/220	285/94/32/27/6	444	22	6
4	1S-c10	JQ353650	444	280/164	399/45	220/145/79	198/94/87/32/27/6	444	23	1
5	CRAS-1	EF065635	444	280/164	399/45	224/181/39	198/94/87/32/27/6	316/128	24	8
5	CRGC	EF065639	444	280/164	399/45	224/181/39	285/94/32/27/6	316/128	25	1
5	CRLC-1	EF065655	444	280/164	444	224/181/39	198/94/87/32/27/6	316/128	26	2
6	PL-1238	FJ808582	444	444	399/45	224/220	285/94/32/27/6	316/128	27	7
6	151	AY185360	444	444	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	316/128	28	27
6	GS3	MF574055	444	444	399/45	444	198/94/87/32/27/6	316/128	29	11
6	SC2	MF574060	444	444	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	242/128/74	30	1
6	QH1	MF574057	444	444	213/186/45	444	198/94/81/32/21/6/6	316/128	31	1
6	Pucallpa-7	LC075552	444	444	399/45	444	198/94/87/32/27/6	316/79/49	32	1
6	Paraguay-96	LC075556	444	444	399/45	444	198/121/87/32/6	316/128	33	1
7	N28	HM102356	444	444	444	224/137/83	198/94/87/32/27/6	294/128/22	34	7
7	176	AY515276	444	444	444	224/137/83	198/94/87/32/27/6	316/128	35	53
7	I2	S83530	444	444	444	224/220	285/94/32/27/6	316/128	36	1
7	14	AY515274	444	444	444	145/137/83/79	198/94/87/32/27/6	316/128	37	1
7	30	DQ059417	444	444	444	444	198/87/49/45/32/27/6	316/128	38	1
7	3S	JF720351	444	280/164	444	224/137/83	198/94/87/32/27/6	316/128	39	3
7	4T-c19	JQ353655	444	444	399/45	224/137/83	198/94/87/32/27/6	316/128	40	3
7	1S-c4	JQ353651	444	444	444	224/137/83	198/94/87/32/27/6	316/79/49	41	1
7	NK17	JQ686120	444	444	444	224/137/83	198/87/49/45/32/27/6	316/128	42	2
7	4S	JF720352	444	444	444	224/137/83	198/119/94/27/6	316/128	43	1
7	1S-c6	JQ353633	444	444	444	224/137/83	198/121/87/32/6	316/128	44	1
7	4T-c11	JQ353656	444	444	444	224/137/83	285/94/32/27/6	316/128	45	1
7	N067	KC886618	444	444	444	224/137/44/39	198/94/87/32/27/6	316/128	46	1
7	1S-c1	JQ353649	444	444	444	224/220	198/94/87/32/27/6	444	47	2
8	M1/ELG_Cro/08	GU724606	444	444	399/45	224/220	225/94/87/32/6	198/128/118	48	13
8	N174	JF713455	444	444	399/45	224/220	225/94/87/32/6	316/128	49	4
8	ELG_Cro/VRA/09	JN990072	444	444	444	224/220	225/94/87/32/6	198/128/118	50	2
8	4-6	HM563764	444	444	399/45	224/137/83	225/94/87/32/6	198/128/118	51	1
8	MKC2137	JQ675759	444	444	399/45	444	225/94/87/32/6	198/128/118	52	1
9	Monetro-1	LC075563	444	444	399/45	224/171/49	285/94/32/27/6	198/128/118	53	19
9	Portachello-20	LC075567	444	444	399/45	224/171/49	285/94/32/27/6	246/198	54	3
10	Pa51-A3	KU233547	444	444	399/45	224/220	198/94/81/32/27/6/6	444	55	12
10	ML45-B3	KU233540	444	444	399/45	224/220	279/94/32/27/6/6	444	56	11
10	L1	LC154066	444	444	444	224/220	198/94/81/32/27/6/6	444	57	1

Обозначения: Г – генотип; **К** – комбинация; **N** – число проанализированных изолятов ВБЛ с установленной комбинацией ПЦР-ПДРФ-профилей.

Наглядный пример реализации стратегии ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ в соответствии с его филогенетической классификацией отображены на рис. 4.

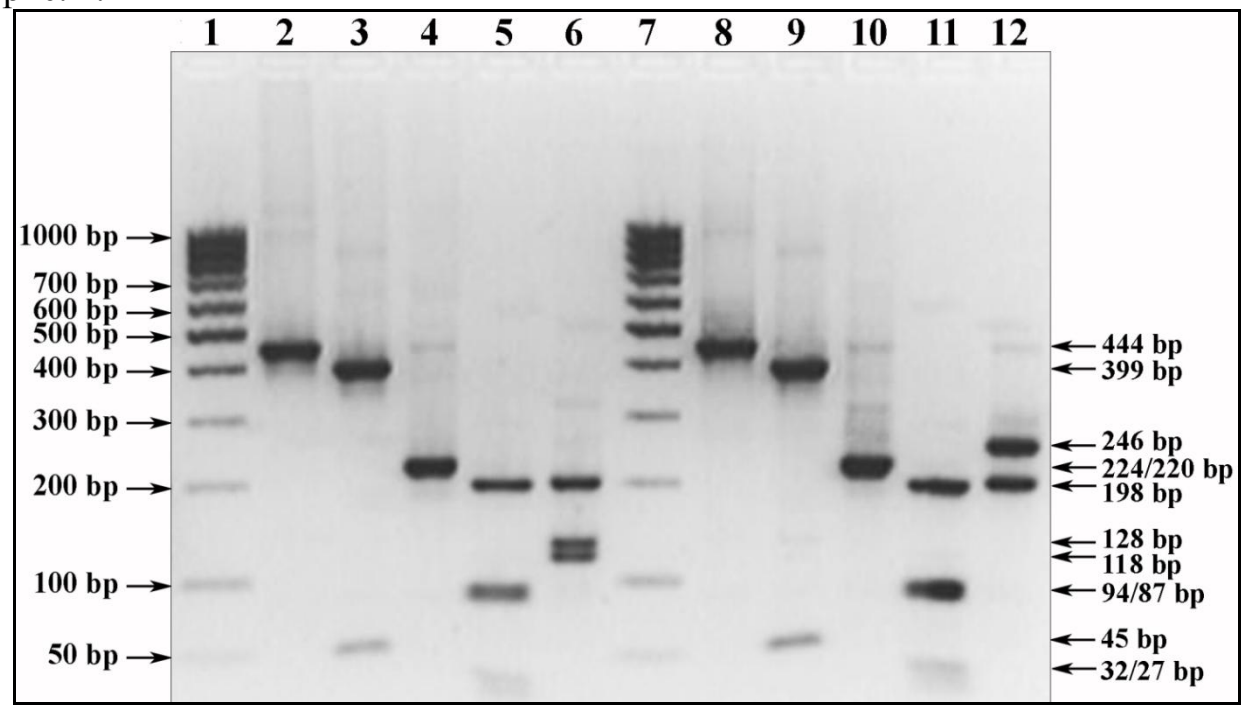

Рисунок 4 – Электрофореграмма комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей (К1 и К4) первого генотипа ВБЛ (усовершенствованная стратегия генотипирования)

Обозначения: 1, 7) ДНК-маркеры 100 bp + 50 bp (СибЭнзим). 2-6) ПЦР-ПДРФ-профиль провирусного изолята ВБЛ «N-1» (К1, первый генотип): 2) *Pvu*II-ПДРФ (444 bp); 3) *Ssp*I-ПДРФ (399/45 bp); 4) *Hph*I-ПДРФ (224/220 bp); 5) *Hae*III-ПДРФ (198/94/87/32/27/6 bp); 6) *Bst*YI-ПДРФ (198/128/118 bp). 8-12) ПЦР-ПДРФ-профиль провирусного изолята ВБЛ «N-4» (К4, первый генотип): 8) *Pvu*II-ПДРФ (444 bp); 9) *Ssp*I-ПДРФ (399/45 bp); 10) *Hph*I-ПДРФ (224/220 bp); 11) *Hae*III-ПДРФ (198/94/87/32/27.6 bp); 12) *Bst*YI-ПДРФ (246/198 bp).

Согласованность усовершенствованной стратегии ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ с его филогенетической классификацией обоснована, в том числе филогенетическим анализом фрагмента *env*-гена 57 референсных изолятов десяти открытых генотипов ВБЛ, генерирующих 57 генотип-ассоциированных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведённых исследований сделаны следующие **выводы:**

1. На основе разработанного способа проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* гена оценен аллельный полиморфизм анализируемого гена у исследуемого выборки животных с установлением преобладания у быков-производителей молочного и мясного направления продуктивности аллеля *A*, ассоциированного с устойчивостью к инфицированию вирусом бычьего лейкоза.

2. Изучена ассоциативная связь генотипов полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков с выявлением взаимосвязи повышенной молочной продуктивности с генетической восприимчивостью к инфицированию вирусом бычьего лейкоза и заболеванию лейкозом крупного рогатого скота.

3. Оптимизированные условия проведения ПЦР-амплификации локуса экзона 2 гена *BoLA-DRB3 Bos taurus* пригодны для дальнейшей процедуры типирования методом секвенирования (SBT). При этом ПЦР с Encyclo GC буфером является наиболее оптимальным вариантом для накопления специфического продукта амплификации изучаемой мишени в сравнении с двумя другими буферами из набора реактивов «Encyclo Plus PCR kit».

4. *BoLA*-типированием методом секвенирования (SBT) оценен аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* в исследуемой выборке быков-производителей и установлена генотипическая структура популяции в контексте генетической устойчивости и чувствительности к лейкозу крупного рогатого скота. На основании данных частот встречаемости аллелей и генотипов анализируемого гена выяснено распределение групп аллелей (Ч>Н>У) и ассоциированных групп генотипов (Ч/Ч>Ч/Н>У/Ч>Н/Н>У/Н>У/У), а также распределение выборки животных согласно их генетическому статусу по отношению к лейкозу.

5. Изучена ассоциативная связь групп генотипов *BoLA-DRB3* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков с выявлением взаимосвязи сниженной молочной продуктивности с генетической резистентностью к инфицированию вирусом бычьего лейкоза и заболеванию лейкозом крупного рогатого скота, а также наблюдением положительной корреляции между повышенной молочной продуктивностью и генетической предрасположенностью к повышенным объемам удоев.

6. Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Республике Татарстан характеризуется как эндемическая, остается по-прежнему напряженной, с определенной тенденцией к усугублению.

7. Генотипическая принадлежность изолятов вируса бычьего лейкоза, циркулирующих в популяциях крупного рогатого скота Республики Татарстан, представлена четырьмя из десяти известных генотипов ВБЛ – представителями 1-го, 4-го, 7-го и 8-го генотипов возбудителя, идентифицированных ПЦР-ПДРФ-генотипированием и филогенетическим анализом секвенируемых нуклеотидных последовательностей фрагмента *env*-гена.

8. Несогласованность ряда использованных ранее стратегий ПЦР-ПДРФ-типизации ВБЛ с современной филогенетической классификацией возбудителя, связана, в том числе и с пополнением знаний о генетическом многообразии уже десяти известных генотипов изучаемого вирусного патогена.

9. Усовершенствованная стратегия ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ, согласованная с филогенетической классификацией изучаемого возбудителя, позволяет идентифицировать все изученные генотипы вирусного патогена, достоверность которой обоснована, в том числе *in silico* моделированием рестриктограмм и филогенетическим анализом фрагмента *env*-гена 57 референсных изолятов десяти генотипов ВБЛ, генерирующих 57 генотип-ассоциированных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей, интерпретация которых диагностически значима.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Внедрить предложенные научно-методические подходы к генотипированию крупного рогатого скота по генам *iNOS* и *BoLA-DRB3*, а также геноидентификации вируса бычьего лейкоза, в систему скрининговых исследований поголовья по ДНК-маркерам генетической резистентности и восприимчивости к лейкозу, а также в систему молекулярного мониторинга инфицированности стад генотипами ВБЛ.

2. Учитывать в селекционно-племенной работе при воспроизводстве молочного стада с генетической устойчивостью к лейкозу крупного рогатого скота изученную ассоциативную связь генотипов полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* и групп генотипов *BoLA-DRB3* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА

1. **Гильманов, Х. Х**. Геноидентификация вируса бычьего лейкоза / Х.Х. Гильманов, З.Р. Закирова, А.Ю. Шаева // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны». – Санкт-Петербург, 2016. – С. 47-49.

2. **Гильманов, Х.Х.** Разновидность аллелей маркерного гена BoLA-DRB3 / Х.Х. Гильманов // Материалы международной научно-практической конференции «Наука сегодня: глобальные вызовы и механизмы развития». – Вологда, 2017. – Часть (1). – С. 61-63.

3. **Гильманов, Х.Х.** Влияние зарубежного скота на накопление аллелей гена BoLA-DRB3, ассоциированных с восприимчивостью к лейкозу крупного рогатого скота / Х.Х. Гильманов // Международный научный журнал «Инновационное развитие». – Пермь, 2017. – С. 48-49.

4. **Гильманов Х.Х.** Разработка режима термоциклирования для детекции гена BoLA-DRB3 / Х.Х. Гильманов // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны». – Санкт-Петербург, 2017. – С. 50-51.

5. **Гильманов Х.Х.** Оптимизация условий проведения ПЦР-амплификации локуса BoLA-DRB3-гена / Х.Х. Гильманов // Ученые записки

Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2017. – Том. 232. – № 4. С. 31-36.*

6. **Гильманов, Х.Х**. Способ проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллельным вариантам полиморфного маркера AH13-1 гена iNOS / Х.Х. Гильманов, Р.Р. Вафин, Р.Г. Каримова, С.В. Тюлькин // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2018. – № 4. – С. 22-28.*

7. **Гильманов, Х.Х.** Генотипическая принадлежность изолятов вируса бычьего лейкоза, циркулирующих в популяциях крупного рогатого скота Республики Татарстан / Х.Х. Гильманов, Р.Р. Вафин, А.Ю. Шаева, З.Р. Закирова, С.В. Тюлькин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2018. – Том. 235. – № 4.– С. 34-40.*

8. **Гильманов, Х.Х.** Полиморфизм гена BoLA-DRB3 и генетический статус выборки быков-производителей по отношению к лейкозу крупного рогатого скота / Х.Х. Гильманов, Р.Р. Вафин, Р.Г. Каримова, С.В. Тюлькин, Т.М. Ахметов // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2018. – № 11. – С. 89-98.*

9. Donnik, I.M. Genetic identification of bovine leukaemia virus / I.M. Donnik, R.R. Vafin, A.G. Galstyan, A.S. Krivonogova, A.Y. Shaeva, **Kh.Kh. Gilmanov**, R.G. Karimova, S.V. Tyulkin, J. Kuźmak // Foods and Raw Materials. – 2018. – V. 6. – N. 2. – P. 314-324.**

10. Вафин, Р.Р. Подходы к типизации вируса бычьего лейкоза / Р.Р. Вафин, В.В. Семипятный, **Х.Х. Гильманов** // Материалы 21-ой международной научно-практической конференции посвященной памяти Василия Матвеевича Горбатова «Инновационно-технологическое развитие промышленности – тенденции, стратегии, вызовы». – Санкт-Петербург, 2018. – С. 45-47.

11. **Гильманов, Х.Х.** Аллельный полиморфизм гена iNOS и его ассоциативная связь с хозяйственно-полезными признаками / Х.Х. Гильманов // Материалы 21-ой международной научно-практической конференции посвященной памяти Василия Матвеевича Горбатова «Инновационно-технологическое развитие промышленности – тенденции, стратегии, вызовы». – Санкт-Петербург, 2018. – С. 59-60.

12. Вафин, Р.Р. Подходы к типизации Bovine leukemia virus/ Р.Р. Вафин, **Х.Х. Гильманов** // Материалы международной научно-практической конференции «Вопросы современных научных исследований». – Омск, 2018. – № 12-1(27). – С. 45-47.

* статья из перечня рецензируемых научных изданий, в которых опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

** статья из перечня рецензируемых научных изданий, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования.