

ШАМСИЕВА ЛЕЙСАН ВАРИСОВНА

**ВЕТЕРИНАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ КОРОВ НА ФОНЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ФАКТОРОВ**

06.02.05 – Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-
санитарная экспертиза

06.02.07 – Разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и в ФГБНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства»

- Научный руководитель:** **Юсупова Галия Расыховна**
доктор биологических наук, профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ
- Научный консультант:** **Шакиров Шамиль Касымович**
доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник отдела агробиологических исследований ФГБНУ "ТатНИИСХ"
- Официальные оппоненты:** **Семенов Владимир Григорьевич** - доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры морфологии, акушерства и терапии ФГБОУ ВО "Чувашская государственная сельскохозяйственная академия"
Долматова Ирина Юрьевна - доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры пчеловодства, частной зоотехнии и разведения животных ФГБОУ ВО "Башкирский государственный аграрный университет»
- Ведущая организация** ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины"

Защита диссертации состоится «28» июня 2018 года в 14³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 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://www.ksavm.senet.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г. и размещен на сайтах: <http://www.vak.ed.gov.ru> и <http://www.ksavm.senet.ru>

Ученый секретарь
диссертационного совета

Юсупова Галия Расыховна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. При современных технологиях производства молока заболевание вымени у коров – одно из самых распространенных. Мастит относят к категории сложных и убыточных заболеваний, особенно его скрытую форму, которая по данным Всемирной организации ветеринарного здравоохранения наносит весомый удар по экономике молочного скотоводства. Это происходит из-за преждевременной выбраковки лучших, высокопродуктивных коров, так как вырученные средства от сдачи их на бойню не возмещают затрат на выращивание. Поэтому сельхозпроизводитель недополучает от них молока и высокопродуктивного потомства – телят, а также вынужден нести затраты на его диагностику, лечение и др. Кроме экономического, мастит несёт и социальный вред, так как маститогенные микробы, присутствующие в молоке вызывают заболевания у людей (Баязитов Т.Б., Баязитова К.Н., 2017).

Количество соматических клеток в молоке тесно связано с величиной воспалительного процесса, а также является хорошим диагностическим инструментом, который позволяет раннее выявление как субклинического, так и клинического мастита (Rupp R. et al., 2003; Wojdak-Maksymiec K. et al., 2006).

Исследования последних лет (Liu J. et al., 2011; Zhao Z. et al., 2012; Maletic M. et al., 2013; Yuan Z. et al., 2013; Shergojry Sh.A., 2014; Прошин С.Н. и др., 2015; Бименов Ж.Ж. и др., 2015; Nanaei A. et al., 2016) подтвердили гипотезы, о том, что гены лактоферрина (*LTF*) и манноза-связывающего лектина (*MBL1*) могут служить потенциальными генетическими маркерами у крупного рогатого скота, связанными с изменениями количественного содержания соматических клеток в молоке, и соответственно, с устойчивостью к маститу у коров. Этот критерий, наряду с ассоциативной связью полиморфизма генов *LTF* и *MBL1* с другими хозяйственно-полезными признаками, также возможно использовать при отборе и подборе родительских пар в процессе селекционно-племенной работы.

Степень разработанности темы. Изучение гена лактоферрина крупного рогатого скота, а также влияния его полиморфизма на устойчивость коров к маститу описано в трудах зарубежных (Schwerin M. et al., 1994; Javanmond A.N. et al., 2005; Wojdak-Maksymiec K. et al., 2006; Elsik C.G. et al., 2009; Srubarova P. & Dvorak J., 2009; Motwani K.T., 2011; Nanaei H.A. et al., 2012; Maletic M. et al., 2013; Gursel F.E. et al., 2013; Maletic M. et al., 2013; Nanaei A. et al., 2016) и отечественных ученых (Прошин С.Н. и др., 2015; Бименов Ж.Ж. и др., 2015).

Исследования ряда зарубежных авторов (Zhao et al., 2001; Shi et al., 2004; Lillie et al., 2007; Podolsky et al., 2008) показали взаимосвязь между полиморфными вариантами гена манноза-связывающего лектина (*MBL1*) с устойчивостью к возбудителям различных инфекций, в том числе и маститу.

То, что ген *MBL1* может быть использован в качестве потенциального маркера устойчивости коров к маститу, нашло свое подтверждение в

последующих научных работах (Liu J. et al., 2011; Zhao Z. et al., 2012; Yuan Z. et al., 2013; Shergojry Sh.A., 2014).

Однако в научных трудах этих учёных не имеется данных по генотипированию крупного рогатого скота по генам *LTF* и *MBL1* методами ДНК-технологий в условиях Республики Татарстан, и соответственно, не изучен аллельный полиморфизм данных генов и их ассоциативная связь с хозяйственно-полезными признаками, в том числе резистентности к маститу.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы – исследование полиморфизма генов лактоферрина и манноза-связывающего лектина крупного рогатого скота и их ассоциативной связи с хозяйственно-полезными признаками.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- генотипировать крупный рогатый скот по генам-кандидатам устойчивости к маститу коров – лактоферрина и манноза-связывающего лектина методом ПЦР-ПДРФ-анализа;
- провести анализ полиморфизма генов лактоферрина и манноза-связывающего лектина у первотёлок голштинской породы с учетом частоты встречаемости аллелей и генотипов (в т.ч. комплексных) исследуемых генов в разрезе линейной принадлежности коров;
- изучить ассоциацию полиморфизма генов лактоферрина и манноза-связывающего лектина с хозяйственно-полезными признаками первотелок с учетом ассоциации комплексных генотипов с молочной продуктивностью и качеством молока в разрезе линейной принадлежности коров.
- оценить селекционно-генетические параметры молочной продуктивности на основе сопряженности признаков молочной продуктивности у коров с разными генотипами генов лактоферрина и манноза-связывающего лектина.

Научная новизна работы. Изучена ассоциация полиморфизма исследуемых генов-кандидатов устойчивости к маститу коров с молочной продуктивностью и качеством молока первотёлок.

Оптимизированы протоколы постановки ПЦР-ПДРФ-анализа для генотипирования крупного рогатого скота по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина. Впервые в условиях Республики Татарстан изучен полиморфизм генов *LTF* и *MBL1* у первотёлок голштинской породы с учетом частоты встречаемости генотипов и аллелей исследуемых генов в разрезе линейной принадлежности коров.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты исследований, касающиеся генотипов *LTF*, *MBL1* и их комбинаций, возможно использовать в скотоводстве для улучшения хозяйственно-полезных признаков в контексте продуктивности и качества молока, устойчивости к маститу. Оптимизированные протоколы постановки ПЦР – ПДРФ – анализа для генотипирования крупного рогатого скота по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина позволяют эффективно использовать их в молекулярно-генетических исследованиях, в частности при скрининге перечисленных генов-кандидатов резистентности к маститу коров. Основные положения и выводы

диссертационной работы позволяют пополнить теоретические данные, касающиеся селекции крупного рогатого скота методами ДНК-технологий.

Методология и методы исследований. С целью выполнения поставленных задач применяли органолептические, физико-химические, зоотехнические, генно-молекулярные, статистические методы.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Изучением ассоциации полиморфизма генов *LTF* и *MBL1* с хозяйственно-полезными признаками первотёлок выявлены желательные генотипы, сопряжённые с молочной продуктивностью и качеством молока, резистентностью к маститу.

– Апробированные ПЦР – ПДРФ – протоколы для генотипирования крупного рогатого скота по генам лактоферрина и манноза – связывающего лектина обеспечили определение генотипической принадлежности исследуемой выборки первотёлок голштинской породы.

– Анализом полиморфизма генов лактоферрина и манноза – связывающего лектина у первотёлок голштинской породы определены частоты встречаемости генотипов и аллелей исследуемых генов, в том числе в разрезе линейной принадлежности коров.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения диссертации доложены, обсуждены и одобрены на ежегодных отчётах кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени имени Н.Э. Баумана» (Казань, 2015-2017 гг.); научных конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов Казанской ГАВМ (Казань, 2015-2017 гг.); Всероссийской научно-практической конференции «Повышение эффективности АПК в современных условиях», посвященный 95-летию со дня основания ТатНИИСХ (Казань, 2015 г.); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербург, 2015-2016 гг.).

Публикация результатов исследования. Основные положения диссертации изложены в 8 печатных работах, из которых 4 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 145 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, списка сокращений, списка использованной литературы и приложения. Работа содержит 24 таблицы и 9 рисунков. Список литературы включает 293 источников, в том числе 148 – зарубежных авторов.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились в период с 2014 по 2016 гг. на кафедре ветеринарно-санитарной экспертизы в ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и

Научно-технологическом центре животноводства ФГБНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства».

Научно-хозяйственные эксперименты проводились в условиях СХПК племзавод им. Ленина Атнинского района РТ на 387 коровах-первотелках голштинской породы. За период проведения исследований все опытное поголовье крупного рогатого скота СХПК им. Ленина находилось в одинаковых условиях кормления, технологического содержания, ветеринарного обслуживания.

При проведении научно-производственных опытов учитывали следующие показатели: удой, содержание жира и белка в молоке, выход молочного жира и белка высокопродуктивных коров черно-пестрой и холмогорской пород – за 305 дней лактации по данным зоотехнического учета.

Молочную продуктивность определяли путём проведения контрольных доек. Физико-химические показатели в молоке: содержание жира, белка, плотность и сухой обезжиренный остаток молока (СОМО) определяли на приборе "Лактан 1-4". Чистоту молока определяли по ГОСТу 8218-89 "Молоко. Методы определения чистоты", кислотность – по ГОСТ Р 54669-2011 "Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности". Общую микробную обсемененность определяли согласно ГОСТ 32901-2014 "Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа". Определение количества соматических клеток тыс/см³ с препаратом "Мастоприм" проводили с помощью прибора «Соматос – В» согласно рекомендациям производителя.

Кровь, полученную утром до кормления из яремной вены животных, вносили в пробирки с 100 мМ ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ.

Выделение ДНК из цельной крови крупного рогатого скота проводили с использованием комплекта реагентов «ДНК-Сорб-В» согласно инструкции изготовителя по применению (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Идентификацию генотипов определяли по выявляемому полиморфизму последовательностей ДНК.

Статистические расчеты были выполнены по Меркурьевой Е.К. (1977), и с помощью компьютерной программы «Microsoft Excel».

Для проведения исследований и оценки по генам-кандидатам устойчивости коров к маститам были отобраны племенные первотёлки из СХПК им. Ленина Атнинского района Республики Татарстан (РТ) (n=387); быки-производители и ремонтные бычки из ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района (n=20), Мензелинского п/п РТ (n=18), Бугульминского п/п Республики Татарстан (n=20).

Анализ происхождения, продуктивности коров был проведен с помощью программного пакета «Селекс 3.1» (АРМ Плинор, Санкт-Петербург).



Рисунок 1 – Общая схема проведенных исследований

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Органолептические, физико-химические и микробиологические показатели молока коров при субклиническом мастите

По органолептическим и физико-химическим показателям молоко от 360 коров-первотелок соответствовало требованиям ГОСТа 31449-2013 и ТР ТС 033/2013. Молоко было белого с желтоватым оттенком, со специфическим запахом, однородной консистенции, массовая доля жира от 3,4 до 4,93%, массовая доля белка – от 3,11 до 4,34%, СОМО составляло 8,88-9,16%; плотность 1027-1028 кг/м³; кислотность 16-18⁰Т; первой группы чистоты.

В результате проведенных исследований было установлено количество соматических клеток в 25-и пробах молока до 100 клеток, в 225-и пробах – от 100 до 300 клеток, в 89 пробах – от 300 до 500 клеток, в 27-и пробах – 500 клеток и выше. В пробах молока от 27 коров физико-химические показатели были ниже установленных норм.

Полученные данные коррелировали с положительными результатами быстрого маститного теста, которое проводили ежемесячно в соответствии с действующими рекомендациями по борьбе с маститом коров в хозяйстве.

Всего генотипировано 387 голов коров голштинской породы племенного завода им. Ленина Атнинского района РТ, частота генетических вариантов по локусу MBL1 составила: с генотипом СС – 112 голов (30,6%) ТС – 194 голов (53%) , ТТ – 60 голов (16,4%). По результатам исследования на количество соматических клеток в молоке у 27 коров был выявлен субклинический мастит, которые имели гомозиготный генотип СС по локусу гена MBL1 и у 11 коров был выявлен гетерозиготный генотип ТС.

Одним из главных факторов в этиологии и патогенезе мастита у коров является микрофлора. Для проведения бактериологического исследования секрета вымени первотёлок голштинской породы нами отобраны у особей с клинической и субклинической формами мастита. В результате проведенного бактериологического исследования секрета вымени коров были выделены следующие виды микроорганизмов: 14 проб (50,0 %) выявили бактерии группы кишечных палочек (БГКП), 4 пробы (14,3 %) – *St. aureus* и 4 пробы (14,3 %) – была ассоциация БГКП и *St. aureus*. В 6 пробах данных возбудителей не выявлено, что составляет 21,4 %, это показывает, что в возникновении мастита у дойных коров микробный фактор не является единственным (рисунок 2).

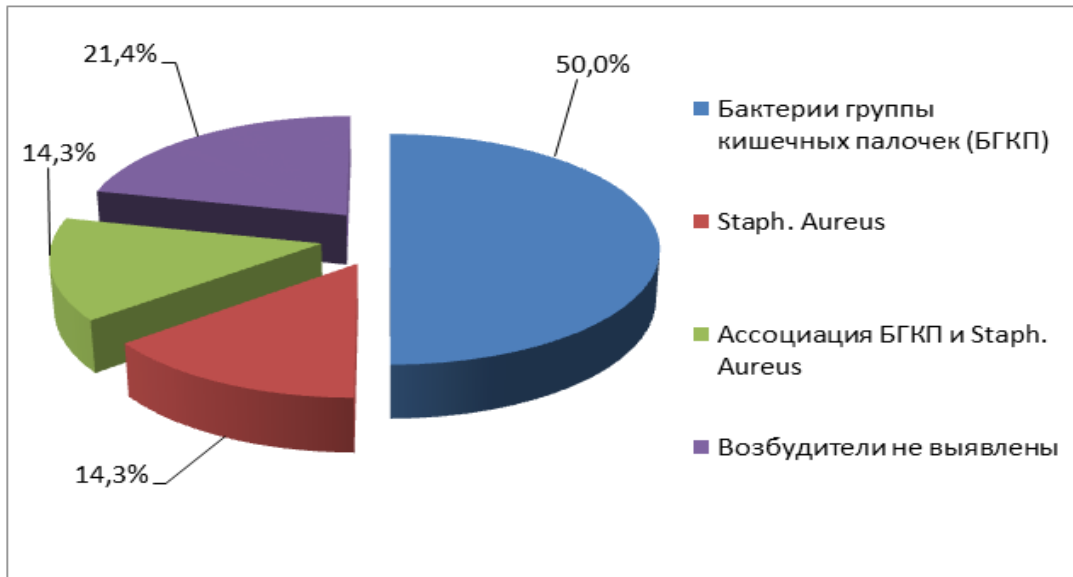


Рисунок 2 – Результаты бактериологического исследования образцов молочного секрета коров, больных маститом, %

Полученные результаты исследований показали, что основная доля случаев заболевания маститом у коров относится к факторам микробной этиологии (78,6%).

3.2 Генотипирование крупного рогатого скота по гену лактоферрина

С помощью метода ПЦР-ПДРФ-анализа ДНК, экстрагированной из крови крупного рогатого скота, нами были исследованы полиморфные аллели и генотипы гена лактоферрина. По результатам амплификации ДНК крупного рогатого скота с парой праймеров LTF-f: 5'-GCCTCATGACAACCTCCSACAS-3' и LTF-r: 5'-CAGGTTGACACATCGGTTGAC-3' получен специфический фрагмент гена лактоферрина длиной 300 п.н. При последующем ПДРФ-анализе продуктов амплификации в тестируемых препаратах ДНК исследуемого поголовья крупного рогатого скота выявлено два аллеля гена лактоферрина – *A* и *B*, и отмечено наличие двух генотипов – LTF^{AA} и LTF^{AB} (рисунок 3).

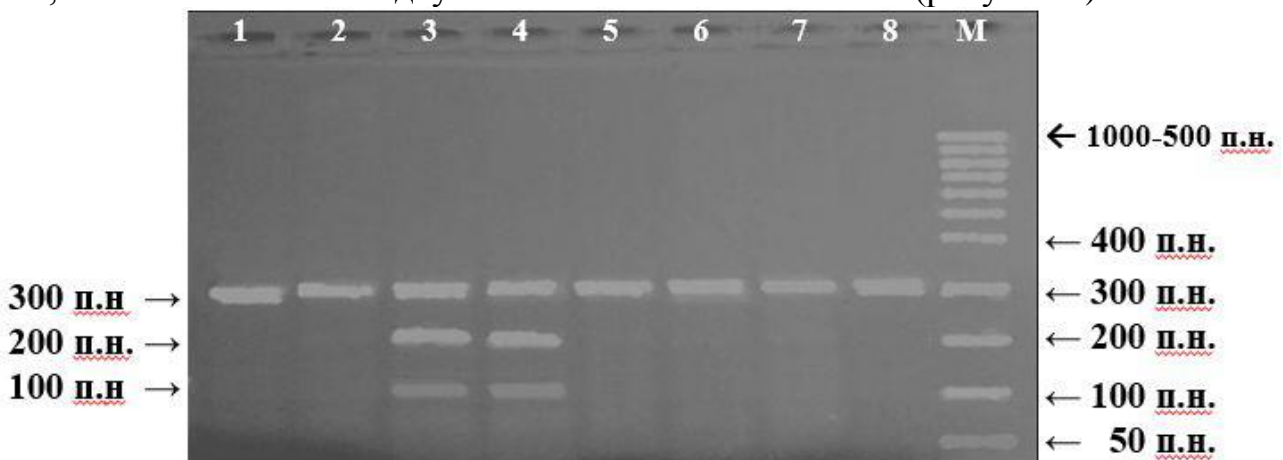


Рисунок 3 – Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ-анализа гена лактоферрина крупного рогатого скота с праймерами LTFf+LTFr и эндонуклеазным расщеплением ферментом *EcoRI*

Обозначения: М) ДНК-маркеры 1000-50 п.н. (СибЭнзим); 1, 2, 5, 6, 7, 8 – генотип *AA* (300 п.н.); 3, 4 – генотип *AB* (300/200/100 п.н.)

Генотипирование крупного рогатого скота по гену лактоферрина осуществляли с учётом схемы выравнивания и картирования амплифицируемых с помощью праймеров LTF-f и LTF-r нуклеотидных последовательностей ДНК локуса *LTF*-гена *Bos taurus* (рисунок 4).

Ген/аллель Праймер LTF-f

LTF/B 001 GCCTCATGAC AACTCCSACA CCAAAACAGT ACTTTATTTT
GTAAATTTTG ACCATTATTA

LTF/A 001

Ген/аллель

LTF/B 061 CTCCCATGTT ATGGTCTTTT CAGCTGTCAA GCAAACAAGG
TGAAGAAAAA ATTTAGTTAG

LTF/A 061

Ген/аллель

LTF/B 121 ATGGGGGTTG CACCTGGAAA АТАААТТТСТ ТАААСТССАТ
АТАСАТГТТТ САААТСТГСТ

LTF/A 121

Ген/аллель

EcoRI

LTF/B 181 GGGTCCCAAG TCCATCTATG AATCCCAGG CTGCCAGTAT
САТАТГСАГСА АТАСТАААГСА

LTF/A 181C.....

Ген/аллель

Праймер LTF-r

LTF/B 241 TACGCTATCT GAATAGCTTA TTAATTCTGC ATATATCAGG
TCAACCGATG TGTCAACCTG

LTF/A 241

**Ген/аллель GenBank A/N ПЦР-продукт EcoRI-рестрикционное
картирование**

LTF/B АН000852 300 п.н. 1-200/201-300 н.

LTF/A 300 п.н. 1-300 н.

Ген/аллель ПДФ-*EcoRI*-профиль

LTF/B 200/100 п.н.

LTF/A 300 п.н.

Рисунок 4 – Схема результатов выравнивания и *EcoRI*-рестрикционного картирования амплифицируемых с помощью праймеров LTF-f и LTF-r

нуклеотидных последовательностей ДНК локуса *LTF*-гена *Bos taurus* (аллели *B* и *A*)

Таким образом, исследования показали возможность применения использованных праймеров *LTF-f* и *LTF-r*, эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* и соответствующего ПЦР-ПДФ-протокола в целом для генотипирования крупного рогатого скота по гену *LTF*.

3.3 Полиморфизм гена лактоферрина у первотёлок голштинской породы

На основании анализа полиморфизма гена лактоферрина 387 первотёлок голштинской породы установлено, что 272 животных или 70,0 % имели гомозиготный генотип LTF^{AA} , а у 115 первотёлок или 30,0 % выявлен генотип LTF^{AB} . Частота встречаемости аллелей *A* и *B* составила 0,85 и 0,15, соответственно (таблица 1, рисунок 5).

Таблица 1 – Полиморфизм гена *LTF* у голштинских первотёлок

Генотип	n	Частота генотипов		Частота аллелей		χ^2
		Наблюдаемая частота (H_o)	Ожидаемая частота (H_e)	<i>A</i>	<i>B</i>	
LTF^{AA}	272	70,3	72,5	0,85	0,15	11,24***
LTF^{AB}	115	29,7	25,3			
LTF^{BB}	0	0	2,2			

*** - $P < 0,001$

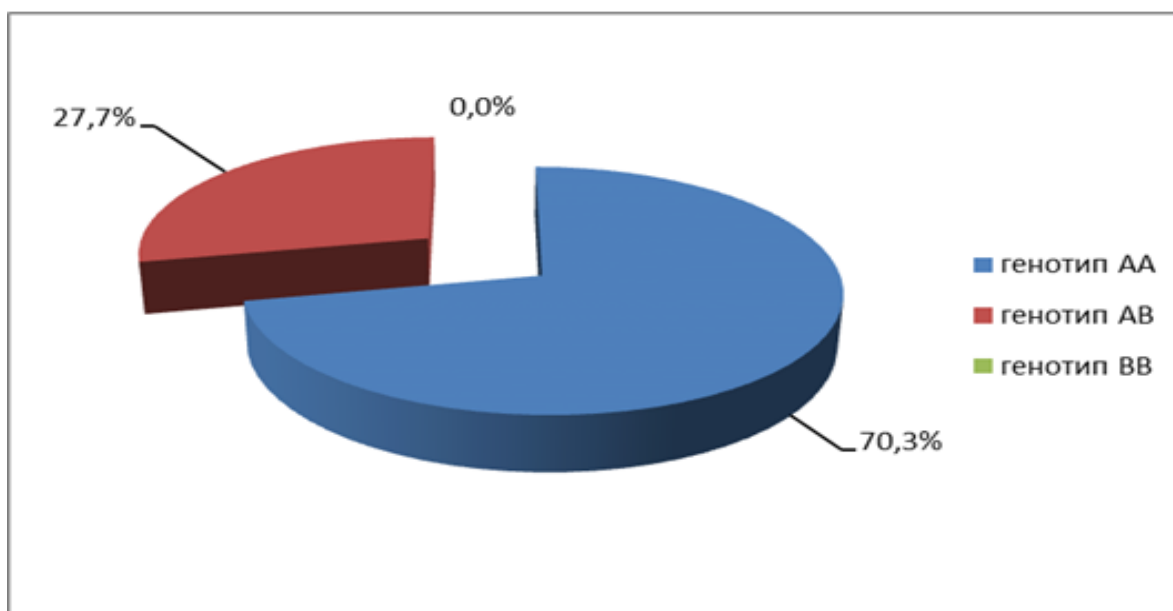


Рисунок 5 – Полиморфизм гена лактоферрина у голштинских первотёлок

По гену *LTF* выражено преимущество аллеля *A* над аллелем *B*. Его частота среди исследованных животных составила 0,75. Среди изученных коров преобладал гомозиготный генотип LTF^{AA} , тогда как генотип LTF^{BB} вообще не встречался. Генетическое равновесие в данной популяции крупного рогатого скота несколько смещено в сторону генотипа *AB* (11,24, при $P < 0,001$).

3.4 Генотипирование крупного рогатого скота по гену манноза-связывающего лектина

С помощью метода ПЦР-ПДРФ-анализа ДНК, экстрагированной из крови крупного рогатого скота, нами были исследованы аллели и генотипы гена манноза-связывающего лектина. По результатам амплификации ДНК крупного рогатого скота с парой праймеров MBL1f: 5'-GTGGTGGCAAATGTTGGCTAAAC-3' и MBL1r: 5'-TGGCTCTCCSTTTTCTCCSTT-3' получен специфический фрагмент гена лактоферрина длиной 255 п.н. При последующем ПДРФ-анализе продуктов амплификации в тестируемых препаратах ДНК исследуемого поголовья крупного рогатого скота выявлено два аллеля гена лактоферрина – *C* и *T*, и отмечено наличие трех генотипов – *MBL1^{CC}*, *MBL1^{TC}* и *MBL1^{TT}* (рисунок 6).

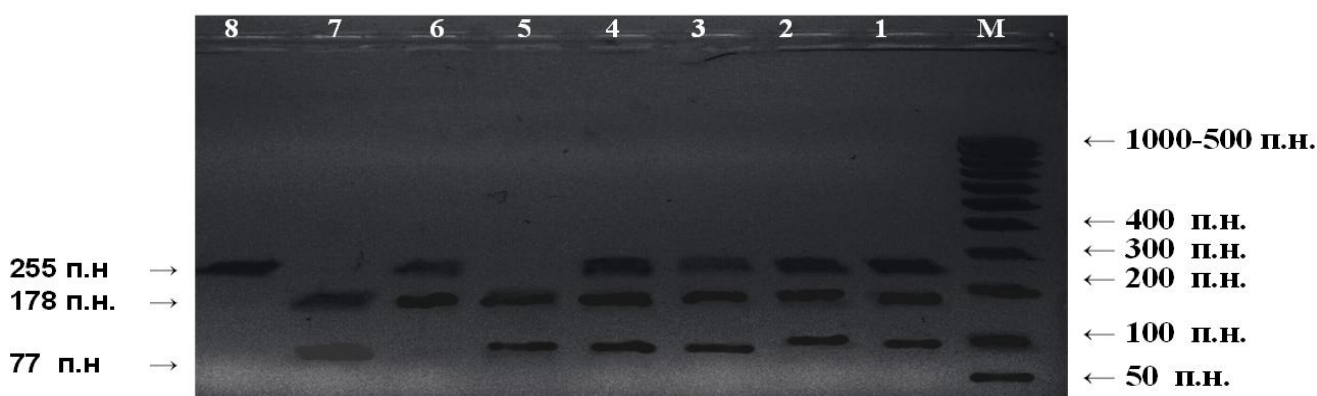


Рисунок 6 – Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ-анализа гена манноза-связывающего лектина крупного рогатого скота с праймерами

MBL1f+MBL1r и эндонуклеазным расщеплением ферментом *HaeIII*

Обозначения: М) ДНК-маркеры 1000-50 п.н. (СибЭнзим); 1, 2, 3, 4, 6 – генотип *CC* (255/178/77 п.н.); 5, 7 – генотип *TC* (178/77 п.н.); 8 – генотип *TT* (255 п.н.).

Генотипирование крупного рогатого скота по гену манноза-связывающего лектина осуществляли с учётом схемы выравнивания и картирования амплифицируемых с помощью праймеров MBL1f и MBL1r нуклеотидных последовательностей ДНК локуса *MBL1*-гена *Bos taurus* (рисунок 7).

Ген/аллель Праймер MBL1f

MBL1/T 001 GTGGTGGCAA ATGTTGGCTA AACAAAATAA
GATGAAASTA TTTTCCSTCAA CTCTCTTCAT

MBL1/C 001

Ген/аллель

MBL1/T 061 TCTAAGGTAA GGATCATGTT CCTGTTTTCA TCACTTCSTG
TCCTCCTGTG TTTGGTGACA

MBL1/C 061

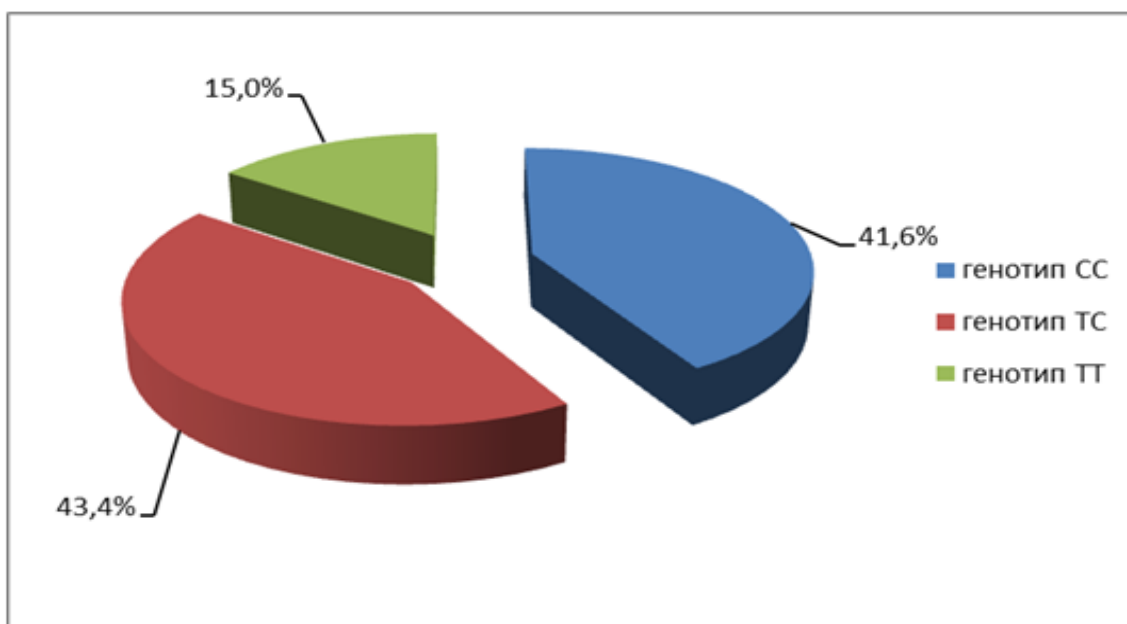


Рисунок 8 – Полиморфизм гена манноза-связывающего лектина у голштинских первотёлок

По гену *MBL1* выражено преимущество аллеля *C* над аллелем *T*. Его частота среди исследованных животных составила 0,63. Среди изученных коров преобладал гетерозиготный генотип *MBL1^{TC}*. Генетическое равновесие в данной популяции крупного рогатого скота несколько находится в равновесии.

3.6 Ассоциация полиморфизма гена лактоферрина с молочной продуктивностью и качеством молока у первотёлок голштинской породы

Анализ ассоциации полиморфизма гена лактоферрина с молочной продуктивностью 387 первотёлок показал, что наибольшим удоём, характеризовались коровы с гетерозиготным генотипом *LTF^{AB}*. Их удой составил в среднем 6481 кг молока. В отношении к сверстницам с генотипом *LTF^{AA}* разница составила 302 кг ($P < 0,001$) молока (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние полиморфных вариантов гена лактоферрина на показатели молочной продуктивности первотёлок

Генотип	N	Удой, кг	Белок, %	Выход белка, кг	Жир, %	Выход жира, кг	Содержание соматических клеток, тыс./мл
<i>LTF^{AA}</i>	272	6179 ±65,9	2,94 ±0,018	181,7 ±2,17	3,89 ±0,025	240,4 ±2,87	279,2 ±11,50
<i>LTF^{AB}</i>	115	6481 ±18,1	2,96 ±0,026	191,8 ±3,69	3,89 ±0,039	252,1 ±4,56	272,5 ±14,14
<i>LTF^{AB}</i> к <i>LTF^{AA}</i>	-	+302***	+0,02	+10,1*	0	+11,7*	- 6,71

* - $P < 0,05$; *** - $P < 0,001$

Однако, по содержанию белка в молоке разница между особями с разными генотипами *LTF* незначительная – 0,02 %, а по содержанию жира в

молоке отличий вообще не было. Наибольший выход молочного белка и жира имели животные с генотипом LTF^{AB} . Они превосходили по этим показателям первотёлок с генотипом LTF^{AA} на 10,1 кг ($P<0,05$) и 11,7 кг ($P<0,05$), соответственно.

По содержанию соматических клеток в молоке выгодно отличались коровы с генотипом LTF^{AB} по сравнению с аналогами с генотипом LTF^{AA} . В их молоке содержание соматических клеток было на 6,71 тыс./мл меньше.

3.7 Ассоциация полиморфизма гена манноза-связывающего лектина с молочной продуктивностью и качеством молока у первотёлок голштинской породы

Анализ ассоциации полиморфизма гена манноза-связывающего лектина с молочной продуктивностью 387 первотёлок показал, что наибольшим удоём обладали коровы с гетерозиготным генотипом $MBLI^{TC}$. Их удой составил в среднем 6425 кг молока. В отношении к сверстницам с генотипами $MBLI^{CC}$ и $MBLI^{TT}$ разница составила 320 кг ($P\leq 0,01$) и 157 кг молока, соответственно (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние полиморфных вариантов гена манноза-связывающего лектина на показатели молочной продуктивности первотёлок

Генотип	n	Удой, кг	Белок, %	Выход белка, кг	Жир, %	Выход жира, кг	Содержание соматических клеток, тыс./мл
$MBLI^{CC}$	161	6105 $\pm 74,6$	2,91 $\pm 0,024$	177,7 $\pm 2,48$	3,90 $\pm 0,035$	238,1 $\pm 3,43$	269,6 $\pm 14,28$
$MBLI^{TC}$	168	6425 $\pm 98,3$	3,00 $\pm 0,021$	192,8 $\pm 3,19$	3,89 $\pm 0,031$	249,9 $\pm 4,07$	283,6 $\pm 13,70$
$MBLI^{TT}$	58	6268 $\pm 139,7$	2,88 $\pm 0,046$	180,5 $\pm 4,67$	3,84 $\pm 0,046$	240,7 $\pm 5,83$	279,4 $\pm 23,83$
$MBLI^{TC}$ к $MBLI^{CC}$	-	+320**	+0,09**	+15,1***	- 0,01	+11,8*	+14,0
$MBLI^{TC}$ к $MBLI^{TT}$	-	+157	+0,12*	+12,3*	+0,05	+9,2	+4,2

* - $P<0,05$; ** - $P<0,01$, *** - $P<0,001$

По содержанию белка в молоке значительно превосходили особи с генотипом $MBLI^{TC}$. Их преимущество над коровами с другими генотипами $MBLI$ составляло 0,09-0,12 % ($P<0,05-0,01$). При этом по содержанию жира в молоке выгодно отличались животные с генотипом $MBLI^{CC}$ (3,90 %). Они превосходили по этому показателю сверстниц с другими генотипами на 0,01-0,06 %.

Наибольшие показатели по выходу молочного белка и жира имели животные с генотипом $MBLI^{TC}$. Они превосходили по этим данным первотёлок с другими генотипами $MBLI$ на 12,3-15,1 кг ($P<0,05-0,001$) и 9,2-11,8 кг, соответственно. Причём межгрупповая разница по выходу жира, составлявшая 11,8 кг ($P<0,05$), была статистически достоверная.

Содержание соматических клеток в молоке было в пределах от 269,6 тыс./мл в группе коров с генотипом $MBL1^{CC}$; до 283,6 тыс./мл в группе сверстниц с генотипом $MBL1^{TC}$. У аналогов с генотипом $MBL1^{TT}$ этот показатель был промежуточный (279,4 тыс./мл).

3.8 Сопряжённость признаков молочной продуктивности у коров с разными генотипами гена лактоферрина

В результате проведённых исследований по выявлению коррелятивной зависимости между признаками молочной продуктивности у первотёлок с разными генотипами гена LTF нами выявлен характер связи.

Данные таблицы 5 показывают, что у первотёлок с генотипами AA и AB гена LTF коэффициенты корреляции между удоём и содержанием жира в молоке были слабые (от $-0,08$ до $-0,16$).

Таблица 5 – Корреляция между количественными признаками первотёлок с разными генотипами гена LTF

Генотип	n	Удой, кг - Жир, %	Удой, кг - Белок, %	Жир, % - Белок, %	Удой, кг - Соматические клетки, тыс./мл	Жир, % - Соматические клетки, тыс./мл	Белок, % - Соматические клетки, тыс./мл
LTF^{AA}	272	-0,08 $\pm 0,060$	-0,07 $\pm 0,060$	0,09 $\pm 0,060$	-0,04 $\pm 0,061$	-0,02 $\pm 0,061$	-0,15* $\pm 0,059$
LTF^{AB}	115	-0,16 $\pm 0,091$	-0,01 $\pm 0,093$	0,10 $\pm 0,092$	-0,04 $\pm 0,093$	-0,09 $\pm 0,092$	-0,03 $\pm 0,093$

* - $P < 0,05$

Корреляционная связь между удоём и содержанием белка у коров с генотипами LTF^{AA} и LTF^{AB} была также отрицательно направленной (от $-0,01$ до $-0,07$).

Коэффициенты корреляции между жиром и белком были положительными. Данные коэффициенты были слабыми и почти одинаковыми $0,09-0,10$.

Установлено, что коэффициенты корреляции между такими показателями, как удоёй-соматические клетки, жир-соматические клетки и белок-соматические клетки оказались отрицательными. Данные коэффициенты были невысокими и колебались от $-0,02$ до $-0,15$.

3.9 Сопряжённость признаков молочной продуктивности у животных с разными генотипами гена манноза-связывающего лектина

В результате проведённых исследований по выявлению коррелятивной зависимости между признаками молочной продуктивности у первотёлок с разными генотипами гена $MBL1$ нами выявлен характер связи.

Данные таблицы 6 показывают, что у первотёлок с генотипами *CT*, *TC* и *TT* гена *MBL1* коэффициенты корреляции между удоём и содержанием жира в молоке были слабые (от $-0,09$ до $-0,12$).

Корреляционная связь между удоём и содержанием белка у коров с генотипами *MBL1^{CC}*, *MBL1^{TC}* и *MBL1^{TT}* была также отрицательно направленной (от $-0,04$ до $-0,14$).

Коэффициенты корреляции между жиром и белком были положительными. Данные коэффициенты были слабыми $0,04-0,06$, за исключением животных с генотипом *TT* гена *MBL1*, у которых этот показатель был средним, достоверным и составил $0,32$ ($P < 0,05$).

Установлено, что коэффициенты корреляции между такими показателями, как удои-соматические клетки, жир-соматические клетки и белок-соматические клетки оказались отрицательными. Данные коэффициенты были невысокими и колебались от $-0,01$ до $-0,18$.

Таблица 6 – Корреляция между количественными признаками первотёлок с разными генотипами гена *MBL1*

Генотип	n	Удой, кг - Жир, %	Удой, кг - Белок, %	Жир, % - Белок, %	Удой, кг - Соматические клетки, тыс./мл	Жир, % - Соматические клетки, тыс./мл	Белок, % - Соматические клетки, тыс./мл
<i>MBL1^{CC}</i>	161	$-0,09$ $\pm 0,078$	$-0,09$ $\pm 0,078$	$0,06$ $\pm 0,079$	$-0,02$ $\pm 0,079$	$-0,01$ $\pm 0,079$	$-0,06$ $\pm 0,079$
<i>MBL1^{TC}</i>	168	$-0,12$ $\pm 0,076$	$-0,04$ $\pm 0,077$	$0,04$ $\pm 0,077$	$-0,02$ $\pm 0,077$	$-0,03$ $\pm 0,077$	$-0,18^*$ $\pm 0,075$
<i>MBL1^{TT}</i>	58	$-0,09$ $\pm 0,131$	$-0,14$ $\pm 0,130$	$0,32^*$ $\pm 0,124$	$-0,02$ $\pm 0,131$	$-0,18$ $\pm 0,129$	$-0,16$ $\pm 0,130$

* - $P < 0,05$

3.10 Встречаемость комплексных генотипов генов манноза-связывающего лектина и лактоферрина у первотёлок голштинской породы

На основании анализа встречаемости комплексных генотипов генов манноза-связывающего лектина и лактоферрина выборки из 387 первотёлок голштинской породы установлено, что в данной популяции встречалось 6 комплексных генотипов генов *MBL1* и *LTF* (таблица 7).

Среди 387 особей обладали комплексными генотипами *MBL1^{CC}LTF^{AA}* – 115 (29,72 %) первотёлок, *MBL1^{TC}LTF^{AA}* – 114 (29,46 %), *MBL1^{CC}LTF^{AB}* и *MBL1^{TC}LTF^{AB}* по 49 (12,66 %), *MBL1^{TT}LTF^{AA}* – 44 (11,37 %), *MBL1^{TT}LTF^{AB}* – 16 (4,13 %) животных, соответственно.

Таблица 7 – Встречаемость комплексных генотипов *MBL1* и *LTF* у голштинских первотёлочек

Комбинации генотипов генов <i>MBL1</i> и <i>LTF</i>	Количество	Соотношение
	n = 387	100%
<i>MBL1^{CC}LTF^{AA}</i>	115	29,72
<i>MBL1^{TC}LTF^{AA}</i>	114	29,46
<i>MBL1^{TT}LTF^{AA}</i>	44	11,37
<i>MBL1^{CC}LTF^{AB}</i>	49	12,66
<i>MBL1^{TC}LTF^{AB}</i>	49	12,66
<i>MBL1^{TT}LTF^{AB}</i>	16	4,13
<i>MBL1^{CC}LTF^{BB}</i>	-	-
<i>MBL1^{TC}LTF^{BB}</i>	-	-
<i>MBL1^{TT}LTF^{BB}</i>	-	-

Более наглядно соотношение комплексных генотипов по генам *MBL1* и *LTF* в популяции голштинских коров показано на рисунке 9.

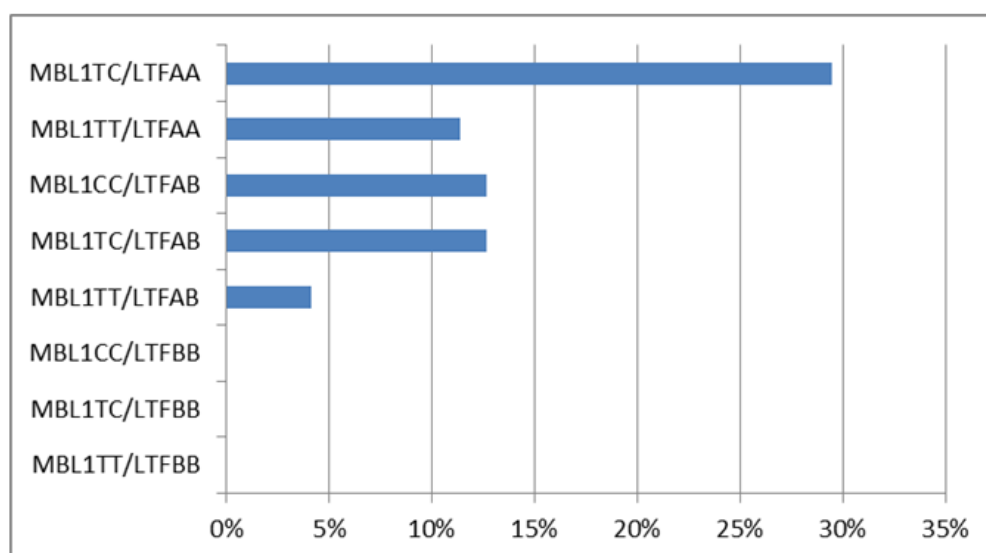


Рисунок 9 – Встречаемость комплексных генотипов *MBL1* и *LTF* у голштинских первотёлочек

Благодаря проведённому анализу определено, что наибольшая встречаемость комплексных генотипов *MBL1* / *LTF* характерна для первотёлочек двух комплексных генотипов *MBL1^{CC}LTF^{AA}* и *MBL1^{TC}LTF^{AA}*, что в общем составляет 59,18 % от поголовья изучаемой популяции. Причём, таких комплексных генотипов, как *MBL1^{CC}LTF^{BB}*, *MBL1^{TC}LTF^{BB}* и *MBL1^{TT}LTF^{BB}* у исследованных животных вообще не встречалось, это связано с отсутствием особей с генотипом *LTF^{BB}*.

3.11 Ассоциация комплексных генотипов генов манноза-связывающего лектина и лактоферрина с молочной продуктивностью и качеством молока у первотёлок голштинской породы

Анализ ассоциации комплексных генотипов манноза-связывающего лектина и лактоферрина с молочной продуктивностью 387 первотёлок показал, что наибольшим удоём, характеризовались коровы с комплексными генотипами $MBLI^{TC}LTF^{AB}$ и $MBLI^{TT}LTF^{AB}$. Их удои составили в среднем 6619-6626 кг молока. В отношении к сверстницам с другими комплексными генотипами $MBLI / LTF$ разница составила 267-572 кг молока, причём превосходство было статистически достоверным ($P < 0,05-0,01$) над животными с комплексными генотипами $MBLI^{CC}LTF^{AA}$ и $MBLI^{TT}LTF^{AA}$ (таблица 8).

Таблица 8 – Влияние комплексных генотипов манноза-связывающего лектина и лактоферрина на показатели молочной продуктивности первотёлок

Комплексный генотип	n	Удой, кг	Белок, %	Выход белка, кг	Жир, %	Выход жира, кг	Содержание соматических клеток, тыс./мл
$MBLI^{CC}LTF^{AA}$	115	6054 ±81,7	2,91 ±0,029	176,2 ±2,86	3,89 ±0,041	235,5 ±3,79	277,1 ±18,83
$MBLI^{TC}LTF^{AA}$	114	6352 ±116,3	3,00 ±0,025	190,6 ±3,73	3,89 ±0,035	247,1 ±5,04	272,8 ±16,65
$MBLI^{TT}LTF^{AA}$	44	6093 ±172,5	2,86 ±0,055	174,3 ±5,05	3,83 ±0,055	233,4 ±7,02	304,8 ±30,1
$MBLI^{CC}LTF^{AB}$	49	6229 ±162,7	2,92 ±0,042	181,9 ±4,94	3,93 ±0,069	244,8 ±7,30	251,5 ±17,63
$MBLI^{TC}LTF^{AB}$	49	6619 ±188,9	2,97 ±0,039	196,6 ±6,31	3,87 ±0,060	256,2 ±7,10	299,4 ±23,09
$MBLI^{TT}LTF^{AB}$	16	6626 ±181,0	2,94 ±0,074	194,8 ±8,75	3,91 ±0,109	259,1 ±9,09	240,2 ±43,47

По содержанию белка в молоке значительно превосходили особи с комплексным генотипом $MBLI^{TC}LTF^{AA}$ (3,00 %). Их преимущество над коровами с другими комплексными генотипами $MBLI / LTF$ составило 0,03-0,14 %, причём статистически достоверная ($P < 0,05-0,01$) разница была с животными комплексных генотипов $MBLI^{CC}LTF^{AA}$ и $MBLI^{TT}LTF^{AA}$. При этом по содержанию жира в молоке выгодно отличались животные с комплексным генотипом $MBLI^{CC}LTF^{AB}$ (3,93 %). Они превосходили по этому показателю сверстниц с другими комплексными генотипами на 0,02-0,10 %.

Наибольшие показатели по выходу молочного белка и жира имели животные с комплексными генотипами $MBLI^{TC}LTF^{AB}$ и $MBLI^{TT}LTF^{AB}$ – 194,8-196,9 кг и 256,2-259,1 кг, соответственно. Они превосходили по этим данным первотёлок с другими комплексными генотипами $MBLI / LTF$ на 4,2-22,3 кг и 9,1-25,7 кг, соответственно. Причём межгрупповая разница по выходу молочного белка и жира была статистически достоверная ($P < 0,05-0,01$) с

комплексными генотипами $MBL1^{CC}LTF^{AA}$, $MBL1^{TC}LTF^{AA}$ (по выходу молочного белка) и $MBL1^{CC}LTF^{AA}$, $MBL1^{TT}LTF^{AA}$ (по выходу молочного жира).

Содержание соматических клеток в молоке было в пределах от 240,2 тыс./мл в группе коров с комплексным генотипом $MBL1^{TT}LTF^{AB}$; до 304,8 тыс./мл в группе сверстниц с комплексным генотипом $MBL1^{TT}LTF^{AA}$. Межгрупповая разница животных с разными комплексными генотипами $MBL1/LTF$ была статистически недостоверной.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведённых исследований сделаны следующие выводы:

1. Установлено, что основная доля случаев заболевания маститом у коров относится к факторам микробной этиологии (78,6 %). По определению количества соматических клеток в молоке у 27 коров был выявлен субклинический мастит, которые имели гомозиготный генотип CC по локусу гена $MBL1$ и у 11 коров был выявлен гетерозиготный генотип TC .

2. Анализ голштинских первотёлок с разными генотипами LTF и $MBL1$ по молочной продуктивности и качеству молока показал, что животные с генотипами LTF^{AB} и $MBL1^{TC}$ в сравнении с аналогами с другими генотипами имели больше: удои на 302 кг ($P < 0,001$) и 157-320 кг, выход молочного белка на 10,1 кг ($P < 0,05$) и 12,3-15,1 кг ($P < 0,05-0,001$), выход молочного жира на 11,7 кг ($P < 0,05$) и 9,2-11,8 кг, соответственно. По содержанию соматических клеток в молоке животные с генотипами LTF^{AB} и $MBL1^{CC}$ выгодно уступали сверстницам на 6,71 тыс./мл и 4,2-14,0 тыс./мл, соответственно. В зависимости от линейной принадлежности животных более высокая молочная продуктивность и качество молока у коров с генотипом LTF^{AB} линии Айвенго, а также с генотипом $MBL1^{TC}$ линии Айвенго и с генотипом $MBL1^{TT}$ линий Айдиала и Рокмэна.

3. Высокими показателями молочной продуктивности (удой – 6619-6626 кг, выход молочного белка – 194,8-196,9 кг, выход молочного жира – 256,2-259,1 кг) характеризовались первотёлки с комплексными генотипами $MBL1^{TC}LTF^{AB}$ и $MBL1^{TT}LTF^{AB}$, что выше, чем у сверстниц с другими генотипами на 267-572 кг, 4,2-22,3 кг и 9,1-25,7 кг, соответственно. По содержанию соматических клеток в молоке несколько лучшее положение занимали животные с комплексным генотипом $MBL1^{TT}LTF^{AB}$. В зависимости от линейной принадлежности животных более высокая молочная продуктивность и качество молока у коров трёх комплексных генотипов: $MBL1^{TT}LTF^{AB}$ линии Айвенго, $MBL1^{TT}LTF^{AB}$ линии Рокмэна и $MBL1^{TT}LTF^{AB}$ линии Чифтейна.

4. В группах первотёлок с разными генотипами LTF и $MBL1$ между основными показателями молочной продуктивности и качеством молока установлена слабая отрицательная связь. В некоторой степени хорошие и значимые коэффициенты корреляции выявлены между белком-соматическими клетками (от -0,15 до -0,18, при $P < 0,05$) у животных с генотипами LTF^{AA} и $MBL1^{TC}$, а также между жиром-белком (0,32, при $P < 0,05$) у аналогов с генотипом $MBL1^{TT}$. В зависимости от линейной принадлежности животных наилучшие показатели взаимосвязи между удоем-жиром (1,00, при $P < 0,001$) у особей с генотипом LTF^{AA} линии Чифа, между жиром-соматическими клетками

(-0,98, при $P < 0,01$) у особей с генотипом LTF^{AB} линии Соверинга, а также между жиром-белком (0,75, при $P < 0,05$) у сверстниц с генотипом $MBL1^{TT}$ линии Айвенго, между белком-соматическими клетками (-0,41, при $P < 0,001$) у сверстниц с генотипом $MBL1^{TC}$ линии Чифа.

5. Апробированные ПЦР-ПДРФ-протоколы для генотипирования крупного рогатого скота по генам LTF и $MBL1$ являлись действенными подходами к определению генотипической принадлежности исследуемой выборки первотёлок голштинской породы.

6. В популяции первотёлок голштинской породы по частоте встречаемости преобладали A аллель (0,85) и генотип LTF^{AA} (70,3%) гена лактоферрина, C аллель (0,63) и генотип $MBL1^{TC}$ (43,4%) гена манноза-связывающего лектина. В зависимости от линейной принадлежности животных высокая встречаемость A аллеля (0,72-0,86) гена LTF и C аллеля (0,56-0,76) гена $MBL1$ сохраняется.

7. В популяции голштинских первотёлок было 6 из 9 возможных комплексных генотипов $MBL1 / LTF$. Наибольшая встречаемость комплексных генотипов в популяции коров следующая: $MBL1^{CC}LTF^{AA}$ и $MBL1^{TC}LTF^{AA}$ (29,46-29,76 %). В зависимости от линейной принадлежности животных более высокая встречаемость этих комплексных генотипов в линии Айдиала (38,7 %) и линиях Рокмэна, Соверинга (33,3-33,8%), соответственно.

5 ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

На основании проведённых исследований предлагается производству:

1. Лабораториям, проводящим исследования на уровне ДНК, рекомендуем использовать апробированную технику генотипирования крупного рогатого скота по локусам генов LTF и $MBL1$.

2. Скотоводческим хозяйствам, занимающимся разведением племенного скота, с целью повышения молочной продуктивности и качества молока, а также снижения случаев маститов при отборе животных учитывать сочетания генотипов по локусам генов LTF и $MBL1$.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шамсиева, Л.В. Исследование полиморфизма гена LTF у коров голштинской породы методом ПЦР-ПДРФ анализа для определения устойчивости к маститам / Л.В. Шамсиева, Г.Р. Юсупова, Ф.Ф. Зиннатова, Ю.Р. Юльметьева, Ш.К. Шакиров // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны». – Санкт-Петербург, 2015. – С. 245-246.

2. Юльметьева, Ю.Р. Генотипирование ремонтного молодняка крупного рогатого скота для определения племенной ценности / Ю.Р. Юльметьева, Ф.Ф. Зиннатова, Ш.К. Шакиров, Л.В. Шамсиева, Г.Р. Юсупова, Е.Н. Рачкова, Т.М. Ахметов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – 2015. -Т. 223. – С. 243-248.*

3. Рачкова, Е.Н. Полиморфизм гена пролактина у телок голштинской породы / Е.Н. Рачкова, Ф.Ф. Зиннатова, Ю.Р. Юльметьева, Л.В. Шамсиева, Ш.К. Шакиров, Г.Р. Юсупова, Т.М. Ахметов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня основания ТатНИИСХ «Повышение эффективности АПК в современных условиях». – 2015. – С. 522-526.

4. Юльметьева, Ю.Р. Влияние генетических аспектов на динамику молочной продуктивности голштинского скота / Ю.Р. Юльметьева, Ф.Ф. Зиннатова, Е.Н. Рачкова, Л.В. Шамсиева, Ш.К. Шакиров // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – № 11. – С. 99-101.*

5. Зиннатова, Ф.Ф. Генетически обусловленная устойчивость коров к маститам / Ф.Ф. Зиннатова, Л.В. Шамсиева, Г.Р. Юсупова, Ю.Р. Юльметьева, Ш.К. Шакиров // Ветеринарный врач. – 2016. - № 5. – С. 39-43.*

6. Шамсиева, Л.В. Исследование полиморфизма гена MBL1 у коров голштинской породы методом ПЦР – ПДРФ анализа для определения устойчивости к маститам / Л.В. Шамсиева, Г.Р. Юсупова // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны». – Санкт-Петербург, 2016. – С. 232-233.

7. Рачкова, Е.Н. Оценка полиморфизма гена стеарол-коадесатуразы коров-первотелок голштинской породы в условиях Республики Татарстан / Е.Н. Рачкова, Ф.Ф. Зиннатова, Ю.Р. Юльметьева, Л.В. Шамсиева, Т.М. Ахметов, Ш.К. Шакиров // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны». – Санкт-Петербург, 2016. – С. 161-162.

8. Шамсиева, Л.В. Физико-химические показатели молока при субклиническом мастите коров / Л.В. Шамсиева // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – 2017. - Т. 232. – С. 159-162.*

*- издания, рекомендованные ВАК РФ.

