

УДК 63: 636.082.2

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ В РАЗВЕДЕНИИ ЖИВОТНЫХ

О.В. КУЗНЕЦОВА, М.Ю. ГЛАДКИХ

(Кафедра генетики и разведения животных)

Обсуждаются проблемы использования ДНК- и белковых маркеров в селекции сельскохозяйственных животных. Показано, что определение молекулярных маркеров в популяциях сельскохозяйственных животных без учета селекционных задач и методик организации зоотехнических экспериментов не дает положительных результатов для практики разведения животных.

Все современные биотехнологии, используемые в практике животноводства, могут быть разделены на 2 основные категории. Первая категория охватывает технологии, связанные с воспроизводством животных, такие как искусственное осеменение, трансплантация эмбрионов, контроль пола. Ко 2-й категории могут быть отнесены все молекулярные технологии, связанные с локализацией, идентификацией, со сравнением и иными манипуляциями с генами, причем в настоящее время наибольшее внимание в научных исследованиях уделяется идентификации последовательностей нуклеотидов ДНК, маркерной селекции и горизонтальному переносу генов.

В настоящей работе будут рассмотрены не теоретические проблемы, касающиеся молекулярных технологий, а возможности их применения при решении практических задач разведения животных.

Идентификация последовательностей нуклеотидов ДНК является базовым исследованием для дальнейшего использования полученных результатов в разведении животных. Идентификация и локализация определенных последовательностей уже сейчас широко применяются при контроле происхождения животных, ДНК-диагностике наследственных заболеваний, в

маркерной селекции. В ряде стран для определенных видов и пород животных контроль происхождения рекомендуется или даже обязателен. Развитие этого направления приводит к быстрому росту числа картируемых генов и составлению все более полных хромосомных карт. Для генетической паспортизации пород с.-х. животных используют RAPD-анализ, поскольку он позволяет оценивать полиморфизм генома в целом. Этот подход в сочетании с типированием микросателлитов с успехом использовался для исследования генетического разнообразия отечественных пород лошадей. Для изучения дифференциации пород используют также методы, которые применяют для изучения дифференциации популяций человека и диких животных, например, изучение полиморфизма D-петли митохондриального генома.

Метод ДНК-диагностики наследственных болезней зависит от идентификации соответствующего гена. Если известна последовательность нуклеотидов в мутантном аллеле гена, проводится прямая диагностика, т. е. у анализируемой особи выявляется наличие этой мутантной последовательности. Этот метод уже применяется в США для выявления носителей генов болезни Виллебранта у собак. Его использование носит международный

характер, что проявляется в создании и актуализации специальных баз данных по животным-носителям разных наследственных заболеваний. Косвенный метод применяется в случае, если известна маркерная последовательность, тесно сцепленная с геном заболевания. В отличие от прямой диагностики при косвенной вследствие рекомбинации возможны ошибочные положительные и ошибочные отрицательные заключения о носителе.

По существу, ДНК-диагностика является одним из вариантов маркерной селекции, т. е. отбором по маркерной последовательности, которая либо сама обуславливает реализацию селекционируемого признака, либо выявлена ее ассоциация с геном или генами, которые контролируют разнообразие животных по данному признаку.

Естественно, что маркерная селекция является наиболее эффективной в случае, если селекционируемый признак можно считать менделирующим. Ярким примером такого признака является стрессчувствительность у свиней. Система исследования и генетической оценки порослят (The Swine Testing and Genetic Evaluation System — STAGES) — одна из наиболее современных с технической точки зрения программ генетической селекции, существующих в настоящее время, проводит определение хряков — носителей гена галотана молекулярными методами, что не требует дополнительного проведения их оценки по качеству потомства. Другой пример — выявление носителей при отборе в пользу или против рецессивных аллелей генов *Black* и *Extension* у лабрадоров за рубежом.

Маркерная селекция по количественным признакам у с.-х. животных, большая часть из которых относится к признакам продуктивности, является, с одной стороны, крайне актуальным, а с другой — разрабатываемым уже многие годы направлением исследований. Однако в нашей стране эти

исследования пока, к сожалению, носят единичный характер. Тем не менее, уже сегодня можно предложить маркеры и подходы, которые могут быть успешно использованы для решения конкретных практических задач разведения животных [1, 5]. Так, были предложены методы для типирования локусов, участвующих в формировании молочной продуктивности (гены казеинов, пролактина и гормона роста), и устойчивости крупного рогатого скота к персистентному лимфоцитозу, вызываемому вирусом лейкоза (ген *BoLA-DRB 3* класса II главного комплекса гистосовместимости) [6, 8, 11, 12]. Проводились работы, показывающие связь между различными аллелями генов бета-казеина и альфа-лактоальбумина, бета-лактоглобулина и признаками молочной продуктивности у коров швицкой и сычевской пород [3]. У коров черно-пестрой породы проводили поиск ассоциаций различных генотипов генов каппа-казеина, бета-лактоглобулина и альфа-лактоальбумина с технологическими свойствами молока [3]. Также проводили типирование *A-* и *B-* аллели генов пролактина и гормона роста [6]. Для аллелей гена гормона роста показана связь между содержанием белка и жира в молоке крупного рогатого скота [9]. Была описана ассоциация *AZu1*-полиморфизма гена *bGH* с молочной продуктивностью для канадского голштинского скота [10], ярославской и немецкой черно-пестрой пород [7]. Однако однозначного влияния этих генов на молочную продуктивность выявлено не было.

Поэтому в данной статье мы рассмотрим возможность применения маркирования отдельных продуктивных признаков в практике селекции крупного рогатого скота на основе результатов исследований, проведенных студентами кафедры генетики разведения животных РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева на базе лабораторий Инсти-

тута общей генетики РАН и Карельской государственной сельскохозяйственной опытной станции.

Одним из актуальных направлений работ по маркерной селекции в России является поиск генетических маркеров, ассоциирующихся с показателями молочной продуктивности у крупного рогатого скота. В качестве гена кандидата рассматривается ген гормона роста крупного рогатого скота и его полиморфные маркеры, выявляемые методом ПЦР-ПДФ с помощью рестриктаз *MspI* и *AluI* в интроне 3 и экзоне 5 соответственно. Поэтому была проведена работа по выявлению *MspI*- и *AluI*- полиморфных сайтов рестрикции гена гормона роста (**bGH**) крупного рогатого скота черно-пестрой породы и их ассоциаций с показателями молочной продуктивности, а также с показателями роста и развития животных. Работу проводили в 2005-2006 гг. в лаборатории популяционной генетики Института общей генетики РАН. В качестве материала использовали образцы ДНК, полученные из крови крупного рогатого скота черно-пестрой

породы ЗАО «Авангард» Рязанской обл. (n=57), фермы Маврино экспериментального хозяйства «Кленово-Чегодаево» Подольского района Московской обл. (n = 235) и зоостанции РГАУ - МСХА имени К.А.Тимирязева (n=35).

Результаты оценки частот *MspI*-аллеля гена гормона роста, полученные в разных стадах, мы сравнили с литературными данными и между собой (табл. 1).

Очевидно, что частоты изучаемого аллеля различаются не только между разными породами скота, но и между разными стадами внутри одной породы, причем почти в 2 раза — 0,13 в хозяйстве «Кленово-Чегодаево» против 0,28 в хозяйствах имени С.М.Кирова и «Коренево». Это показывает, что, основываясь лишь на данных, полученных в одном стаде, достаточно сложно делать заключение о распространении того или иного аллеля в конкретной породе. Кроме того, желательно проводить оценку частот изучаемого аллеля в одном и том же стаде в разные годы с целью определения влияния селекционных мероприя-

Таблица 1

Частоты *MspI*-аллеля гена гормона роста у разных пород крупного рогатого скота

Порода	Частота <i>MspI</i> -аллеля	Источники
Голштинская	0,02	[9]
Ярославская	0,02	[7]
Симментальская	0,06	[9]
Норвежская красная	0,07	[9]
Немецкая черно-пестрая	0,08	[7]
Красная горбатовская	0,09	[6]
Российская черно-пестрая*	0,13	[7]
Джерсейская	0,17	[9]
Российская черно-пестрая**	0,19	См. примечание
Карпатская коричневая	0,25	[9]
Российская черно-пестрая***	0,28	См. примечание
Российская черно-пестрая****	0,13	См. примечание
Монгольская	0,30	[11]
Серая украинская	0,32	[9]
Зебу	0,94	[9]
Монгольский як	0,94	[11]

* коровы из хозяйства им. С. М. Кирова и хозяйства «Коренево» Московской обл., ** коровы из стада зоостанции РГАУ - МСХА, *** коровы из хозяйства «Авангард», **** коровы из хозяйства «Кленово-Чегодаево».

П р и м е ч а н и е . По материалам Фалынской, 2004, 2005 и Кордичевой, 2006.

тий на динамику частот аллелей исследуемых генов. Одновременно с этим требуется выяснение степени влияния используемых в разных стадах быков-производителей на выявленные между этими стадами различия по частотам *MspI*-аллеля гена гормона роста.

Подтверждением необходимости учета происхождения животных анализируемых групп служат данные о частоте исследуемых аллелей по полиморфному сайту рестрикции *AluI* в стаде зоостанции РГАУ - МСХА, где обнаружена высокая частота аллеля *AluI*(-) — $0,46 \pm 0,01$. Полученное распределение генотипов в стаде РГАУ-МСХА не соответствует распределению Харди-Вайнберга ($\chi^2=20,8$ $df=1$). В данном стаде выявлена высокая гетерозиготность ($H=0,88$, $p<0,0009$), что говорит о возможном действии интенсивного отбора в пользу гетерозигот или является результатом использования небольшого количества быков-производителей, или, возможно, совокупного влияния обоих факторов.

При сравнении частоты аллеля *AZuI*(-) в стаде РГАУ - МСХА с частотой аллеля *AluI*(-) в стаде «Кленово-Чегодаево» выявлены достоверные различия ($td=2,25$) — 0,46 и 0,37 соответственно. Это говорит о гетерогенности исследуемых стад и подтверждает наш тезис о том, что результаты исследований, полученные в рамках одной или нескольких групп животных одной породы, нельзя напрямую переносить на всю породу в целом.

Определение ассоциаций между *MspI*- и *AluI*-полиморфных сайтов рестрикции гена гормона роста и молочной продуктивностью и живой массой у крупного рогатого скота оказалось возможным только в стадах РГАУ - МСХА и «Кленово-Чегодаево», поскольку только в этих хозяйствах удалось получить образцы крови животных с учетом их возраста и наличия данных о продуктивности.

По процентному содержанию жира животные стада зоостанции РГАУ -

МСХА, имеющие аллель *MspI*(-) — 4,63%, достоверно не отличались от животных, не имеющих его — 4,70%, однако приводимые в литературе сведения свидетельствуют о наличии связи этого аллеля с содержанием жира в молоке. С одной стороны, это может быть результатом небольшого объема выборки ($N = 35$), с другой — особенностью именно этой группы животных.

Для группы животных стада «Кленово-Чегодаево» при рассмотрении возможных ассоциаций полиморфных сайтов рестрикции *AluI* и *MspI* в совокупности с признаками молочной продуктивности показано достоверное превосходство генотипа *AluI*(+)/*AluI*(+)/*MspI*(+)/*MspI*(+) над генотипом *AluI*(-) / *AluI*(-) *MspI*(+) / *MspI*(-) ($td=2,12$; $p>95\%$) по содержанию жира в молоке по 1-й лактации.

Такие противоречивые данные об ассоциации наличия аллеля *MspI*(-) с повышенной молочной продуктивностью свидетельствуют о необходимости продолжения работ по изучению связи между генотипом и содержанием жира в молоке у животных разных пород, линий, стад с учетом того, что корреляция присутствия одного и того же аллеля с одним и тем же признаком в разных группах животных может быть как положительной, так и отрицательной [13].

При анализе ассоциации полиморфных сайтов рестрикции *AluI* и *MspI* с другим селекционируемым признаком — живой массой коров в разном возрасте в стаде «Кленово-Чегодаево» установлено, что по этому показателю группа животных, имеющая генотип *MspI*(+)/*MspI*(+), достоверно превосходит животных, имеющих генотип *MspI*(-)/*MspI*(+) в 10 мес. ($td = 2,1$, $p>95\%$). Выявлено достоверное превосходство животных с генотипами *AluI*(+) / *AluI*(+) *MspI*(+) / *MspI*(+) ($td=2,7$) и *AluI*(-)/*AluI*(-) *MspI*(+)/*MspI*(+) ($td=2,4$) над генотипом *AluI*(+)/*AluI*(-) *MspI*(+)/*MspI*(-) по живой массе в 18 мес., а также животных с

генотипом $AluI(-)/AluI(-)MspI(+)$ над животными с генотипом $AluI(+)/AluI(+)$ $MspI(+)$ $MspI(-)$ — в 10 мес., что свидетельствует о негативном влиянии аллеля $MspI(-)$ на рост и развитие молодняка крупного рогатого скота. Также установлено достоверное превосходство генотипа $AluI(+)/AluI(+)$ $MspI(+)$ $MspI(+)$ над генотипом $AluI(-)/AluI(-)$ $MspI(+)$ $MspI(-)$ ($td=2,12$; $p>95\%$) по содержанию жира в молоке за 1-ю лактацию. Ранее наличие аллеля $MspI(-)$ в генотипе ассоциировали с повышенной молочной продуктивностью. Отмеченные в отдельных стадах молочных пород частоты этого аллеля были низки, например, $p=0,08$ для немецкой черно-пестрой породы (см. табл. 1). Все породы, где отмечалась низкая частота аллеля $MspI(-)$, характеризуются относительно большей живой массой коров по сравнению с другими породами молочного направления. Таким образом, регулярный отбор по минимальной живой массе коров и может приводить к снижению частоты аллеля $MspI(-)$, а сам аллель может выступать в качестве индикатора того, существует ли подобный отбор по живой массе в той или иной породе. В изученном нами стаде «Кленово-Чегодаево» частота рассматриваемого аллеля также относительно невысока, что может быть следствием отбора по живой массе. Это различие особенно заметно по сравнению с другими, ранее изу-

ченными стадами черно-пестрой породы Московской обл., где частоты аллеля достигали 19 и 28%. Можно предположить, что в стаде «Кленово-Чегодаево» прошел более жесткий отбор по живой массе в сторону ее увеличения. Также отметим, что аллель $MspI(-)$ может оказывать неоднозначное действие на показатели молочной продуктивности: например, у ярославской породы, характеризующейся более высоким содержанием жира и белка в молоке, чем черно-пестрая порода крупного рогатого скота, частота аллеля $MspI(-)$ очень низкая.

С целью выявления связи между маркерными генами и продуктивностью животных были проведены исследования в стаде айрширского скота ОПХ «Вилга». Анализ проводился с учетом линейной принадлежности животных (линии 23000, 7960, 15710, 12656), основными показателями являлись удои и содержание жира в молоке за 1-ю лактацию. Всего было исследовано 284 коровы, отобранные с учетом года рождения. Анализ проб крови проводился в лаборатории иммуногенетики КГСХОС с определением следующих аллелей антигенов крови: T_1 , B' , E_2 , X_1 , U , U' , H'' , Z' , G_2 , G_3 , I_1 , I_2 , P_2 , Q , T_2 , J_2 , D' , J'_2 , P' , B' , R_1 , L' , M , S_1 , U'' , B_2 , O_1 , O' , Q' , G'' , C' , Z , O_2 , I' , C_1 , C_2 , L , E , R_2 , X_2 , V , Y , W , H' , F , A_2 .

В табл. 2 приведены данные анализа сочетаемости линий в стаде ОПХ

Таблица 2

Сочетаемость линий в зависимости от иммуногенетических различий

Сочетание линий	Коэффициент различий	N, гол.	Удой, кг	Жир, %
7960 × 7960	—	17	3842 ± 66	4,11 ± 0,03
12656 × 12656	—	25	3914 ± 47	4,09 ± 0,02
23000 × 23000	—	34	3875 ± 101	3,91 ± 0,09
15710 × 15710	—	13	4003 ± 92	3,98 ± 0,06
7960 × 12656	0,34	22	3696 ± 112	4,02 ± 0,07
12656 × 23000	0,59	29	4388 ± 51	4,01 ± 0,00
23000 × 15710	0,27	18	3722 ± 98	4,07 ± 0,06
15710 × 7960	0,45	26	3893 ± 77	3,90 ± 0,11
23000 × 7960	0,63	17	4302 ± 104	4,03 ± 0,09
12656 × 7960	0,50	20	4101 ± 69	3,96 ± 0,11
12656 × 15710	0,41	12	3801 ± 96	4,00 ± 0,08

«Вилга» с учетом степени иммуногенетических различий между группами маток и закрепленными за ними быками [5].

Не выявлено достоверных различий между вариантами подбора как при межлинейных, так и при внутрилинейных сочетаниях. Это означает, что обнаруженные различия между линиями по частотам изучаемых аллелей скорее могут быть использованы для определения достоверности происхождения, чем для прогноза возможного уровня продуктивности

Выводы

1. Для разработки методов использования маркеров в селекции с.-х. животных по признакам продуктивности является обязательным не только определение генотипа по маркерным локусам, но и учет показателей продуктивности у исследуемых животных; анализ групп животных должен проводиться с учетом влияния происхождения, возраста, хозяйственных условий и селекционных мероприятий, проводимых в каждом конкретном стаде.

2. Обнаруженные ассоциации между маркерным локусом и признаком продуктивности могут быть следствием не только сцепления между маркерной последовательностью и генами, контролирующими этот признак, но и результатом регулярного отбора по другим признакам продуктивности в конкретном стаде.

3. Необходим постоянный мониторинг наличия ассоциации между маркером и определенным признаком продуктивности, которая может исчезнуть вследствие как рекомбинаций, так и селекционных мероприятий. В связи с этим динамика маркерных локусов в конкретном стаде может являться характеристикой ответа популяции на селекционные мероприятия.

ЛИТЕРАТУРА

1. 1. Глазко В.И., Доманский Н.Н., Созинов Е.В. Совершенные направления

исследований ДНК-технологий // Цитология и генетика, 1998, 5. С. 80-93. — 2. Калашникова Л.А., Денисенко Е.А. Перспективы улучшения технологических свойств молока коров черно-пестрой породы с использованием ДНК-маркеров по гену каппа-казеина // Материалы 4-й междунар. науч. конф. «Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных» ВИЖ, 2004. — 3. Костюнина О.В., Хрипякова Е.Н., Стрекозов Н.И., Зиновьева Н.А. Технологические свойства молока коров разных генотипов по генам каппа-казеина, бета-лактоальбумина и альфа-лактоальбумина // Материалы международной научной конференции «Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных», Дубровицы, ВИЖ, 2004. С. 60-66. — 4. Костюченко М.В., Удина И.Г., Зайцев А.М. и др. Изучение генетического разнообразия пород лошадей отечественной селекции на основе RAPD-PCR и микросателлитных маркеров // Сельскохозяйственная биология, 2001. № 6. — 5. Спящий А.С., Максимова Л.Р., Клюкин И.А. Интеграция методов селекции в системе разведения айрширского скота Карелии. государственная с.-х. опытная станция, пос. Новая Вилга // Животноводство на Европейском Севере: фундам. пробл. и перспективы развития. Петрозаводск: Издательство ПГУ, 1996. — 6. Удина И.Г., Карамышева Е.Е., Туркова С.О., Орлова А.р. Генетический механизм устойчивости и чувствительности к лейкозу айрширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота, установленные на основе распределения аллелей гена BoLA-DRB3 // Генетика, 2003. № 3. С. 383-396. — 7. Хатами С.Р., Лазебный О.Е., Максименко В.Ф., Сулимова Г.Е. ДНК-полиморфизм генов гормона роста и пролактина у ярославского и черно-пестрого скота в связи с молочной продуктивностью. Генетика, 2005. 41(2): 229-236. — 8. Эрнст. Л. К., Сулимова Г. Е., Орлова А. Р. и др. Особенности распределения антигенов BoLA-A и аллелей гена BoLA-DRB3 у черно-пестрого ско-

та в связи с ассоциацией с лейкозом // Генетика, 1997. Т. 33. № 1. С. 87 — 95. — **9.** Agriculture and Natural resources.” Moscow Timiriazev Agricultural Academy, Moscow, Russia, 2002: 58-59. — **12.** Xu A., Van Eijk M.J.T., Park C., Lewin H.A. // J. Immunol. 1993. V. 151. P. 6977-6985. — **13.** Yao J., Aggrey S.E., Zadworny D. et al. // Genetics 1996. V.144, P. 1809-1816.

SUMMARY

Some aspects of DNA-markers and protein markers usage for animal breeding purposes are discussed. It is shown, that identification of molecular markers in farm animal populations does not effect on animal breeding practice, if selection goals and methods of zootechnic experiment planning are not taken in consideration.