

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. 5th 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^B 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 |
| РСУП «Минскплемпредприятие» | 18 | 72 | 28 | - | 0,861 | 0,139 |
| РСУП «Брестплемпредприятие» | 111 | 68 | 31 | 1 | 0,838 | 0,162 |
| РСУП «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^A и CSN3^B. Идентифицированы генотипы CSN3^{AA}, CSN3^{AB} и CSN3^{BB}. Во всех исследованных популяциях выявлено преобладание животных генотипа CSN3^{AA} (63-72 %) над особями генотипа CSN3^{AB} (28-35%), а наиболее редкий генотип CSN3^{BB} был идентифицирован только у двух животных. Частоты встречаемости аллелей CSN3^A и CSN3^B 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^A.

В литературе [12] имеются данные о том, что увеличение интенсивности селекционной работы сопровождается уменьшением частоты встречаемости аллеля CSN3^B. 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 χ^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 якістьями 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 Diagnostic / I. Tammen. – Hannover, 1994.
7. Kaminski, S. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carries 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. Identifikacja 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.