

ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА У ЖИВОТНЫХ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ

Шайдуллин Радик Рафаилович, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, и.о. заведующего кафедрой «Биотехнология, животноводство и химия»

Ганиев Алмаз Саляхутдинович, соискатель кафедры «Биотехнология, животноводство и химия»

ФГБОУ ВПО «Казанский государственный аграрный университет»

420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 65, тел. (843) 236-65-22

e-mail: tppi-kgau@bk.ru

Ключевые слова: ген, каппа-казеин, полиморфизм, генотип, аллель, животные.

В стаде животных выявлена наибольшая доля частоты встречаемости по гену каппа-казеина у генотипа AA (55,3-66,4 %). У телок и коров не выявлено достоверной разницы между наблюдаемыми и ожидаемыми генотипами AA, AB, BB (χ^2 = от 0,02 до 0,49), что указывает на отсутствие сдвига генетического равновесия.

Введение

В настоящее время достижения молекулярной генетики сделали возможным идентифицировать гены, связанные с качественными и количественными признаками крупного рогатого скота. Обнаружение предпочтительных аллельных вариантов таких генов позволяет дополнительно к традиционным методам отбора и подбора животных проводить селекцию с использованием маркеров на уровне ДНК. Наиболее информативными в этом отношении являются ДНК-маркерные системы, а именно тест-системы, основанные на анализе полиморфизма структурных генов, принимающих участие в формировании и функционировании хозяйственно полезных признаков [1, 2, 3, 4, 5, 6].

К одним из наиболее распространённых потенциальных ДНК-маркеров

признаков продуктивности молочного скота относится ген каппа-казеина (CSN3). Он связан с белково-молочностью и технологическими свойствами молока коров.

Таким образом, целью данной работы явилось проведение исследований по изучению полиморфизма и определению частоты встречаемости аллельных вариантов по гену каппа-казеина у разных возрастных групп крупного рогатого скота.

Объекты и методы исследований

Исследования проводились на стаде крупного рогатого скота черно-пестрой породы в ООО «Дусым» Атинского района Республики Татарстан и для оценки по локусу гена каппа-казеина были отобраны 122 телки, 142 коровы-первотелки, 208 высокопродуктивных коров, от которых были взяты пробы крови.

Материалом для исследования служила кровь. От каждой пробы крови животных была выделена ДНК с помощью набора для выделения ДНК. Затем с каждой пробой ДНК была выполнена полимеразная цепная реакция, которую осуществляли на детектирующем амплификаторе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия) [7].

С полученными ампликонами (продукты ПЦР) проведен рестрикционный анализ с использованием различных эндонуклеаз рестрикции (EaeI, HinfI, HaeIII, Tail).

Детекцию результатов осуществляли с помощью горизонтального электрофореза в 2-% агарозном геле.

Частоту встречаемости генотипов определяли по формуле:

$$P = \frac{n}{N}, \text{ где}$$

P – частота определения генотипа,

n – количество особей, имеющих определенный генотип,

Таблица 1

Полиморфизм гена каппа-казеина у телок

n	Распределение	Частота генотипа						Частота аллеля		χ^2
		AA		AB		BB		A	B	
		n	%	n	%	n	%			
122	H	81	66,4	37	30,3	4	3,3	0,82	0,18	0,04
	O	82	67,2	36	29,5	4	3,3			

H – наблюдаемое распределение генотипов,
O – ожидаемое распределение генотипов

Таблица 2

Полиморфизм гена каппа-казеина у коров-первотелок

n	Распределение	Частота генотипа						Частота аллеля		χ^2
		AA		AB		BB		A	B	
		n	%	n	%	n	%			
142	H	89	62,7	46	32,4	7	4,9	0,79	0,21	0,02
	O	89	62,7	47	33,1	6	4,2			

H – наблюдаемое распределение генотипов,
O – ожидаемое распределение генотипов

N – число особей.

Частоту отдельных аллелей определяли по формуле Е.К. Меркурьевой (1977) [8]:

$$P_A = (2n_{AA} + n_{AK}) : 2N$$

$$q_B = (2n_{KB} + n_{KB}) : 2N, \text{ где}$$

P_A – частота аллеля А,

q_B – частота аллеля К,

N – общее число аллелей.

По закону Харди-Вайнберга [9] рассчитывали ожидаемые результаты частот генотипов в исследуемой популяции.

Результаты исследований

В результате проведенных исследований черно-пестрого скота в ООО «Дусым» Атинского района РТ по локусу гена каппа-казеина нами получены следующие результаты: так, из 122 телок 81 (66,4 %) имели генотип AA, 37 (30,3 %) – генотип AB и 4 (3,3 %) – генотип BB (табл. 1, рис. 1). При этом частота аллеля А составила 0,82, а аллеля В – 0,18.

Выявленные частоты генотипов статистически не достоверны, не отличаются от теоретически ожидаемых, поэтому прослеживается большой недостаток гетерозигот и гомозигот по аллелю В.

В группе коров-первотелок выявлено 89 голов с гомозиготным генотипом AA каппа-казеина,

46 голов с гетерозиготным генотипом AB и лишь 7 голов с гомозиготным генотипом BB (табл. 2, рис. 2). Частота генотипов достигла AA – 62,7 %, AB – 32,4 %, BB – 4,9 %. При этом частота аллеля А была 0,79, а желательного аллеля В – 0,21.

Статистический метод Харди-Вайнберга и метод χ^2 для выявления отклонений эмпирического распределения частот генотипов каппа-казеина от теоретического показал, что в группе коров-первотелок не имеется статистически достоверного сдвига генетического равновесия ни по одному из трех генотипов по локусу гена каппа-казеина.

Результаты исследований генотипов

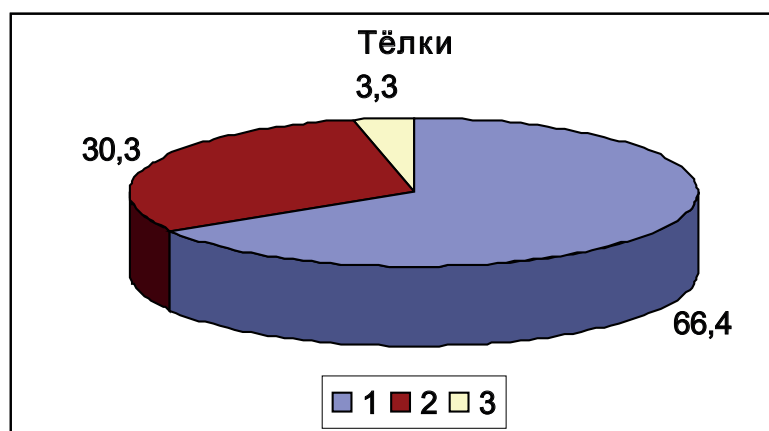


Рис. 1 – Частота встречаемости генотипов гена каппа-казеина у телок

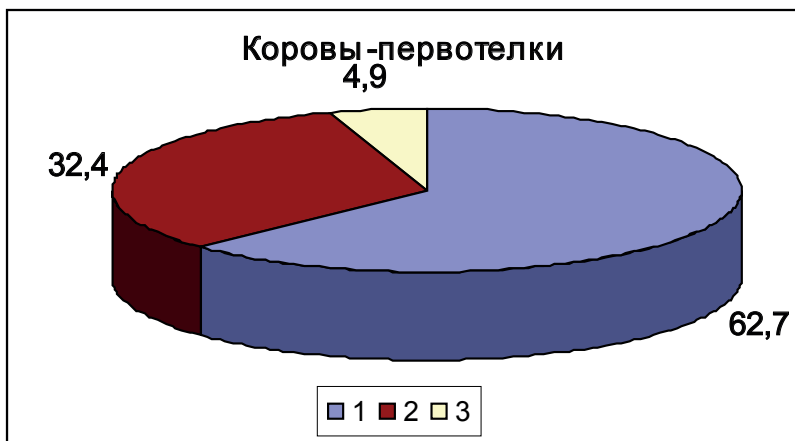


Рис. 2 – Частота встречаемости генотипов каппа-казеина у коров-первотелок



Рис. 3 – Частота встречаемости генотипов каппа-казеина у высокопродуктивных коров

высокопродуктивных коров по локусу гена каппа-казеина представлены в таблице 3 и графически представлены на рисунке 3. Так, генотип AA обнаружен у 115 (55,3 %) животных, генотип АВ у 84 (40,4 %) голов, а наиболее желательный генотип ВВ у 9 (4,3 %) коров. При этом частота аллеля А составила 0,75, а аллеля В – 0,25.

Нами не выявлено достоверной разницы

между частотами наблюдаемых и ожидаемых генотипов ($\chi^2 = 0,49$), что указывает на генное равновесие в стаде высокопродуктивных коров по локусу гена каппа-казеина.

Частота гомозиготного генотипа АА каппа-казеина была выше у телок на 3,7 %, чем у коров-первотелок и на 11,1 %, чем у высокопродуктивных коров. Частота желательного генотипа ВВ каппа-казеина у первотелок была выше на 0,6 %, чем у высокопродуктивных животных и на 1,6 %, чем у молодняка.

В ООО «Дусым» во всех изученных группах животных преобладает аллель А гена каппа-казеина с частотой от 0,75 до 0,82. Аналогичные данные по черно-пестрой породе крупного рогатого скота были получены рядом авторов [6, 10, 11, 12, 13, 14].

Нами также было изучено влияние генотипов по гену каппа-казеина на основные показатели молочной продуктивности коров. На основании результатов анализа ДНК животные были подразделены на три группы с генотипами АА, АВ и ВВ.

Удой за 305 дней лактации был выше у первотелок с генотипом по гену каппа-казеина ВВ по сравнению с группами АА на 298 кг и АВ генотипом на 88 кг, количество молочного жира соответственно на 12 и 3 кг (табл. 4). По содержанию белка в молоке желательный гомозиготный генотип высокодостоверно ($P < 0,001$) превосходил АА

Таблица 3

Полиморфизм гена каппа-казеина у высокопродуктивных коров

n	Распределение	Частота генотипа						Частота аллеля		χ^2
		AA		AB		BB		A	B	
		n	%	n	%	n	%			
208	H	115	55,3	84	40,4	9	4,3	0,75	0,25	0,49
	O	117	56,3	78	37,5	13	6,2			

H – наблюдаемое распределение генотипов,

O – ожидаемое распределение генотипов

Таблица 4.

Молочная продуктивность коров-первотелок с различными генотипами по каппа-казеину

Генотип	n	Удой, кг	Жир		Белок	
			%	кг	%	кг
AA	89	4435 ± 46	3,64 ± 0,01	161 ± 1,6	3,12 ± 0,01	138 ± 1,4
AB	46	4645 ± 121	3,67 ± 0,01	170 ± 4,4	3,15 ± 0,01	146 ± 3,8
BB	7	4733 ± 195	3,66 ± 0,04	173 ± 6,5	3,26 ± 0,02	154 ± 6,2
AA к ± AB		-210	-0,03*	-9	-0,03*	-8*
AA к ± BB		-298	-0,02	-12	-0,14***	-16*
AB к ± BB		-88	0,01	-3	-0,11***	-8

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

Таблица 5

Молочная продуктивность высокопродуктивных коров с различными генотипами по гену каппа-казеина

Генотип	n	Удой, кг	Жир		Белок	
			%	кг	%	кг
AA	115	6102 ± 66	3,62 ± 0,01	221 ± 2,4	3,10 ± 0,01	189 ± 2,1
AB	84	6010 ± 56	3,71 ± 0,02	223 ± 2,1	3,14 ± 0,01	189 ± 1,9
BB	9	6240 ± 167	3,61 ± 0,03	225 ± 7,5	3,22 ± 0,03	201 ± 6,1
AA к ± AB		92	-0,09***	-2	-0,04**	0
AA к ± BB		-138	0,01	-4	-0,12***	-12
AB к ± BB		-230	0,10**	-2	-0,08*	-12

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

генотип на 0,14 %, AB на 0,11 %. Аналогичное превышение по выходу молочного белка также имели животные с генотипом BB, и достоверная разница отмечена по сравнению с AA генотипом ($P < 0,05$). У животных с генотипом AB содержание жира в молоке составило 3,67 %, что выше на 0,01 %, чем у коров с генотипом BB, и достоверно выше, чем у первотелок с geno-

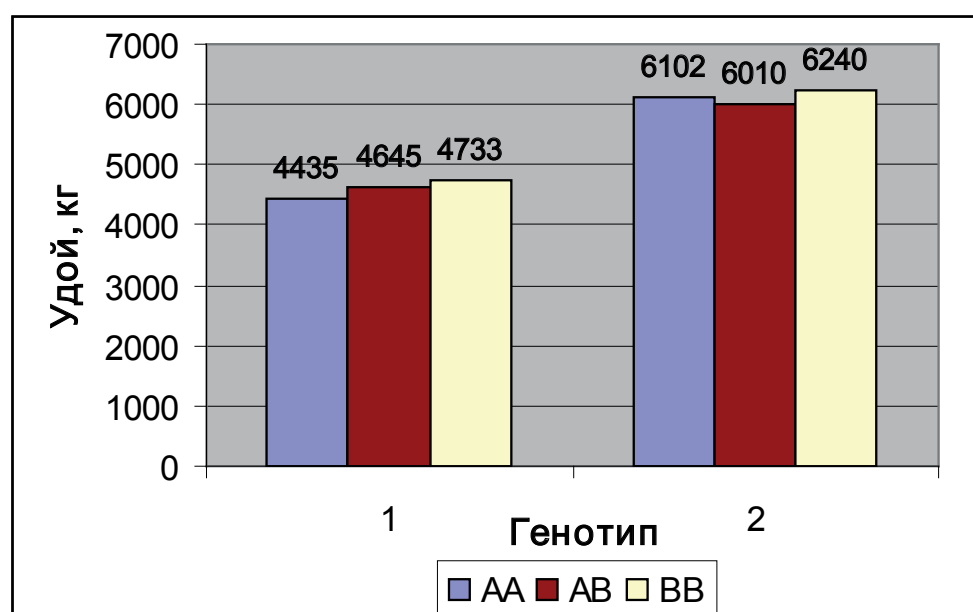


Рис. 4 – Удой коров-первотелок (1) и высокопродуктивных коров (2) в зависимости от генотипа по гену каппа-казеина

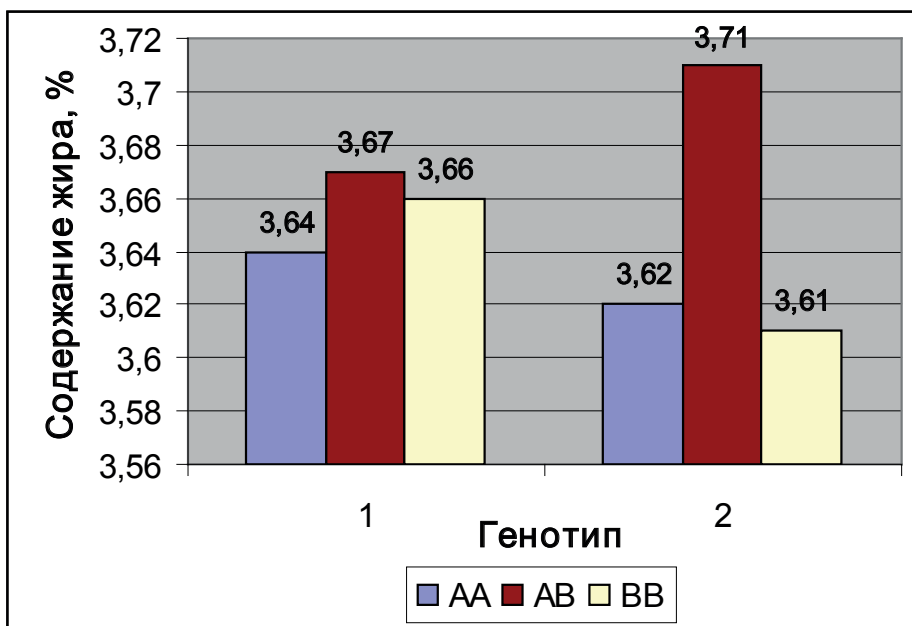


Рис. 5 – Содержание жира в молоке коров-первотелок (1) и высокопродуктивных коров (2) в зависимости от генотипа по гену каппа-казеина

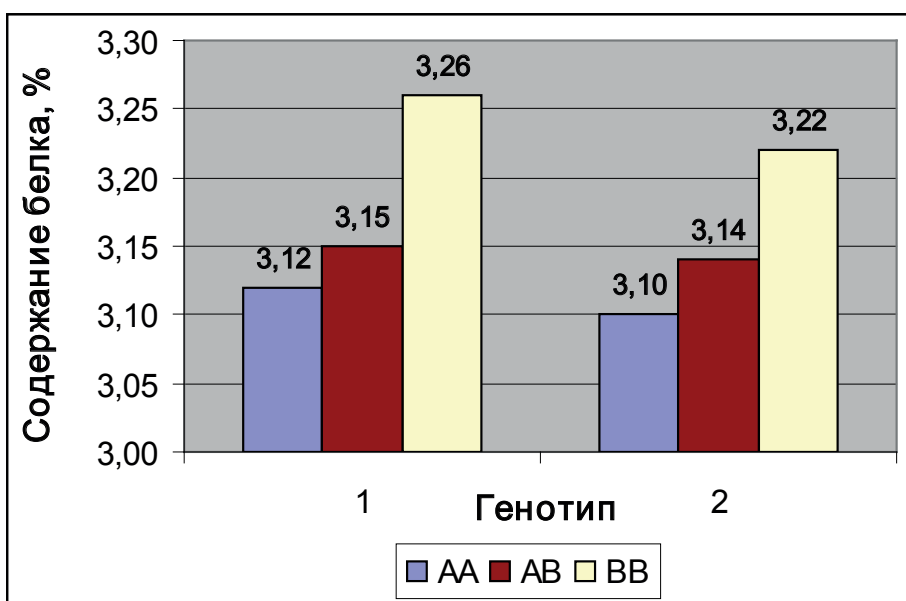


Рис. 6 – Содержание белка в молоке коров-первотелок (1) и высокопродуктивных коров (2) в зависимости от генотипа по гену каппа-казеина

типом AA на 0,03 % ($P < 0,05$).

В таблице 5 представлены результаты анализа молочной продуктивности высокопродуктивных коров, с удоем свыше 5000 кг молока, с учётом генотипа каппа-казеина.

У высокопродуктивных коров, как и у первотелок, наиболее высокие удои достигнуты в группе коров с генотипом BB (6240 кг). От данной опытной группы было полу-

чено больше молочного жира (225 кг), чем от коров с генотипами AA и AB, на 4 кг и 2 кг, и больше молочного белка (201 кг), соответственно на 12 кг.

Содержание белка в молоке коров с генотипом BB достоверно превосходило показатели белкомолочности коров с генотипами AA на 0,12 % ($P < 0,05$), AB на 0,08 % ($P < 0,05$).

По содержанию жира в молоке коров достоверно выявлено преимущество животных гетерозиготного генотипа AB над гомозиготными генотипом AA (0,09 %, $P < 0,001$) и BB (0,10 %, $P < 0,01$).

На рис. 4, 5, 6 показаны графики изменения молочной продуктивности коров в зависимости от генотипа по гену каппа-казеина.

Выводы

Таким образом, использование статистического метода Харди-Вайнберга и метода χ^2 позволило установить, что в данной популяции крупного рогатого скота черно-пестрой породы нет сдвига генетического равновесия ни по одному из трех генотипов

локуса гена каппа-казеина. Коровы с генотипом каппа-казеина BB при наиболее высоком уровне удоя обладают лучшими показателями выхода молочного жира и белка.

Библиографический список

1. Введение в ДНК-технологии / В.И. Глазко, И.М. Дунин, Г.В. Глазко, Л.А. Калаш-

никова. – М.: ФГНУ «Рсинформагротех», 2001. – 436 с.

2. Применение ДНК-диагностики для анализа генов-кандидатов локусов количественных признаков сельскохозяйственных животных / Н.А. Зиновьева, Е.А. Гладырь [и др.] // Научные труды ВИЖ. – Дубровицы, 2001. – Выпуск 61. – С. 218-224.

3. Зиновьева, Н.А. ДНК-диагностика полиморфизма генов – белков молока крупного рогатого скота / Н.А. Зиновьева, Е.А. Гладырь, О.В. Костюнина // Методы исследований в биотехнологии сельскохозяйственных животных. – М., 2004. – С. 7-22.

4. Калашникова, Л.А. Возможности использования ДНК маркеров продуктивных качеств животных в практической селекционной работе / Л. А. Калашникова // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных. – Дубровицы, 2003. – С. 33-39.

5. Коновалова, Е.Н. Полиморфизм гена каппа-казеина его влияние на признаки продуктивности коров симментальской породы / Е.Н. Коновалова, В.И. Сельцов, Н.А. Зиновьева // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных. – Дубровицы: ВИЖ, 2004. – С. 49-54.

6. Сулимова, Г.Е. Анализ полиморфизма ДНК кластерных генов у крупного рогатого скота: гены казеинов и гены главного комплекса гистосовместимости (BOLA) / Г.Е. Сулимова, С.С. Соколова, О.П. Семикозова // Цитология и генетика. – 1992. – Том 26.5. – С. 18-26.

7. Методические рекомендации по типированию гена каппа-казеина, отвечающего за белкомолочность крупного рога-

того скота / Т.Х. Фаизов, К.В. Усольцев, Н.И. Хамадов, Р.Р. Шайдуллин, [и др.]. – Казань: Казанский ГАУ, 2014. – 16 с.

8. Меркурьева, Е.К. Биометрия в животноводстве / Е.К. Меркурьева. – М.: Колос, 1977. – 311 с.

9. Петухов, В.Л. Ветеринарная генетика с основами вариационной статистики / В.Л. Петухов, А.И. Жигачев, Г.А. Назарова. – М.: Агропромиздаи, 1985. – 368 с.

10. Алипанах, М. Хозяйственно-полезные признаки крупного рогатого скота с различными генотипами каппа-казеина и пролактина: автореф. дис. ... канд. сельскохозяйственных наук / М. Алипанах. – М., 2006. – 19 с.

11. Артемьев, А.М. Молочная продуктивность и технологические свойства молока коров черно-пестрой породы с различными генотипами каппа-казеина и сезонами отела: автореф. дис. ... канд. сельскохозяйственных наук / А.М. Артемьев. – М., 2007. – 21 с.

12. Ахметов, Т.М. Использование методов маркер-вспомогательной селекции в молочном скотоводстве Республике Татарстан: автореф. дис. ... докт. биологических наук / Т.М. Ахметов. – Казань, 2009. – 50 с.

13. Валиуллина, Э.Ф. Генотипирование черно-пестрого скота по локусам каппа-казеина, бета-лактоглобулина и BLAD-мутации методами ДНК-технологии: автореф. дис. ... канд. биологических наук / Э.Ф. Валиуллина. – Казань, 2012. – 22 с.

14. Зарипов, О.Г. Генотипирование крупного рогатого скота по генам бета-лактоглобулина и каппа-казеина методами ДНК-технологии: автореф. дис. ... канд. биологических наук / О.Г. Зарипов. – Казань, 2010. – 24 с.