

pigs / M. Rothschild [et al.] // J. Genetics. – 1996. – Vol. 93. – P. 201-205.

19. A major gene for litter size in pigs / M. F. Rothschild [et al.] // Proc. 5<sup>th</sup> World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. – 2004. – Vol. 22. – P. 448.

20. Russo, V. Analysis of single nucleotide polymorphisms in major and candidate genes for production traits in Nero Siciliano pig breed / V. Russo [et al.] // Ital J. Anim. Sc. 2004. – Vol. 3. – P. 19-29.

21. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines / T. H. Short [et al.] // J. Anim. Sc. – 1997. – Vol. 75, № 12. – P. 3138 – 3142.

22. Southwood, O. I. Evaluation of the estrogen receptor (ESR) gene in Meishan synthetic and Large White pigs / O. I. Southwood [et. al.] // Proceedings of the European Association of Animal Production. – 1995. – Prague.

23. Van Rens, B. T. T. M. The effect of estrogen receptor genotype on litter size and placental traits at term in F2 crossbred gilts / B. T. T. M. Van Rens // J. Theriogenology. – 2002. – N 57. – P. 1635-1649.

УДК 636.4.082:612.8:577.113.1

## **АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ БЕЛОРУССКОЙ ЧЁРНО-ПЁСТРОЙ ПОРОДЫ ПО ЛОКУСУ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА И НАЛИЧИЮ МУТАЦИИ VLAD**

И.П. ШЕЙКО, доктор сельскохозяйственных наук  
О.П. КУРАК, кандидат сельскохозяйственных наук  
Т.И. ЕПИШКО, кандидат сельскохозяйственных наук  
РУП «Институт животноводства НАН Беларуси»  
Н.Ф. ЖУК, кандидат сельскохозяйственных наук  
Л.В. ЕВТУШЕВСКАЯ  
РСУП «Брестплемпредприятие»

**Реферат.** Проведено ДНК-тестирование популяций быков-производителей белорусской чёрно-пёстрой породы по локусу гена каппа-казеина (CSN3) и наличию мутации VLAD методом ПЦР-ПДРФ. Проанализирована генетическая структура исследованных популяций по данным локусам. Проведён расчёт генного равновесия по гену каппа-казеина. Выявлены животные-носители мутации VLAD.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, метод ПЦР-ПДРФ, каппа-казеин (CSN3), мутация VLAD.

**Введение.** Успех селекционно-племенных программ в значительной мере зависит от точности определения племенной ценности животных. Традиционные методы оценки животных, основанные на фенотипических показателях родителей и потомков, на современном этапе не могут в полной мере удовлетворить требования, предъявляемые к селекции. На показатели хозяйственно-полезных признаков оказывают влияние как паратипические, так и генотипические факторы. До

недавнего времени использование генетических методов в селекции животных вызывало много вопросов, отчасти потому, что большинство количественных признаков имеют полигенный характер наследования, что осложняет ведение селекционной работы, однако разработка новых методов молекулярно-генетического анализа предоставила практическую возможность использования ДНК-маркеров в селекции.

Хорошо известно, что существуют признаки, которые фенотипически проявляются только у животных одного пола, например, показатели молочной продуктивности. Однако следует принимать во внимание генотипическое влияние на данные признаки и отца, и матери. Следовательно, отбор по ним нужно проводить одновременно у особей одного и другого пола. Анализ полиморфизма белков молока несложен, однако он может быть применён только для лактирующих коров. Тестирование молодняка с его помощью вообще невозможно, а оценка быков-производителей носит опосредованный характер – через тестирование лактирующих дочерей. В конце 80-х годов XX века появились сообщения о том, что качество молока и возможность его использования в сыроварении в значительной степени зависит от аллельных вариантов гена каппа-казеина (CSN3) [1]. Установлено, что аллель CSN3<sup>B</sup> связан с более высоким уровнем содержания белка в молоке (на 0,2-0,4 %) и лучшими технологическими свойствами [2, 3, 4]. Применение метода полимеразной цепной реакции-полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) даёт возможность определять аллельные варианты гена каппа-казеина независимо от пола и возраста животных, даже у эмбрионов, что открывает возможности селекции желаемых генотипов по белкам молока уже перед их пересадкой [5]. Бесспорным преимуществом данного метода является возможность экспертизы не только молока и крови, но и другого материала, например, спермы или ткани.

В настоящее время в ведущих генетических центрах мира проводятся исследования по идентификации и реальному использованию данного гена в молочном скотоводстве.

Существуют также признаки, которые проявляются только в определённом возрасте или физиологическом состоянии. Так, мутация BLAD (синдром иммунодефицита крупного рогатого скота), имеющая аутосомно-рецессивный характер наследования, проявляется только у животных, гомозиготных по соответствующему гену, и не имеет клинических проявлений у гетерозиготных [6]. Болезнь фенотипически проявляется у рецессивных гомозигот как предрасположенность к респираторным инфекциям, диареем, обусловленным низкой естественной резистентностью организма к бактериальным инфекциям. Такие животные погибают в первые месяцы постнатального развития.

Опасность связана с использованием современной технологии раз-

множения животных. От одного быка могут быть получены десятки тысяч потомков, поэтому частота нежелательных аллелей может резко увеличиться в течение малого числа поколений. Негативная селекция на уровне фенотипа является неэффективной в связи с низкой частотой гомозигот по отношению к гетерозиготам.

Единственным существующим к настоящему времени способом, позволяющим выявить носительство данной мутации, является анализ амплифицированного участка гена BLAD по полиморфизму длин рестрикционных фрагментов [7, 8, 9]. В большинстве стран мира с высоким уровнем племенного дела в каталогах быков-производителей обязательно делается отметка о наличии в родословной результатов анализа на наличие данной мутации.

Нами была поставлена цель – изучить генетическую структуру популяций быков-производителей белорусской чёрно-пёстрой породы Минского, Брестского и Гродненского племпредприятий по локусу каппа-казеина и наличию мутации BLAD.

**Материал и методика исследований.** Для проведения исследований проведено ДНК-тестирование по локусам генов каппа-казеина и BLAD быков-производителей белорусской чёрно-пёстрой породы Брестского (n=111), Минского (n=18) и Гродненского (n=57) племпредприятий методом ПЦР-ПДРФ.

Ядерную ДНК выделяли из разбавленной спермы (гранулы и пайеты) перхлоратным методом с собственными модификациями. Основные растворы для выделения ДНК, амплификации и рестрикции готовили по Маниатису, Фрич Э., Сэмбруку Дж. [10].

Для амплификации фрагмента гена каппа-казеина использовали олигонуклеотидные праймеры:

CAS1: 5' -ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG T- 3'

CAS2: 5'- TTT ATT AAT AAG TCC ATG AAT CTT G -3'.

Для амплификации фрагмента гена BLAD использовали олигонуклеотидные праймеры:

BLAD1: 5' -TGA GAC CAG GTC AGG CAT TGC GTT CA- 3'

BLAD2: 5'- CCC CCA GCT TCT TGA CGT TGA CGA GGT C -3'.

Рестрикционный анализ продуктов амплификации проводился с использованием рестриктаз HindIII и TaqI соответственно.

Концентрацию ДНК, специфичность амплификата и результаты рестрикции оценивали электрофоретическим методом в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с помощью трансиллюминатора в проходящем УФ-свете с длиной волны 260 нм. В качестве маркера использовали ДНК плазмиды pBR322, расщепленную рестриктазой AluI. Для анализа распределения рестрикционных фрагментов ДНК в агарозном геле после электрофореза применяли компьютерную видеосистему и программу VItran.

Частоту генотипов и аллелей рассчитывали стандартными биометрическими методами [11].

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** Результаты тестирования быков-производителей трёх племпредприятий республики по локусам генов CSN3 и BLAD показали наличие полиморфизма по обоим исследованным генам. Генетическая структура популяций быков-производителей белорусской чёрно-пёстрой породы по локусу гена каппа-казеина представлена в табл. 1.

Таблица 1.  
Генетическая структура популяций быков-производителей белорусской чёрно-пёстрой породы по локусу гена каппа-казеина

Принадлежность	n	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллелей	
		AA	AB	BB	A	B
PCYП «Минскплемпредприятие»	18	72	28	-	0,861	0,139
PCYП «Брестплемпредприятие»	111	68	31	1	0,838	0,162
PCYП «Гродноплемпредприятие»	57	63	35	2	0,807	0,192
Итого	186	67	32	1	0,831	0,169

Полиморфизм гена каппа-казеина в исследованных популяциях представлен двумя аллелями: CSN3<sup>A</sup> и CSN3<sup>B</sup>. Идентифицированы генотипы CSN3<sup>AA</sup>, CSN3<sup>AB</sup> и CSN3<sup>BB</sup>. Во всех исследованных популяциях выявлено преобладание животных генотипа CSN3<sup>AA</sup> (63-72 %) над особями генотипа CSN3<sup>AB</sup> (28-35%), а наиболее редкий генотип CSN3<sup>BB</sup> был идентифицирован только у двух животных. Частоты встречаемости аллелей CSN3<sup>A</sup> и CSN3<sup>B</sup> в различных популяциях не имели существенных различий и находились примерно на одинаковом уровне (0,861, 0,838, 0,807 и 0,139, 0,162, 0,192 соответственно). В среднем по всем популяциям 99 % быков-производителей являлись носителями аллеля CSN3<sup>A</sup>.

В литературе [12] имеются данные о том, что увеличение интенсивности селекционной работы сопровождается уменьшением частоты встречаемости аллеля CSN3<sup>B</sup>. Вероятно, это связано с отбором только по показателям продуктивности и жирномолочности. Однако точная причина этого остаётся неясной, поскольку до сих пор не установлено наличие четких корреляций между аллельными вариантами локуса каппа-казеина и такими показателями молочной продуктивности, как общий удой и процент жира.

Проверка генного равновесия методом  $\chi^2$  (хи-квадрат) показала, что во всех исследованных популяциях отсутствует достоверная разница между фактическими и ожидаемыми частотами генотипов ( $\chi^2 = 0,46$ ;

1,79; 0,92 соответственно), что свидетельствует о возможности совершенствования молочного скота в направлении повышения белково-молочности при использовании гена каппа-казеина в качестве генетического маркера.

Генетическая структура популяций быков-производителей белорусской чёрно-пёстрой породы по локусу гена BLAD представлена в табл. 2.

Таблица 2.

Генетическая структура популяций быков-производителей белорусской чёрно-пёстрой породы по локусу гена BLAD

Принадлежность	n	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллелей	
		TL/TL	TL/BL	BL/BL	TL	BL
PCYП «Минскплемпредприятие»	18	100	-	-	1,000	-
PCYП «Брестплемпредприятие»	111	98	2	-	0,991	0,009
PCYП «Гродноплемпредприятие»	57	95	5	-	0,974	0,026
Итого	186	97	3	-	0,987	0,013

Генетический полиморфизм гена BLAD представлен двумя аллелями: TL и BL. Идентифицированы генотипы TL/TL (животные, свободные от мутации) и TL/BL (гетерозиготные носители мутации).

Частота встречаемости различных генотипов у исследованных популяций составила: 97 % (181 животное) – гомозиготные по гену BLAD (свободными от мутации), а 3 % (5 особей) – носители мутации, имеющие генотип TL/BL с частотой аллеля BL=0,013. Частота носительства гена BLAD по племпредприятиям составила соответственно 0; 2 и 5 %. В PCYП «Минскплемпредприятие» особи, гетерозиготные по гену BLAD, отсутствовали, что, возможно, связано с малой численностью выборки. Процесс наследования данного гена подчиняется закону Менделя, однако отсутствие в наших исследованиях гомозиготных, рецессивных по данному гену животных, вероятно, объясняется тем, что ДНК-тестированию были подвергнуты только взрослые животные, а рецессивные гомозиготы, как известно, погибают на ранних стадиях онтогенеза.

Таким образом, своевременное выявление носителей данной мутации позволит избежать скрещивания двух гетерозиготных особей или, наоборот, использовать при разведении под контролем в случае их высокой препотентности. Чтобы не допустить дальнейшего бесконтрольного распространения мутации, необходимо тестирование популяций быкопроизводящих коров и ремонтного молодняка.

**Выводы.** Результаты проведённых исследований показали, что

применение ДНК-тестирования делает возможным проведение отбора животных по определенным типам генов, связанных как с продуктивными качествами, так и с наследственными заболеваниями, не только объективно оценивать генетическую структуру племенных стад республики, но и проводить селекционно-племенную работу в популяциях крупного рогатого скота. Особенно важно выявление в популяциях скрытых генетических дефектов (мутаций), снижающих племенные качества животных, что позволит решить проблему повышения резистентности племенного поголовья.

#### Литература.

1. Schaar, J. Effects of genetic variants of kappa-casein and beta-lactoglobulin on cheese-making / J. Schaar, B. Hansson, H. Pettersson // *J. Dairy Sc.* – 1985. – Vol. 52. – P. 429-437
2. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных / Л. А. Калашникова [и др.]. – Лесные Поляны, 1999. – 148 с.
3. Маркарян, А. Ю. Использование метода ПЦР в технологии генотипирования казеинов крупного рогатого скота / А. Ю. Маркарян, Г. О. Шайхаев, Г. Е. Сулимова // *Бюл. науч. тр. Т. 124 / ВНИИРГЖ.* – СПб., 1991. – С. 17-23.
4. Баршинова, А. В. Полиморфизм гена каппа-казеина у молодняка красно-пестрой породы в Центрально-черноземной зоне РФ / А. В. Баршинова, Л. А. Калашникова // *Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных : материалы III междунар. конф.* – Дубровицы, 2003. – С. 83-84.
5. Димань, Т. М. Полиморфна система к-казеину, П зв'язок із продуктивними якістьми великої рогатої худоби / Т. М. Димань // *Вісник аграрної науки.* – 1998. – С. 33-35.
6. Tammen, I. Weiterentwicklung des DNA-Tests auf BLAD für den Einsatz in Rinderzucht und klinischer Diagnostik / I. Tammen. – Hannover, 1994.
7. Kaminski, S. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers using a new PCR test / S. Kaminski, U. Czarnik // *J. Appl. Genet.* – 1997. – P. 51-55.
8. Винчук, Д. Т. Ген «BLAD» в наследственности голштинского скота / Д. Т. Винчук, А. А. Созинов // *Вісн. аграрної науки.* – 1994. – № 6. – С. 44-46.
9. Natonek, M. Identyfikacja mutacji blad u budla metoda PCR-RFLP / M. Natonek // *Biul. inform./ Ins. zootechchn.* – Krakow, 2000. – № 4 (227). – P. 29-33.
10. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М. : Мир, 1984. – 480 с.
11. Меркурьева, Е. К. Биометрия в селекции и генетике / Е. К. Меркурьева. – М. : Колос, 1970. – 423 с.
12. Zadworny, D. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction / D. Zadworny, U. Kuhnlein // *Theor. And Appl. Genet.* – 1990. – Vol. 80. – P. 631-634.