

ЖЫВЁЛАГАДОЎЛЯ І ВЕТЭРЫНАРНАЯ МЕДЫЦЫНА

УДК 636.4.082:612.8:577.113.1

Т. И. ЕПИШКО, О. П. КУРАК

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ

Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству

(Поступила в редакцию 22.02.2007)

Введение. Направление селекции в животноводстве в первую очередь зависит от потребности населения в продуктах питания, а перерабатывающей промышленности – в сырье. Одним из наиболее важных экономических показателей в молочном скотоводстве является содержание белка в молоке и его структура. Однако в последнее время в странах ЕС наблюдается не только снижение общего уровня молочного белка, но и содержания в нем каппа-казеина. Широкое использование голштинской и черно-пестрых пород скота с прилитием крови голштинов многие специалисты связывают с недостаточной пригодностью получаемого от таких животных молока для производства высококачественных сыров. Так, по данным экспертов США, выход сыра «чеддер» из 100 кг молока от голштинских коров составил 9,99%, тогда как по бурой швицкой породе этот показатель равен 11,07%, а джерсейской – 12,35%, у черно-пестрых пород в результате голштинизации этот показатель снизился с 12 до 2% [1].

В Беларуси до настоящего времени экономическая стимуляция оценки и селекции животных по признаку белковомолочности отсутствовала, в связи с чем совершенствование молочного скота по наличию белка в молоке осуществлялось недостаточно интенсивно. В то же время, как показывает анализ процессов, происходящих в мировом скотоводстве, этому признаку придается огромное значение как с хозяйственной, так и с экономической точки зрения. Так, в ведущих генетических центрах мира проводятся исследования по идентификации и реальному использованию гена каппа-казеина (CSN3) в селекционном процессе для повышения признаков белковомолочности и технологических свойств молока.

Исследования по поиску генетических маркеров, связанных с белковомолочностью, проводимые российскими и зарубежными учеными, свидетельствуют о взаимосвязи содержания белка в молоке с аллельным состоянием гена каппа-казеина. Так, по сообщению A. S. Marziali, Ng-Kwai-Hang [2], аллель CSN3^B ассоциирован с более высоким содержанием белка в молоке, также установлено, что молоко, полученное от животных с генотипом CSN3^{BB}, имеет преимущество по технологическим параметрам для производства белковомолочных продуктов [3].

Многими исследователями показано, что белок каппа-казеина, контролируемый аллелем CSN3^B, имеет ряд отличительных особенностей по сравнению с аллелем CSN3^A: различие в размере мицелл, более высокое содержание протеина, большую стабильность при нагревании и замораживании, лучшие свойства для сыроделия (более короткое время коагуляции, коагулят более плотной консистенции и более высокий выход сыра – на 5–10%). Животные с гомозиготным генотипом CSN3^{BB} имеют превосходство по содержанию белка на 0,2–0,4% [4–6].

В ряде стран обязательной является запись результата ДНК-тестирования по данному гену в племенную карточку животного.

В настоящее время в нашей республике в Научно-практическом центре НАН Беларуси по животноводству ведутся исследования по разработке ДНК-маркеров, связанных с молочной

продуктивностью крупного рогатого скота. Внедрение таких маркеров в селекционный процесс обеспечит проведение в республике ускоренной селекции крупного рогатого скота с целью создания стад с высокими технологическими свойствами молока для получения высококачественных сыров и других белково-молочных продуктов.

Цель исследования – изучение генетической структуры быков-производителей, племенных коров и ремонтных бычков различных популяций черно-пестрой породы по локусу гена каппа-казеина и проведение анализа показателей молочной продуктивности коров с различными генотипами по локусу данного гена.

Материалы и методы исследования. Для проведения ДНК-тестирования были взяты биопробы (ткань, сперма, кровь) быков-производителей РСУП «Минскплемпредприятие», РСУП «Брестплемпредприятие», РСУП «Гродноплемпредприятие»; племенных коров РУСП «Племенной завод «Красная звезда» и РСУП «Заречье» Минской области; ремонтных бычков РСУП «Оршаплемпредприятие».

Ядерную ДНК выделяли из ткани уха перхлоратным методом с собственными модификациями. Основные растворы для выделения ДНК, амплификации и рестрикции готовили по Т. Маниатису, Э. Фрич, Дж. Сэмбруку. [7].

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) 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'

ПЦР-программа: «горячий старт» – 5 мин при 95 °С; 35 циклов: денатурация – 1 мин при 94 °С, отжиг – 1 мин при 58 °С, синтез – 1 мин при 72 °С; достройка – 5 мин при 72 °С.

Полученный амплификат расщепляли рестриктазой HindIII при температуре 37 °С в течение 4 ч.

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 использовали компьютерную видеосистему и программу VITran.

Частоту генотипов и аллелей рассчитывали стандартными методами. Генное равновесие в популяции определяли по закону Харди–Вайнберга [8].

Результаты и их обсуждение. Результаты ДНК-тестирования выявили наличие в исследованных популяциях полиморфизма гена каппа-казеина, представленного двумя аллелями: CSN3^A и CSN3^B (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Частота встречаемости аллелей гена каппа-казеина в различных популяциях крупного рогатого скота

Принадлежность	Половозрастная группа	Кол-во гол.	Частота встречаемости аллелей	
			CSN3 ^A	CSN3 ^B
РСУП «Минскплемпредприятие»	Быки-производители	19	0,868	0,132
РСУП «Брестплемпредприятие»	Быки-производители	112	0,839	0,161
РСУП «Гродноплемпредприятие»	Быки-производители	63	0,778	0,222
В среднем по быкам-производителям		194	0,822	0,178
РУСХП «Оршанское племпредприятие»	Ремонтные бычки	232	0,856	0,144
В среднем по быкам-производителям и ремонтным бычкам		426	0,840	0,160
РСУП «Заречье» (ГПП)	Коровы	46	0,826	0,174
РСУП «Заречье» (ферма)	Коровы	81	0,827	0,173
РУСП «Племенной завод Красная звезда»	Коровы	308	0,869	0,131
В среднем по коровам		435	0,857	0,143

В среднем по всем популяциям только 17,8% быков-производителей являлись носителями аллеля CSN3^B, однако в РСУП «Гродноплемпредприятие» этот показатель был выше и составил 22,2 %.

Частота встречаемости данного аллеля у ремонтных бычков была несколько ниже – 0,144, что на 10,1% меньше, чем в среднем по популяциям быков-производителей. В протестированных популяциях коров количество животных – носителей желательного аллеля CSN3^B составило всего 14,3%. В целом соотношение частот аллеля CSN3^B в исследованных популяциях не имело существенных различий и находилось на уровне 0,131–0,222.

В литературе имеются данные о том, что увеличение интенсивности селекционной работы сопровождается уменьшением частоты встречаемости аллеля CSN3^B [9]. Вероятно, это связано с отбором только по показателям удоя и жирномолочности. Однако точная причина этого остается 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.

В ходе исследований были идентифицированы генотипы CSN3^{AA}, CSN3^{AB} и CSN3^{BB}. Генетическая структура исследованных популяций по локусу гена каппа-казеина представлена в табл. 2.

Анализ распределения генотипов в исследованных популяциях быков-производителей позволил установить преобладание животных генотипа CSN3^{AA} (57,1–73,7%) над особями генотипа CSN3^{AB} (26,3–41,3%), а наиболее редкий генотип CSN3^{BB} был идентифицирован только у двух животных. В РСУП «Минскплемпредприятие» особи с генотипом CSN3^{BB} отсутствовали, что, возможно, связано с малой численностью выборки. В среднем по популяциям частота встречаемости этого генотипа составила лишь 1,0%.

Несколько выше частота встречаемости генотипа CSN3^{BB} была у ремонтных бычков, содержащихся на элевере РУСХП «Оршанское племпредприятие», – 3,0%.

Т а б л и ц а 2. Генетическая структура различных популяций крупного рогатого скота по локусу гена каппа-казеина

Принадлежность	Половозрастная группа	Кол-во гол.	Частота встречаемости генотипов, %			χ^2
			CSN3 ^{AA}	CSN3 ^{AB}	CSN3 ^{BB}	
РСУП «Минскплемпредприятие»	Быки-производители	19	73,7	26,3	–	0,44
РСУП «Брестплемпредприятие»	Быки-производители	112	68,8	30,3	0,9	1,76
РСУП «Гродноплемпредприятие»	Быки-производители	63	57,1	41,3	1,6	2,37
В среднем по быкам-производителям		194	65,5	33,5	1,0	4,12*
РУСХП «Оршанское племпредприятие»	Ремонтные бычки	232	74,1	22,8	3,0	1,32
В среднем по быкам-производителям и ремонтным бычкам		426	70,2	27,7	2,1	0,45
РСУП «Заречье» (ГПП)	Коровы	46	65,2	34,8	–	2,04
РСУП «Заречье» (ферма)	Коровы	81	69,1	27,2	3,7	0,20
РУСП «Племенной завод «Красная звезда»	Коровы	308	72,4	25,6	1,9	0,11
В среднем по коровам		435	71,0	26,9	2,1	0,29

* $P < 0,05$.

В популяции коров РСУП «Заречье» (ГПП) генотип CSN3^{BB} отсутствовал, однако 3,7% животных, находящихся на ферме того же хозяйства, имело генотип CSN3^{BB}. В РУСП «Племенной завод «Красная звезда» у 72,4% племенных коров был выявлен гомозиготный генотип CSN3^{AA}, и только 1,9% животных являлось носителями генотипа CSN3^{BB}.

Малое количество или полное отсутствие животных генотипа CSN3^{BB}, ассоциированного с повышенным уровнем белка в молоке, вероятно, связано с отбором только по показателям продуктивности и жирномолочности.

Расчет критерия χ^2 позволил определить степень соответствия фактического и ожидаемого распределения генотипов. Во всех исследованных популяциях наблюдалось генное равновесие по распределению частот генотипов.

В то же время в среднем по популяциям быков-производителей отмечено статистически достоверное ($P < 0,05$) нарушение генного равновесия, проявляющееся в недостатке гомозигот $CSN3^{BB}$, что связано с большей численностью выборки, позволившей выявить влияние селекционных критериев, используемых при отборе животных для племенных целей.

По результатам ДНК-тестирования в РУСП «Племенной завод «Красная звезда» были сформированы три опытные группы коров с генотипами $CSN3^{AA}$, $CSN3^{AB}$, $CSN3^{BB}$. Это позволило оценить животных, находящихся в одинаковых условиях содержания и кормления. Были изучены показатели молочной продуктивности у коров различных лактаций (табл. 3).

Результаты исследований показали, что наиболее высокие показатели по удою имели животные второй и более лактаций с генотипом $CSN3^{BB}$ (9378,0 кг), которые превосходили животных с генотипами $CSN3^{AA}$ и $CSN3^{AB}$ на 127 и 3 кг соответственно. У первотелок наиболее высокие показатели были отмечены в группе с генотипом $CSN3^{AB}$ (8703,50 кг). Генотип $CSN3^{BB}$ представлен только одним животным, что не позволило возможности судить о достоверности различий в показателях в зависимости от генотипа по гену каппа-казеина.

Т а б л и ц а 3. Показатели молочной продуктивности коров с различными генотипами по локусу гена каппа-казеина

Генотип	Кол-во гол.	Показатель продуктивности		
		удой, кг	жир, %	белок, %
<i>Первая лактация</i>				
$CSN3^{AA}$	28	8668,61±126,75	4,03±0,04	3,18±0,03
$CSN3^{AB}$	12	8703,50±182,84	4,04±0,10	3,23±0,08
$CSN3^{BB}$	1	8216,0	3,87	3,28
В среднем	41	8667,78±101,14	4,03±0,04	3,20±0,03
$CSN3^{BB} \pm CSN3^{AA}$		-452	-0,16	+ 0,10
$CSN3^{BB} \pm CSN3^{AB}$		-487	-0,17	+ 0,05
<i>Вторая и более лактации</i>				
$CSN3^{AA}$	195	9251,18±73,05	4,17±0,02	3,23±0,01
$CSN3^{AB}$	67	9375,72±103,03	4,19±0,04	3,22±0,03
$CSN3^{BB}$	5	9378,0±491,99	4,18±0,15	3,33±0,09
В среднем	267	9284,81±59,86	4,18±0,02	3,23±0,01
$CSN3^{BB} \pm CSN3^{AA}$		+ 127	+ 0,01	+ 0,10
$CSN3^{BB} \pm CSN3^{AB}$		+ 3	-0,01	+ 0,10
<i>В среднем по всем лактациям</i>				
$CSN3^{AA}$	223	9178,03±67,02	4,15±0,02	3,22±0,01
$CSN3^{AB}$	79	9273,61±95,29	4,17±0,04	3,22±0,03
$CSN3^{BB}$	6	9184,33±45,96	4,13±0,13	3,32±0,08
В среднем	308	9202,67±54,88	4,16±0,02	3,22±0,01
$CSN3^{BB} \pm CSN3^{AA}$		+ 6	-0,02	+ 0,10
$CSN3^{BB} \pm CSN3^{AB}$		-89	-0,04	+ 0,10

Содержание жира в молоке коров всех групп находилось примерно на одном уровне – в пределах 4,03–4,18% и колебалось в зависимости от лактации. Существенных различий по жиру в зависимости от генотипа по гену каппа-казеина не установлено, однако в среднем по всем группам наблюдалось некоторое снижение данного показателя у животных с генотипом $CSN3^{BB}$.

Установлено, что содержание белка в молоке возрастало с увеличением лактаций (от 3,18 до 3,33%) и в зависимости от генотипа. Выявлена тенденция повышения процента белка в молоке животных, несущих в своем генотипе аллель $CSN3^B$. Установлено превосходство животных генотипа $CSN3^{BB}$ над генотипами $CSN3^{AA}$ и $CSN3^{AB}$ по данному признаку: по первой лактации – на 0,10 и 0,05%, по второй и более – на 0,10% соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что селекция животных ведется традиционными методами, без учета генетических факторов, оказывающих существенное влияние на

качественный состав молочных белков, и о возможности совершенствования молочного скота в направлении повышения белкомолочности при использовании гена каппа-казеина в качестве генетического маркера.

Заключение. Анализ генетической структуры различных популяций крупного рогатого скота по локусу гена каппа-казеина (CSN3) показал, что концентрация аллеля CSN3^B в среднем по всем исследованным популяциям составила 0,173 и колебалась в зависимости от популяции и половозрастной группы животных (от 0,132 до 0,222). В популяциях быков-производителей наблюдалось преобладание животных генотипа CSN3^{AA} (57,1–73,7%) над особями генотипа CSN3^{AB} (26,3–41,3%), а наиболее редкий генотип CSN3^{BB} был идентифицирован только у двух животных. В популяции коров РСУП «Заречье» (ГПП) генотип CSN3^{BB} отсутствовал, однако 3,7% животных, находящихся на ферме того же хозяйства, имело генотип CSN3^{BB}. Анализ молочной продуктивности коров в зависимости от генотипа по гену каппа-казеина позволил установить превосходство животных генотипа CSN3^{BB} над генотипами CSN3^{AA} и CSN3^{AB} по выходу молочного белка на 0,05–0,10%.

Разработка и внедрение метода ДНК-диагностики генотипов молочного белка (каппа-казеина) пород крупного рогатого скота, разводимых в республике, позволит получить более полную информацию о генетической структуре племенных стад республики по гену CSN3, интенсивно проводить маркернонаправленную селекцию, создавать стада с высокими технологическими свойствами молока для получения высококачественных сыров и других белкомолочных продуктов, составить генетический паспорт по гену каппа-казеина племенного поголовья республики и исключить импорт животных, не отвечающих селекционным требованиям.

Литература

1. Саморук в Ю. В., Марзанов Н. С. Сохранение и рациональное использование генофонда молочного скота Российской Федерации. Быково, 2002.
2. Marzali A. S., Ng-Kwai-Hang. Relationship between milk protein polymorphisms and cheese fielding capacity // J. Dairy Sci. 1986. N 69. P. 1193.
3. Калашникова Л. А. Перспективы улучшения технологических свойств молока коров черно-пестрой породы с использованием ДНК-маркеров по гену каппа-казеина / Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных: Материалы междунар. науч. конф. Дубровицы, 2004. С. 12–18.
4. Димань Т. М. Полиморфна система к-казеину, II зв'язок із продуктивними якостями великої рогатої худоби // Вісник аграрної науки. 1998. С. 33–35.
5. Кленовицкий П. М., Багиров В. А., Иванов В. А., Иолчиев Б. С. Современные проблемы зоотехники. Дубровицы, 2005. 116 с.
6. Зиновьева Н. А., Гладырь Е. А., Костюнина О. В. ДНК-диагностика полиморфизма генов – белков молока крупного рогатого скота // Методы исследований в биотехнологии с.-х. животных. М., 2004. С. 7–22.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
8. Меркурьева Е. К. Биометрия в селекции и генетике. М.: Колос, 1970. 423 с.
9. Коновалова Е. Н., Сельцев Е. И., Зиновьева Н. А. Полиморфизм гена каппа-казеина и его влияние на признаки продуктивности коров симментальской породы // Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных: Материалы междунар. конф. Дубровицы, 2004. 104 с.

T. I. YEPISHKO, O. P. KURAK

POLYMORPHISM OF THE KAPPA-CASEIN GENE OF DIFFERENT CATTLE POPULATIONS OF THE BLACK-MOTLEY BREED

Summary

The genetic structure of different cattle populations is analyzed on kappa-casein gene locus (CSN3). It is determined that the average allele CSN3^B concentration in the Belarusian Black-Motley breed is 0.173 and varies depending on the population and age of animals (from 0.132 up to 0.222). The range of the variability of the allele CSN3^A occurrence frequency is from 0.778 to 0.868. Animals with the genotype CSN3^{AA} prevail (57.1–73.7%) over those with the genotype CSN3^{AB} (26.3–41.3%) in bull populations, and the rarest genotype CSN3^{BB} is found only in 2 animals. In the population of cows of the farm “Zarechye” the genotype CSN3^{BB} is not found, but 3.7% of animals at this farm have the genotype CSN3^{BB}. The milk productiveness of cows is analyzed in accordance to the genotype on the kappa-casein gene. It is determined that animals with the genotype CSN3^{BB} prevail over those with the genotypes CSN3^{AA} and CSN3^{AB}.