УДК 575.42.636:082:11

ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ОЦІНКИ ГЕНЕТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ ПОРОДИ ВРХ

Н. Б. Новак, Р. В. Облап, М. Д. Мельничук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Науково-інноваційні технології знаходять все ширше застосування у різних галузях народного господарства, зокрема, у такій сфері агропромислового виробництва, як тваринництво. Досліджено генетичну структуру української чорно-рябої породи великої рогатої худоби за низкою генів кількісних ознак, пов'язаних з молочною продуктивністю. Виявлено високий вміст селекційно цінних алельних варіантів за локусами β-лактоглобуліну, гормону росту та DGAT1. Отримані дані мають загальнобіологічне та прикладне значення.

Ключові слова: ВЕЛИКА РОГАТА ХУДОБА, ГЕНИ КІЛЬКИСНИХ ОЗНАК, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНИТИЧНІ МАРКЕРИ, ПЛР-ПДРФ.

Основним завданням молочного тваринництва є одержання високопродуктивних тварин, які дають молоко з кращими технологічними властивостями та більшим вмістом білку. Можливість цілеспрямованого створення високопродуктивного поголів'я тварин значною мірою залежить від наявності інформації про гени, що контролюють ознаки продуктивності. У зв`язку з цим, стає актуальною задача з виявлення та використання маркерних генів, які є відповідальними за прояв господарсько-цінних ознак [1,2].

В даний час методи молекулярно-генетичних досліджень отримали широке розповсюдження у всіх прикладних сферах біологічних наук. Ряд дисциплін аграрного сектору, такі як селекція, мікробіологія, ветеринарна експертиза та ін. вже не можуть обходитись без „молекулярного" підтвердження своїх розробок. Сьогодні можна виділити кілька напрямків агропромислового комплексу, які безпосередньо пов`язані з використанням методів ДНК-технологій: контроль якості сільськогосподарської сировини та продуктів харчування; створення генетичних паспортів порід, видів та таксономічних груп; діагностика генетичних та інфекційних захворювань тварин; MAS-селекція сільськогосподарських тварин для вирішення селекційних задач [2].

Генотипування тварин за маркерними алелями, пов`язаними з бажаними господарсько-цінними ознаками дозволить проводити селекцію тварин на рівні ДНК, що значно підвищить ефективність ведення селекційної роботи. Перевагою ДНК-діагностики перед оцінюванням ознак за їх фенотиповим проявом є те, що вона базується безпосередньо на аналізі спадкової інформації, яка лежить в основі тієї чи іншої ознаки. [1-3].

Метою даної роботи було вивчення генетичної структури української чорно-рябої породи великої рогатої худоби за генами кількісних ознак пов'язаних з молочною продуктивністю.

Матеріали і методи

Для вивчення генетичної структури української чорно-рябої породи було використано чистопорідне поголів'я, яке відтворюється в умовах агростанції „Митниця" Васильківського району, Київської області. Всього було досліджено 223 тварини.

Кров для аналізу відбирали із яремної вени тварин у стерильні пробірки з ЕДТА. ДНК з крові виділяли за стандартною методикою, описаною R. Boom зі співавторами [4]. Аналіз генетичної структури проводили за сімома молекулярно-генетичними маркерами пов'язаними з молочною продуктивністю великої рогатої худоби: к-казеїном, β-лактоглобуліном, пролактином, гормоном росту, лептином, DGAT1 (ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансфераза 1) та PIT-1 (фактор транскрипції, пов'язаний з гіпофізом). Для визначення поліморфізму маркерних генів використовували метод ПЛР-ПДРФ внаслідок його високої чутливості, точності та відомій простоті виконання [1,5].

Математичну обробку даних здійснювали за допомогою стандартної комп'ютерної програми "POPGENE".

Результати й обговорення.

Всього було досліджено сім локусів. Локуси було обрано таким чином, щоб мати можливість охопити якнайбільший спектр впливу на молочну продуктивність. Два гени - к-казеїн і β-лактоглобулин - відповідальні за синтез білків молока. DGAT1 бере участь у регуляції синтезу тригліцеридів, а ген лептину - жирів. Пролактин відіграє ключову роль в процесах лактогенезу, в той час як ген гормону росту виконує функцію регулятора соматичного росту організму. Крім цього, він має лактогенну та інсуліноподібну дію. Фактор транскрипції Pit-1, пов'язаний з гіпофізом, відповідає за регуляцію експресії генів гормону росту та пролактину.

За всіма дослідженими молекулярно-генетичними системами виявлено поліморфізм. Виявлені закономірності розподілу генотипів та алельних частот за дослідженими поліморфними системами наведено в таблиці .

Казеїни є однією з найкращих моделей в біохімічних та генетичних дослідженнях детермінації ознак молочної продуктивності сільськогосподарських тварин. На сьогоднішній день для гену k-казеїну описано сім алельних варіантів, з яких найбільш розповсюджені дві алелі - A і B. Вони є результатом двох точкових мутацій, в положеннях 136 і 148, які призводять до амінокислотних замін Tyr→Iso і Ala→Asp, відповідно. Молоко тварин з генотипом BB характеризується значно вищим вмістом білку, ніж у тварин інших генотипів. Крім того, молоко таких тварин є значно кращою сировиною для виробництва сирів [5,6]. У дослідженої групи тварин локус k-казеїну був представлений переважно двома генотипами AA і AB. Лише одна тварина мала генотип BB. В зв'язку з цим, найбільш поширеним за даним локусом виявилась алель A, вона зустрічалась з частотою 0,897.

β-лактоглобулін є головним сироватковим білком молока. У більшості порід великої рогатої худоби β-лактоглобулін детерміновано двома алельними варіантами A і B, а поліморфізм пов`язаний зі структурною частиною гену. Аналізовані алельні варіанти є результатом двох точкових мутацій, в положеннях 64 і 118, які призводять до амінокислотних замін Asp→Glu і Val→Ala, відповідно. Вони суттєво впливають на вихід молока і процент жиру в ньому. Варіант B пов`язують з високим вмістом в молоці казеїнових білків, більшим процентом жиру і кращими параметрами казеїнового коагуляту. Варіант A контролює високий вміст сироваткових білків і сумарний вміст білків молока [5,7]. За локусом β-лактоглобуліну було виявлено три генотипи – AA, AB та BB. Більш цінний алель B був представлений з частотою 0,630.

Пролактин - поліпептидний гормон, секреція якого відбувається у передній частині гіпофізу. Він відіграє ключову роль в розвитку молочної залози, процесах лактогенезу та експресії генів молока. Аналізовані поліморфні форми A і G пов'язані з ознаками молочної продуктивності корів. Вони є результатом точкової мутації G→A, в 8398 положенні 4-го екзону гену пролактину BPX [8]. Тварини з генотипом AA характеризуються більшим виходом молока, а тварини з генотипом GG - більшим вмістом жиру. При аналізі алельних варіантів гену пролактину, нами було виявлено лише два генотипи – GA та GG. Переважала алель G, яка мала частоту 0,892.

Ген гормону росту є потенційним маркером продуктивності сільськогосподарських тварин. Він відіграє ключову роль в стимулюванні синтезу білків, розподілі клітин і росту організму. Крім того, він проявляє лактогенну активність. Аналізовані алельні варіанти L та

V є результатом точкової мутації C→G в кодоні CTG, яка призводить до амінокислотної заміни Leu→Val в 127-му положенні поліпептидного ланцюга [5,9]. Показано, що молоко корів з генотипом LL містить більший відсоток жиру та білку, ніж у тварин, що мають генотип VV. За даним локусом було виявлено генотипи LL, LV та VV. Частіше траплявся алельний варіант L (0,812).

Синтезований в адіпоцитах лептин є гормоном, який відповідає за регуляцію маси тіла тварини, жирові відкладення та споживання корму. Крім того, на рівень жирових відкладень впливає і ген рецептору лептину. Тому обидва ці гени і їх продукти стали предметом численних досліджень, спрямованих на пошук маркерів господарсько-цінних ознак у сільськогосподарських тварин. Для ВРХ описані три алелі гену лептину – A, B та C [5,10]. В наших дослідженнях за цим локусом було виявлено чотири генотипи – AA, AB, BB та AC. Найбільш поширена алель A (0,747), алелі B та C зустрічались приблизно з однаковою частотою.

DGAT1 є основним ферментом, відповідальним за регуляцію рівня синтезу тригліцеридів в адіпоцитах. Нуклеотидна заміна GC→AA в позиціях 10433/10434 призводить до амінокислотної заміни Ala→Lys в 232 положенні білка DGAT1. Мутація K232A пов'язана з вмістом жиру і білків в молоці: алельний варіант K - з більшим вмістом жиру в молоці, а алель A - з виходом молока та сумарним вмістом білків [11]. Цей локус був представлений генотипами AA, AK та KK. Більш поширений алель A (0,668).

Синтезований в гіпофізі фактор транскрипції Pit-1 відіграє істотну роль в процесах розвитку організму як активатор генів гормону росту та пролактину. Для ВРХ показано зв'язок поліморфізму Pit-1 з надоями молока та мінливістю його характеристик. Так, алельний варіант A пов'язаний з більшим виходом молока і білка в ньому, але при цьому меншим відсотком жиру [5,12]. За цією системою виявлено три генотипи (AA, AB і BB), з перевагою алелі B – 0,834.

Таблиця 1

Генотипи та алельні частоти української чорно-рябої породи ВРХ за сімома генами кількісних ознак, пов'язаних с молочною продуктивністю

Українська чорно-ряба порода	Гени						
	к-казеїн	β-лакто глобулін	пролактин	гормон росту	лептин	DGAT1	PIT1
Генотипи	AA-178 AB-44 BB-01 всього-223	AA-28 AB-109 BB-86 всього-223	AA-00 AG-48 GG-175 всього-223	LL-146 LV-70 VV-07 всього-223	AA-114 AB-54 BB-04 AC-51 всього-223	AA-95 AK-108 KK-20 всього-223	AA-07 AB-60 BB-156 всього-223
Алельні частоти	A-0.897 B-0.103	A-0.370 B-0.630	A-0.108 G-0.892	L-0.812 V-0.188	A-0.747 B-0.139 C-0.114	A-0.668 K-0.332	A-0.166 B-0.834

Висновки

Виконаний аналіз за сімома локусами, що мають безпосередній зв'язок з ознаками продуктивності, показав, що розглянута група української чорно-рябої породи характеризується високим вмістом селекційно цінних алельних варіантів. Це характерно для таких генів як β-лактоглобулін, гормон росту та DGAT1. Крім того, за локусом лептину було виявлено рідкісну алель C, яка представлена з досить високою частотою (0,114).

Перспективи подальших досліджень.

Отримані дані мають як загально-біологічне, так і прикладне значення. Вони можуть бути використані для покращення ефективності селекційної роботи шляхом спрямованого формування тварин з бажаними генними поєднаннями.

N. Novak., R. Oblap, M. Melnichuk

USE OF MOLECULAR-GENETIC MARKERS FOR ESTIMATION OF GENETICAL POTENTIAL OF UKRAINIAN BLACK AND WHITE BREED OF CATTLE

S u m m a r y

Science-innovative technologies are widely adopted in different agricultural industries, particularly, in such agricultural production sphere, as animal breeding. The genetic structure of ukrainian black-and-white cattle for quantitative trait genes, linked with milk production, was analyzed. The high content of selective valuable allele variants for β –lactoglobulin, growth hormone and DGAT1 locus was detected. The obtained data has biologic-wide and practical importance.

Н.Б. Новак, Р.В. Облап, М.Д. Мельничук

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА УКРАИНСКОЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ КРС

А н н о т а ц и я

Научно-инновационные технологии находят все более широкое применение в различных отраслях народного хозяйства, в частности, в такой сфере агропромышленного производства, как животноводство. Исследована генетическая структура украинской черно-рябой породы крупного рогатого скота за рядом генов количественных признаков, связанных с молочной продуктивностью. Обнаружено высокое содержание селекционный ценных алельних вариантов по локусам β-лактоглобулина, гормона роста и DGAT1. Полученные данные имеют общебиологическое и прикладное значение.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

1. *Глазко В.И., Шульга Е.В., Дымань Т.Н., Глазко Г.В.* ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих. — Белая Церковь, 2001. — 488 с.

2. *Williams J.L.* The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology // Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. — 2005. — 24(1). — P.379–391.

3. *Dekkers J.C.M.* Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons // J. Anim. Sci. — 2004. — 82. — P.313–328.

4. *Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.H., Wertheimvan Dillen P.M.E., Van der Noordaa J.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clinical Microb., — 1990. — V.28. — №3. — P.495–503.

5. *Облап Р.В., Звежховски Л., Иванченко Е.В., Глазко В.И.* Сравнительный анализ генетической структуры красной польской породы КРС Польши и Украины // Цитология и генетика. — 2002. — Т.36. — №2. — С.35–43.

6. *Kaminski S., Figiel L.* Kappa-casein genotyping of Polish Black-and-White x Holstein-Friesian bulls by polymerase chain reaction // Genetica Polonica. — 1993. — 34. — P.65–72.

7. *Medrano J.F., Aquilar-Cordova E.* Polymerase chain reaction amplification of bovine β-lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis // Animal Biotechnology. — 1990. — №1. — P.73–77.

8. *Brym P., Kaminski S., Wojcik E.* Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits // J. Appl. Genet. — 45(2). — 2005. — P.179–185.

9. *P. Schlee, R. Graml, E.* Schallenberger et all. Growth hormone and insulin-like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes // Theor. Appl. Genet. — 1994. — №88. — P.497–500.

10. *Pomp D, Zou T., Clutter A.C., Barendse W.* Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism // J Anim Sci. — 1997. — 75, №5. — P.1427.

11. *Lacorte G.A. Machado M.A., Martinez M.L. et all.* DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds // Genetics and Molecular Research. — 5(3). — 2006. — P.475–482.

12. *D.E. Moody, D. Pomp, W. Barendse*. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine PIT1 gene and assignment of PIT1 to bovine chromosome 1 // Animal Genetics. — 1995. — 26. — P.45–47.