

ФГБОУ ВПО «БРЯНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.Г. ПЕТРОВСКОГО»

Инновационный научно-образовательный центр биотехнологии и экологии

На правах рукописи

СМАЗНОВА ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА  
ГЕНА BoLA-DRB3, ВЛИЯЮЩЕГО НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ЛЕЙКОЗУ,  
И ГЕНОВ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ  
У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

Специальность

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Нам Ирина Ян Гуковна

Санкт-Петербург - 2014

Работа выполнена в Инновационном научно-образовательном центре биотехнологии и экологии ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, директор инновационного научно-образовательного центра биотехнологии и экологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского»  
**Нам Ирина Ян Гуковна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией ДНК-технологий Всероссийского научно-исследовательского института племенного животноводства Министерства сельского хозяйства Российской Федерации,  
Калашникова Любовь Александровна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Государственного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных» Российской академии сельскохозяйственных наук,  
**Дементьева Наталья Викторовна**

**Ведущая организация:** Государственное научное учреждение Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства  
(ГНУ Северо-Кавказский НИИЖ)

Защита диссертации состоится «27» июня 2014 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 006.012.01 при ГНУ Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и разведения сельскохозяйственных животных Россельхозакадемии: 196601, Санкт-Петербург – Пушкин, Московское шоссе, 55а ГНУ ВНИИГРЖ Россельхозакадемии

Факс: 8(812)465-99-89, e-mail: [spbvniigen@mail.ru](mailto:spbvniigen@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных.

Автореферат разослан “....” .....2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
Доктор биологических наук, профессор

Г.Н. Сердюк

**Актуальность проблемы.** В последние два десятилетия в развитых странах Евросоюза, США, Канаде бурно развивается геномная селекция крупного рогатого скота, основанная на применении ДНК-технологий. Разработка ДНК-маркеров хозяйственно – ценных признаков позволила проводить экспресс-оценку поголовья на устойчивость к инфекционным заболеваниям и стрессорным факторам внешней среды, выявлять племенных животных с высоким генетическим потенциалом молочной и мясной продуктивности, высоким качеством продукции. Молекулярно-генетическая оценка племенного поголовья коров и быков является важнейшим этапом селекционной работы и при разведении скота.

В России также проводились работы по применению метода ДНК-маркеров для генотипирования коров по генам хозяйственно-ценных признаков. Так, изучалась генетическая устойчивость к вирусу лейкоза КРС коров из разных регионов страны (Сулимова, 1993; Удина и др., 2009; Эрнст, 2003), был изучен аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3*, связанного с генетической устойчивостью животных к вирусу лейкоза крупного рогатого скота, у разных пород КРС (Шарифуллина, 2006; Быков, 2009; Рузина, 2012; Козлов и др., 2012). В проведенных ранее исследованиях аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* в некоторых племенных хозяйствах Брянской области было выявлено 6-15% коров, несущих аллели устойчивости в гомозиготном состоянии, и до 32% генетически устойчивых к вирусу лейкоза коров, имеющих генотипы У/Н и У/С (Кожевина и др., 2009; Смазнова и др., 2010; Козлов и др., 2011), что объясняет сравнительное благополучие этих хозяйств относительно распространенности лейкоза.

Особое значение для разведения крупного рогатого скота имеет генетическая оценка быков-производителей, используемых для производства семени на государственных племенных предприятиях (станциях). В настоящее время в литературе найдено немного работ по применению ДНК-маркеров для генетического анализа быков-производителей по устойчивости к лейкозу и генам молочной продуктивности.

Исследования по аллельному полиморфизму гена *BoLA-DRB3* быков-производителей разных пород из государственных племенных станций Краснодарского края, Московской, Ленинградской и Ростовской областей, Карелии, Финляндии, Норвегии были проведены в работах Ковалюк (2008), Сацука (2009), Мачульской (2009). В этих работах было показано существенное преобладание у племенных быков – производителей аллелей чувствительности к ВЛКРС, практически полное отсутствие быков, несущих аллели устойчивости в гомозиготном состоянии, и незначительное количество быков с аллелями У в гетерозиготном состоянии - 11-14%.

Большое значение для повышения продуктивности молочного стада имеет генетический анализ быков по мажорным генам, влияющим на лактацию и качество продукции. Рядом авторов исследовался полиморфизм генов, определяющих молочную продуктивность: соматотропина,  $\beta$  – лактоглобулина, пролактина (Сулимова, 2008; Гладырь, 2006; Дроздов, 2013), а также качество молока по гену каппа-казеина (Дроздов, 2013).

**Целью настоящей работы** является исследование быков-производителей разных пород Брянской области, быков черно-пестрой породы племенной станции ОАО «Невское» и быков голштинской породы из «ЖодиноАгроПлемЭлита» НППЦ НАН Беларуси по животноводству, по устойчивости к вирусу лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), а также изучение генетического полиморфизма быков-производителей разных пород Брянской области по генам молочной продуктивности.

**Задачи исследования:**

1. Провести анализ генетической устойчивости к ВЛКРС по аллелям гена *BoLA-DRB3* быков-производителей разных пород из ОАО «Брянское» - Брянская госплеменная станция;

2. Провести генотипирование по гену BoLA-DRB3 быков-производителей черно-пестрой породы из ОАО «Невское» - госплемстанция Ленинградской области;

3. Анализ генетического полиморфизма гена BoLA-DRB3 у быков - производителей голштинской породы из «ЖодиноАгроПлемЭлита» НППЦ НАН Беларуси по животноводству;

4. Провести генотипирование быков - производителей разных пород Брянской области по генам, связанным с молочной продуктивностью и качеством молока:

- ген гормона роста,
- ген бета-лактоглобулина,
- ген пролактина,
- ген каппа-казеина.

#### **Научная новизна.**

Впервые был изучен аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у быков-производителей Брянской области разных пород: черно-пестрой, швицкой, симментальской, красно-пестрой и абердин-ангусской. Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 был также изучен у быков-производителей черно-пестрой и голштинской пород Ленинградской области (ОАО «Невское») и «ЖодиноАгроПлемЭлита» «НППЦ НАН Беларуси по животноводству».

Установлено, что у быков черно-пестрой породы преобладают аллели чувствительности и их частота увеличивается с ростом степени голштинизации. С увеличением уровня голштинизации наблюдается сужение аллельного разнообразия гена BoLA-DRB3.

У быков производителей других пород выявлено преобладание нейтральных аллелей и снижение доли аллелей чувствительности.

Оценен потенциал быков - производителей из разных племпредприятий как доноров генетической устойчивости к ВЛКРС.

Впервые изучен аллельный полиморфизм быков-производителей разных пород государственной племенной станции Брянской области по генам соматотропина, бета-лактоглобулина, пролактина, каппа-казеина. Оценен генетический потенциал молочной продуктивности быков-производителей Брянской области.

**Практическая значимость работы.** Результаты анализа аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 у быков-производителей Брянской области являются основой для планирования племенной работы по обогащению поголовья КРС Брянской области аллелями устойчивости к ВЛКРС и повышению генетической устойчивости стад КРС к вирусу лейкоза. Оценка потенциала быков - производителей из разных племпредприятий как доноров генетической устойчивости к ВЛКРС позволяет направленно использовать быков при разведении скота, устойчивого к лейкозу.

Оценка генетического потенциала молочной продуктивности быков-производителей Брянской области по генам соматотропина, бета-лактоглобулина, пролактина, каппа-казеина позволяет планировать использование выявленных высокоценных особей в разведении скота, что приведет к повышению продуктивности молочного производства региона в целом.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Результаты анализа генетической структуры поголовья быков-производителей разных пород крупного рогатого скота ОАО «Брянское» - государственной племенной станции Брянской области по аллелям гена BoLA-DRB3.

2. Сравнение генетической структуры поголовья быков-производителей разных пород крупного рогатого скота ОАО «Брянское» - государственной племенной станции Брянской области по аллелям генов молочной продуктивности.

3. Сравнительная характеристика аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 поголовья быков-производителей черно-пестрой и голштинской породы крупного рогатого скота ОАО «Брянское», ОАО «Невское» - государственной племенной станции

Ленинградской области и «ЖодиноАгроПлемЭлита» НПЦ НАН Беларуси по животноводству.

**Апробация работы.** Материалы исследований доложены и обсуждены на следующих конференциях:

Всероссийская выставка «Золотая осень», 2012 год – бронзовая медаль, 2013 год – серебряная медаль; Международная научно-практическая конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, 2010; Научно-практическая конференция «Интеллектуальный потенциал молодежи на службу России», Брянск, 2011; «Международная научно-практическая конференция «Трансфер инновационных биотехнологий в растениеводстве, животноводстве, медицине, экологии», Брянск, 2012; III и IV региональная научно-практическая конференция молодых исследователей и специалистов «Приоритетные направления современной науки: фундаментальные проблемы, инновационные проекты», Брянск, 2012, 2013; Международная конференция ученых «Трансфер инновационных биотехнологий в селекции растений, экологии, растениеводстве, животноводстве». Республика Беларусь, г. Брест, 2012; II Среднерусский экономический форум. Выставка-презентация инновационных проектов молодых ученых и специалистов Центрального федерального округа и диалога с экспертами «Молодежь в инновационном пространстве. Идеи молодых в оценке компетентных профессионалов» Курск, 2013; VIII Международная научная конференция "Факторы экспериментальной эволюции организмов", Украина, Алушта, 2013; Международная научно-практическая конференция «Научное обеспечение инновационного развития животноводства», Жодино, Беларусь, 2013; - на конкурсе УМНИК Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере; - на Всероссийской выставке-форуме РосБиоТех-2012.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 128 страницах, состоит из следующих разделов: введение, литературный обзор, материал и методика проведения исследований, результаты и обсуждение, выводы, список литературы. Работа содержит 9 таблиц и 35 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 196 источников, из них 152 на английском языке.

**Публикации.** По теме диссертационной работы опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 в журналах, рекомендованных ВАК.

**Работа поддержана грантами:** 1. Минобрнауки АВЦП 2.1.1./224 (2009-2011) «Развитие фундаментальных исследований по биотехнологии растений, животных, нанобиотехнологии»

2. ФЦП 1.1. № 02.740.11.0285 (2009 — 2011) «Проведение фундаментальных и прикладных исследований по биотехнологии растений и животных и нанобиотехнологии и развитие малого бизнеса на основе инновационных разработок»

3. Администрация Брянской области. ХД № 125, (2008-2009) «Разработка биотехнологических подходов для повышения рентабельности животноводства в Брянской области (КРС) за счет формирования молочного стада с генетической устойчивостью к лейкозу, высоким потенциалом молочной продуктивности и высоким качеством молока».

#### **Материалы и методы исследования.**

Исследования проводились в Инновационном научно-образовательном центре биотехнологии и экологии Брянского государственного университета в период с 2011 по 2013 гг.

В работе были исследованы образцы спермы быков разных пород ОАО «Брянское» (52 быков), быков черно-пестрой и голштинской пород ОАО «Невское» Ленинградской области и «ЖодиноАгроПлемЭлита» НПЦ НАН Беларуси по животноводству.

Общая схема проводимых исследований представлена на рис.1:

Выделение ДНК из спермы проводили с помощью набора реактивов «ExtraGene™ DNA Prep100».

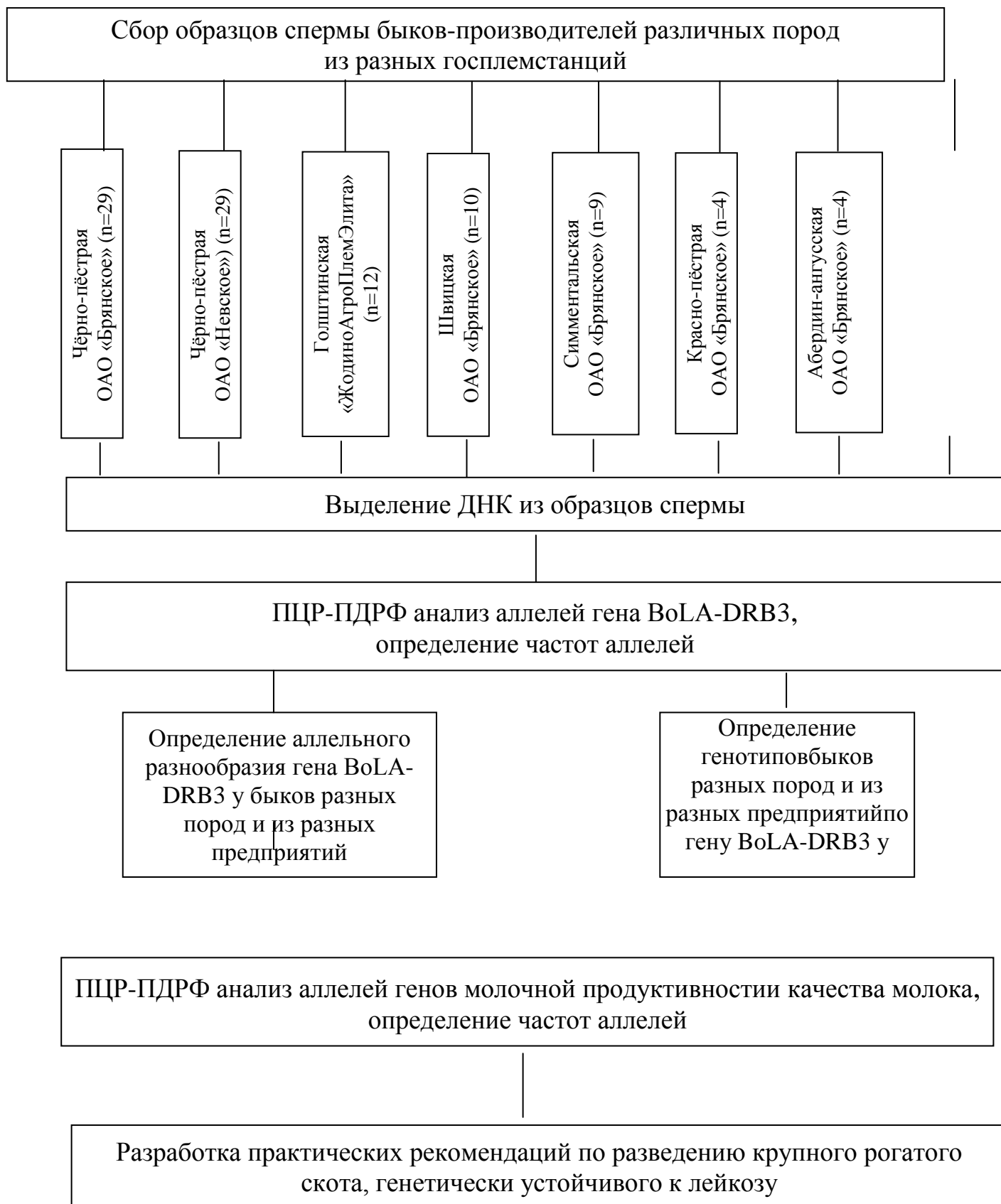
Полимеразную цепную реакцию и синтез праймеров проводили согласно методике Сулимовой Г.Е. (1999):

HLO-30 (Forward) 5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3';

HLO-32 (Reverse) 5'-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC-3'.

Для рестрикции использовали три фермента: RsaI (37 °C), HaeIII (37 °C) и BstX2I (60 °C).

Анализ аллельного полиморфизма генов соматотропина, бета-лактоглобулина, пролактина и каппа-казеина проводили по описанным ранее методам.



## Рисунок 1 - Общая схема исследований

### Результаты и обсуждение

#### 1. Генетический полиморфизм крупного рогатого скота по гену *BoLA-DRB3*.

##### 1.1. Анализ аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* методом ПЦР-ПДРФ.

Изучение генетической устойчивости крупного рогатого скота к вирусу лейкоза КРС методом ПЦР-ПДРФ основано на определении генетического полиморфизма гена *BoLA-DRB3* и выявлении аллелей, ассоциированных с устойчивостью или чувствительностью к ВЛКРС и ответственных за формирование иммунной реакции к вирусу.

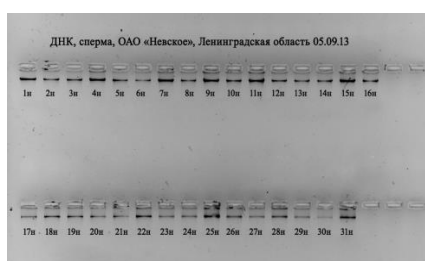


Рис.2 - Электрофорез геномной ДНК из образцов спермы в 1% агарозном геле

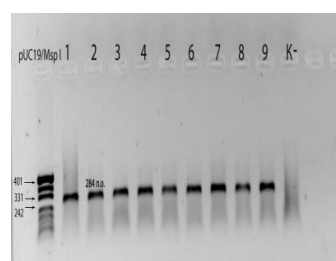


Рис.3 - Электрофорез продуктов ПЦР экзона 2 гена *BoLA DRB3* рUC19/*MspI* -маркер молекулярных масс, К – отрицательный контроль, 1-9 – исследуемые образцы

Образцы ДНК, выделенной из спермы, проверяются с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (рис.2). На рис. 3 видно, что полимеразная цепная реакция с геномной ДНК из образцов спермы прошла хорошо, в геле видна полоса ДНК с ожидаемым размером 284 п.о., что свидетельствует о достаточном количестве в пробе дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, Taq-ДНК-полимеразы, правильном составе буфера для полимеразной реакции.

Фрагмент 284 п.о. далее расщепляли рестрицирующими эндонуклеазами *RsaI*, *HaeIII* или *BstX2I* с последующим разделением полученной смеси фрагментов ДНК с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и определением длин рестрикционных фрагментов (рис. 4).

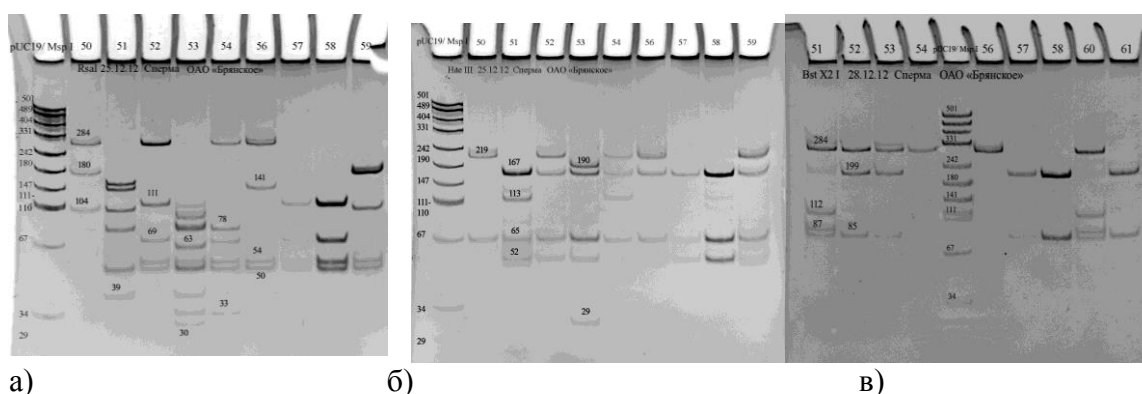


Рис. 4 - Электрофорез продуктов рестрикции а) эндонуклеаза *Rsa I*; б) эндонуклеаза *Hae III* в) эндонуклеаза *Bst X2I* рUC19/*Msp I* – маркер молекулярных масс; 50-61 – исследуемые образцы

Различия в нуклеотидной последовательности различных аллелей гена BoLA-DRB3 (т. е. полиморфизм на уровне ДНК) лежат в основе различного распределения сайтов рестрикции фрагмента 284 п.о., поэтому аллельный полиморфизм ДНК будет проявляться как полиморфизм длин рестриционных фрагментов (ПДРФ). Аллельные варианты гена определяли по наличию или отсутствию указанных сайтов рестрикции согласно ранее полученным таблицам Сулимовой (1993). Для выявления генетической устойчивости КРС к лейкозу необходимо выявить наличие аллелей гена BoLA-DRB3, ответственных за формирование иммунной реакции к вирусу.

### **1.2. Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у быков-производителей черно-пестрой и голштинской пород из разных регионов**

Основная разводимая в Брянской области порода КРС – черно-пестрая голштинизированная, сильно подвержена инфицированию вирусом лейкоза КРС. Изучение аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 быков-производителей черно-пестрой и голштинской пород имеет важнейшее значение для развития молочного животноводства.

Нами было проведено генотипирование по гену BoLA-DRB3 быков – производителей черно-пестрой и голштинской пород из ОАО «Брянское» по племенной работе (29 голов), ОАО «Невское» по племенной работе (Ленинградская область) (29 голов), дочернего предприятия «ЖодиноАгроПлемЭлита» НПЦ НАН Беларуси по животноводству» (г. Жодино Минской области) (12 голов), откуда завозится сперма для племенных и товарных молочных хозяйств Брянской области.

Распределение частот аллелей BoLA-DRB3, ассоциированных с устойчивостью и восприимчивостью к лейкозу у изученных пород КРС, представлено в таблице 1. Как следует из данных таблицы 1, быки из 3 разных регионов имеют в совокупности 17 разных аллелей из 54 возможных. При этом наблюдается значительное преобладание в этих популяциях быков-производителей, несущих аллели восприимчивости к вирусу лейкоза. Наибольшее количество животных несет аллели восприимчивости к вирусу лейкоза КРС \*22, \*24 и в меньшее количество быков - \*8. Общее количество аллелей восприимчивости к лейкозу изменяется от 60,3% в Брянском стаде до 67,2% в Ленинградской области и до 70,8% у белорусских быков.

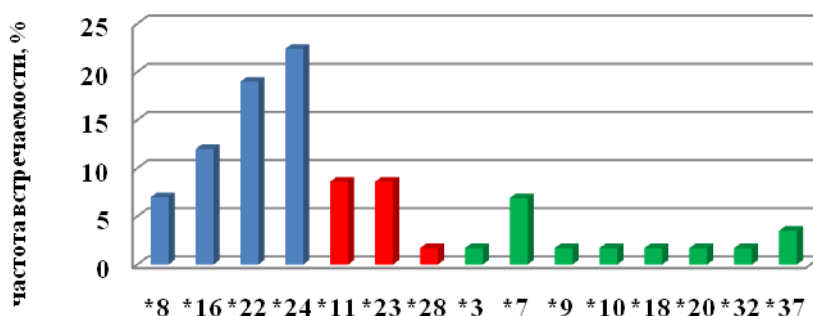
Распределение аллелей гена BoLA-DRB3 у быков – производителей черно-пестрой и голштинской пород из разных племенных хозяйств показано на рисунке 5.

Таблица 1 - Частота встречаемости аллелей BoLA-DBD3 у быков черно-пестрой и голштинской пород

№ аллеля	Частота аллелей					
	ОАО «Брянское», (n = 29)		ОАО «Невское» (n=29)		«ЖодиноАгроПлемЭлита» (n = 12)	
Аллели, определяющие чувствительность к лейкозу						
8	6,9	60,3	1,7	67,2	12,5	70,8
16	12,0		25,9		16,7	
22	19,0		13,7		8,3	
24	22,4		25,9		33,3	
Аллели, определяющие устойчивость к лейкозу						
11	8,6	19,1	1,7	12,1	4,2	8,4
23	8,6		6,9			
28	1,7		3,5		4,2	



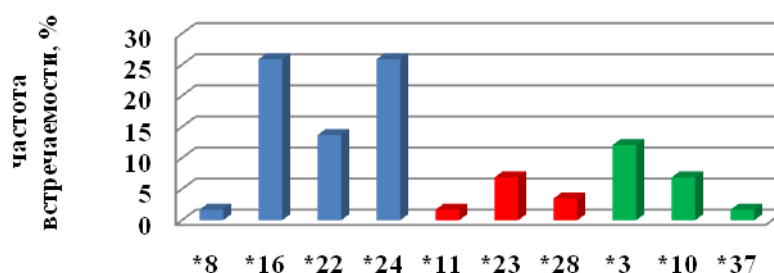
Аллели, нейтральные по отношению к лейкозу						
3	1,7	20,6	12,1	20,7	12,5	20,8
7	6,9		0		0	
9	1,7		0		0	
10	1,7		6,9		0	
14	0		0		4,2	
18	1,7		0		0	
20	1,7		0		0	
27	0		0		4,2	
32	1,7		0		0	
37	3,5		1,7		0	
Все аллели			100			



Спектр аллелей

Рис. 5 - Распределение аллелей гена BoLA-DRB3 у быков черно-пестрой породы госплемстанции ОАО «Брянское»

На рис. 5 показано, что аллельный спектр у быков-производителей госплемстанции ОАО «Брянское» достаточно узкий – всего 15 разных аллелей из 54 известных. При этом у быков черно-пестрой породы Брянской области имеются все варианты аллелей чувствительности к вирусу лейкоза КРС, из них преобладают \*24 и \*22 аллели с частотой встречаемости 22,4% и 19% соответственно. Из 3 аллелей устойчивости \*11 и \*23 имеют частоту 8,6% и \*28 - 1,7%. Нейтральные аллели представлены только 8 вариантами.



Спектр аллелей

Рис. 6 - Распределение аллелей гена BoLA-DRB3 у быков черно-пестрой породы госплемстанции ОАО «Невское»

На рисунке видно, что у быков черно-пестрой породы госплемстанции ОАО «Невское» количество чувствительных аллелей в 2 раза превышает количество устойчивых и нейтральных аллелей, при этом почти по 26% приходится на долю \*16 и \*24

аллелей. В изученной выборке имеются все три аллеля устойчивости, из них доминирующим является \*23 аллель. Из 29 особей только 3 быка имеют нейтральные аллели - \*3, \*10 и \*37.

Похожая картина в распределении аллелей наблюдается и у быков голштино-фризской породы из Республики Беларусь (рис. 7). На долю аллелей чувствительности приходится 70,8%. Всего 2 быка имеют аллели устойчивости - \*11 и \*28. Нейтральные аллели представлены тремя вариантами - \*3, \*14 и \*27.



Рис. 7 - Распределение аллелей гена BoLA-DRB3 у быков черно-пестрой породы «ЖодиноАгроПлемЭлита»

Анализ полученных данных приводит к выводу, что у быков-производителей черно-пестрой голштинизированной и голштино-фризской пород, принадлежащих госплемстанциям Брянской и Ленинградской областей и Беларуси, наблюдается резкий сдвиг в сторону аллелей чувствительности: 60,3%, 67,2% и 70,8% соответственно. Поскольку степень голштинизации самая низкая у брянских быков и самая высокая у белорусских быков, то можно сделать вывод о корреляции между уровнем голштинизации стада и количеством аллелей чувствительности.

Брянские и ленинградские быки имеют по 3 аллеля устойчивости к ВЛКРС, их количество невелико у брянских быков (19,1%), оно снижается почти в полтора раза у ленинградских животных (12,1%). У быков из Беларуси выявлено 2 аллеля устойчивости к лейкозу, общее их количество составляет 8,4%.

Важное значение имеют данные по полиморфизму нейтральных аллелей – генотипирование животных показало, что при повышении степени голштинизации происходит не только уменьшение доли нейтральных и устойчивых аллелей, но и резкое сокращение их разнообразия. Общее количество нейтральных по отношению к вирусу лейкоза аллелей практически одинаково во всех 3 группах (20,6% – 20,8%), но важно отметить резкое уменьшение числа аллелей – так называемое «аллельное сужение»: от 8 в ОАО «Брянское» до 3 в остальных популяциях. Это очень опасная тенденция, поскольку ген BoLA-DRB3 входит в главный комплекс гистосовместимости и определяет формирование гуморального и клеточного иммунитета не только на вирус лейкоза КРС, но и в ответ на другие патогенные микроорганизмы, в том числе вызывающие опасные заболевания – туберкулез, бруцеллез, мастит и др. Сужение аллельного спектра означает снижение защитной реакции организма на проникновение разных инфекционных микроорганизмов, что может привести к массовому распространению заболеваний, вызываемых этими патогенами.

Полученные результаты хорошо согласуются с результатами генетических исследований быков – производителей из племенных предприятий Ленинградской, Московской и Ростовской областей, Краснодарского края, Карелии и Финляндии (Ковалюк, 2008; Сацук, 2009; Мачульская, 2009).

В работе Сацука В.Ф. (2009) в группе из 293 голштинских быков из госплемстанций Краснодарского края, Ростовской и Ленинградской областей и Карелии

было выявлено всего 25 аллелей гена BoLA-DRB3. При этом аллели, определяющие восприимчивость к вирусу лейкоза, имеют высокую частоту встречаемости, что говорит об их селекционной предпочтительности. В то же время значительная часть аллелей, связанных с устойчивостью или нейтральностью к ВЛКРС, находятся в процессе элиминации. По мнению автора, такая аллельная «узость» при высоком потенциале молочной продуктивности может привести к ограничению пределов компетентности иммунной системы у отдельных животных и стад в целом, и как следствие, сделать их уязвимыми перед внешними неблагоприятными воздействиями.

Масленников М.Г. (2005) также отмечает, что в изучаемых популяциях животных черно-пестрой породы наблюдается низкий уровень гетерогенности. По его мнению, чем выше степень «голландизации» скота в хозяйстве, тем меньше вариантов аллелей гена BoLA-DRB3, и больше частота встречаемости аллелей чувствительности к лейкозу. Этот вывод подтверждается полученными нами результатами.

Быки-производители, несущие преимущественно аллели восприимчивости к лейкозу, не представляют угрозу для здоровья поголовья КРС в Ленинградской области и в Беларуси в связи с отсутствием возбудителя заболевания – в этих регионах добились полного оздоровления хозяйств от вируса лейкоза. В племенных хозяйствах Брянской области, в которых нет РИД-положительных животных, сперма быков, несущих аллели восприимчивости к вирусу, также не приведет к поражению стада лейкозом. Однако использование спермы изученных быков-производителей в племенных и товарных хозяйствах, где есть вирусоносители и больные животные, будет способствовать дальнейшему распространению болезни.

Для Брянской области, как и для подавляющего большинства регионов России, чрезвычайно опасно использование быков-производителей с генами восприимчивости к лейкозу, так как это приводит к накоплению в популяции КРС аллелей, подавляющих формирование защитных реакций и определяющих восприимчивость к вирусу лейкоза. При наличии ВЛКРС на фермах увеличение доли животных с аллелями чувствительности к вирусу приведет к постоянному росту вирусоносительства и появлению больных животных, что и наблюдается на животноводческих фермах в большинстве регионов страны. Поэтому для оздоровления от лейкоза поголовья КРС племенных и товарных хозяйств, разводящих черно-пеструю и голштинскую породу, необходима разработка системы мероприятий, учитывающих передачу от быков-производителей потомству преимущественно аллелей чувствительности к вирусу.

### ***1.2.1. Сравнение быков-производителей черно-пестрой и голштинской пород из разных племенных станций по генотипам гена BoLA-DRB3***

Анализ генотипической структуры поголовья быков-производителей из всех трех регионов по гена BoLA-DRB3 представлен в таблице 2, в которой животные распределены по 6 группам: ЧЧ, ЧН, НН, УН, УЧ, УУ. Полученные результаты свидетельствуют, что преобладающее большинство составляют особи, имеющие генотипы ЧЧ, ЧН, ЧУ. При этом среди них большинство составляют особи, несущие аллели восприимчивости в гомозиготном состоянии: 41,3% у брянских, 44,8% у ленинградских и 50% у белорусских быков. То есть, с повышением уровня молочной продуктивности и голландизации наблюдается явная тенденция к увеличению генотипов, несущих аллели чувствительности к вирусу лейкоза в гомозиготном состоянии.

В гетерозиготном состоянии аллели чувствительности встречаются совместно с нейтральными аллелями достаточно часто: 20,7% у брянского поголовья, 27,6% в ленинградском стаде и 33,4% у белорусских быков. Генотипы, имеющие сочетание аллелей устойчивости и восприимчивости, наблюдаются у 17,2% брянских и ленинградских и 8,3% белорусских быков.

Таблица 2 - Генотипическая структура поголовья быков-производителей черно-пестрой породы из разных госплемстанций

Генотип по локусу BoLA-DRB3	Частота встречаемости генотипа, %		
	ОАО «Брянское» (n=29)	ОАО «Невское» (n=29)	«ЖодиноАгроПлемЭлита» (n=12)
Ч/Ч	41,3	44,8	50
У/Ч	17,2	17,2	8,3
У/У	3,5	0	0
Ч/Н	20,7	27,6	33,4
Н/Н	3,5	3,5	0
У/Н	13,8	6,9	8,3
Всего:	100	100	100
H <sub>o</sub>	0,897	0,793	0,917
H <sub>e</sub>	0,872	0,821	0,816
D	0,028	-0,034	0,123
χ <sup>2</sup>	0,000705	0,000935	0,012390

По аллелям устойчивости к лейкозу наблюдается противоположная ситуация: только 1 бык из 29 проанализированных животных Брянской области несет аллели устойчивости к лейкозу в гомозиготном состоянии, в ленинградской и белорусской популяциях такие особи не обнаружены. Наибольшее количество быков, несущих аллели устойчивости в гетерозиготном состоянии, также обнаружено в брянском стаде: 31% по сравнению с 24,1% в ленинградской и 16,6% в белорусской популяциях быков.

Таким образом, преобладающее число генотипов быков – производителей содержит аллели восприимчивости к вирусу лейкоза: 79,2% брянской, 89,6% ленинградской и 91,7% белорусской популяций.

Устойчивость к лейкозу является доминантным признаком, поэтому генетически устойчивыми к вирусу являются все быки, несущие аллели \*11, \*23 и \*28 даже в гетерозиготе, в сочетании с аллелями чувствительности или нейтральными аллелями. На рисунке 8 видно, что устойчивыми к вирусу является 34,5% брянской, 24,1% ленинградской и 16,6% белорусской популяции черно-пестрых быков. Высокий уровень аллелей чувствительности в популяции, от 65,5% в брянской популяции до 83,4% у белорусских животных, даже при рецессивном проявлении признака может привести к высокому уровню поражения поголовья вирусом лейкоза.

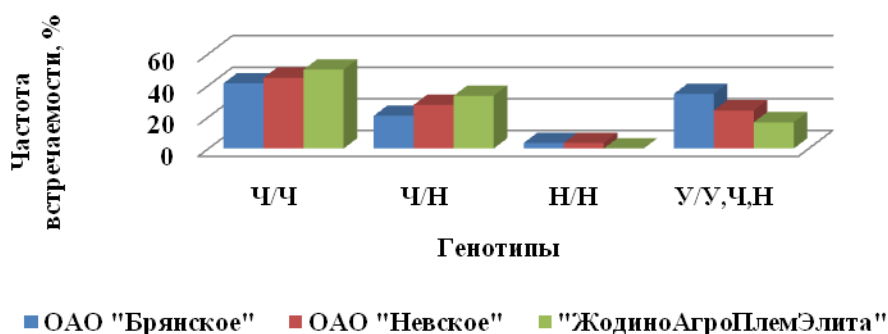


Рисунок 8 – Распределение быков – производителей черно-пестрой

и голштинской пород по устойчивости к лейкозу

Таким образом, голштинизация поголовья черно-пестрой породы с использованием спермы быков голштинской породы, в том числе западно-европейской селекции, направленная на повышение молочной продуктивности, наряду с увеличением удоев молока у коров, приводит к постоянному росту генетически восприимчивых к вирусу лейкоза животных. На передовых племенных фермах России, а также в Беларуси и ведущих странах Западной Европы, где нет источника инфекции (все животные показывают РИД (-)), этот фактор не играет отрицательной роли в развитии животноводства. Однако в России, где в 63 регионах зарегистрированы РИД-положительные животные и некоторые хозяйства имеют больных лейкозом коров, использование для разведения спермы быков с аллелями чувствительности в гомозиготном состоянии или в гетерозиготном с нейтральными аллелями, будет приводить к повышению числа РИД-положительных коров и дальнейшему распространению лейкоза.

### ***1.3. Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у быков-производителей разных пород Брянской области***

В настоящее время в хозяйствах Брянской области разводят крупный рогатый скот следующих молочных пород: черно-пестрая, голштинская, швицкая, симментальская, красно-пестрая, и в 2010 году в регионе был начат масштабный проект по развитию мясного животноводства на основе коров абердин-ангусской породы. Основное количество животноводческих хозяйств молочного направления разводит коров черно-пестрой породы, животных остальных пород в области немного, поэтому ОАО «Брянское» имеет всего от 4 до 10 быков-производителей этих пород для получения спермы.

В таблице 3 представлены характер распределения и частота встречаемости аллелей гена BoLA-DRB3 у быков швицкой, симментальской, красно-пестрой и абердин-ангусской породы.

Таблица 3 - Частота встречаемости разных аллелей гена BoLA-DRB3 у быков разных пород Госплемстанции ОАО «Брянское»

Отношение к лейкозу	№ аллеля	Частота встречаемости разных аллелей BoLA-DRB3							
		Швицкая (n=10)		Симментальская (n=9)		Красно-пестрая (n=4)		Абердин-ангусская (n=4)	
		%	Всего, %	%	Всего, %	%	Всего, %	%	Всего, %
Чувствительность	8	-	5	5,5	33,3	-	12,5	-	12,5
	16	-		16,8		-			
	22	5		5,5		-			
	24			5,5		12,5		12,5	
Устойчивость	11	-	25	16,8	22,3	25	25	-	0
	23	20		-		-			
	28	5		5,5		-			
Нейтральные	1	-	70	5,5	44,4	12,5	62,5	12,5	87,5
	3	-				12,5		-	
	6	-		5,5		-		-	
	7	25		11,2		12,5		-	
	10	20		-		-		-	
	12					12,5		62,5	

	15	-		11,2		-		12,5
	18	-		5,5		-		-
	20	10		-		-		-
	27	5		-		-		-
	35	-		-		12,5		-
	37	5		-		-		-
	44	-		5,5		-		-
	49	5		-		-		-

Небольшое количество быков – производителей этих пород не позволяет сделать достоверный вывод о характерном для этих пород распределении аллелей гена VoLA-DRB3, на основании проведенных исследований можно говорить только об некоторых особенностях генетической структуры брянского стада быков-производителей. Так, достоверным является преобладание нейтральных аллелей по сравнению с черно-пестрой породой: у быков швицкой породы нейтральные аллели составляют 70%, симментальской – 44,4%, красно-пестрой 62,5%, абердин-ангусской – 87,5%, в то время как в трех группах быков черно-пестрой породы было 20,6% - 20,8% нейтральных аллелей. Примерно четверть аллелей составляют аллели устойчивости, кроме абердин-ангусской породы, у которой такие аллели не обнаружены. Интересно отметить также очень низкий уровень аллелей чувствительности (5%) у быков швицкой породы.

### ***1.3.2. Анализ генотипов по гену VoLA-DRB3 быков - производителей разных пород Брянской области***

Генотипический анализ распределения животных по гену VoLA-DRB3 позволяет увидеть картину реальной устойчивости животных к вирусу лейкоза. Поскольку аллели устойчивости являются доминантными, то животные, имеющие их в гетерозиготном состоянии совместно с аллелями чувствительности, не проявляют признаков персистентного лимфоцитоза.

В таблице 4 представлены данные по распределению всех пород быков – производителей Брянской госплемстанции по генотипам по локусу VoLA-DRB3.

Таблица 4 - Распределение генотипов по локусу VoLA-DRB3 у быков – производителей разных пород госплемстанции ОАО «Брянское»

Генотип по локусу VoLA-DRB3	Частота встречаемости генотипа, %				
	черно-пестрая (n=29)	швицкая (n=10)	симментальская (n=9)	красно-пестрая (n=4)	абердин-ангусская (n=4)
Ч/Ч	41,35	-	-	-	-
У/Ч	17,25	-	22,2	-	-
У/У	3,45	-	-	-	-
Ч/Н	20,7	10	44,5	25	25
Н/Н	3,45	40	11,1	25	75
У/Н	13,8	50	22,2	50	-
Всего	100	100	100	100	100
H <sub>o</sub>	0,897	0,9	0,89	1	0,5
H <sub>e</sub>	0,872	0,835	0,894	0,844	0,563
D	0,028	0,078	0,0045	0,185	-0,112
χ <sup>2</sup>	0,00072	0,0051	0,000078	0,029	0,0071

Анализ полученных результатов позволяет сделать следующие выводы:

- 12 из 29 быков черно-пестрой породы имеют генотип Ч/Ч, для которого характерно подавление формирования защитной реакции на вирус лейкоза КРС, что приводит к развитию лейкоза;

- в стаде отсутствуют быки, имеющие аллели устойчивости в гомозиготном состоянии (генотип У/У имел списанный в настоящее время бык Милый черно-пестрой породы, сперма которого была проанализирована);

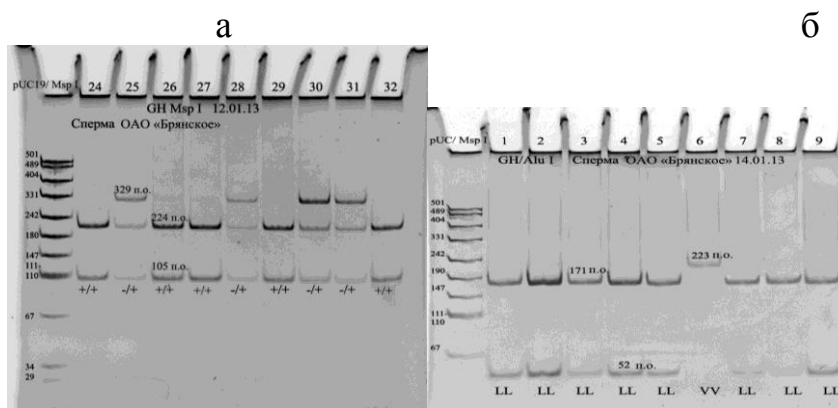
- в гетерозиготном состоянии аллели устойчивости имеют всего 9 из 29 быков черно-пестрой породы, 4 из 9 быка симментальской породы, половина быков швицкой и красно-пестрой породы. Среди быков абердин-ангуссов генотипов, несущих аллели устойчивости к лейкозу, не имеется.

## **2. Аллельный полиморфизм быков-производителей разных пород Брянской области по генам молочной продуктивности и качества молока**

Продуктивность коров как полигенный количественный признак, складывается из интегральной экспрессии сотен генов, большая часть которых не связана с процессом лактации. К мажорным генам, определяющим потенциал молочной продуктивности животных, относятся гены  $\beta$ -лактоглобулина (BLG), пролактина (PRL) и соматотропина (GH) по AluI и MspI маркерам. а также ген, связанный с качеством молока – ген каппа-казеина (CSN). Эти гены представлены в популяции несколькими аллелями, была установлена связь между определенными аллелями каждого из них и интенсивностью лактации и качеством молока – белкомолочностью и жирномолочностью. Для генотипирования животных по этим генам ранее были разработаны методы генетического маркирования на основе ДНК-маркеров.

### **3.1. Анализ аллельного полиморфизма генов, связанных с молочной продуктивностью и качеством молока у быков-производителей разных пород Брянской области**

Нами было проведено генотипирование быков разных пород госплемстанции ОАО «Брянское» по гену гормона роста по Msp I – маркеру (рис. 9а) и Alu I – маркеру (рис. 9б),  $\beta$ -лактоглобулина по методикам Medrano (рис. 9в) и Гладырь (рис. 9г), пролактина (рис. 9д) и каппа-казеина (рис. 9е).



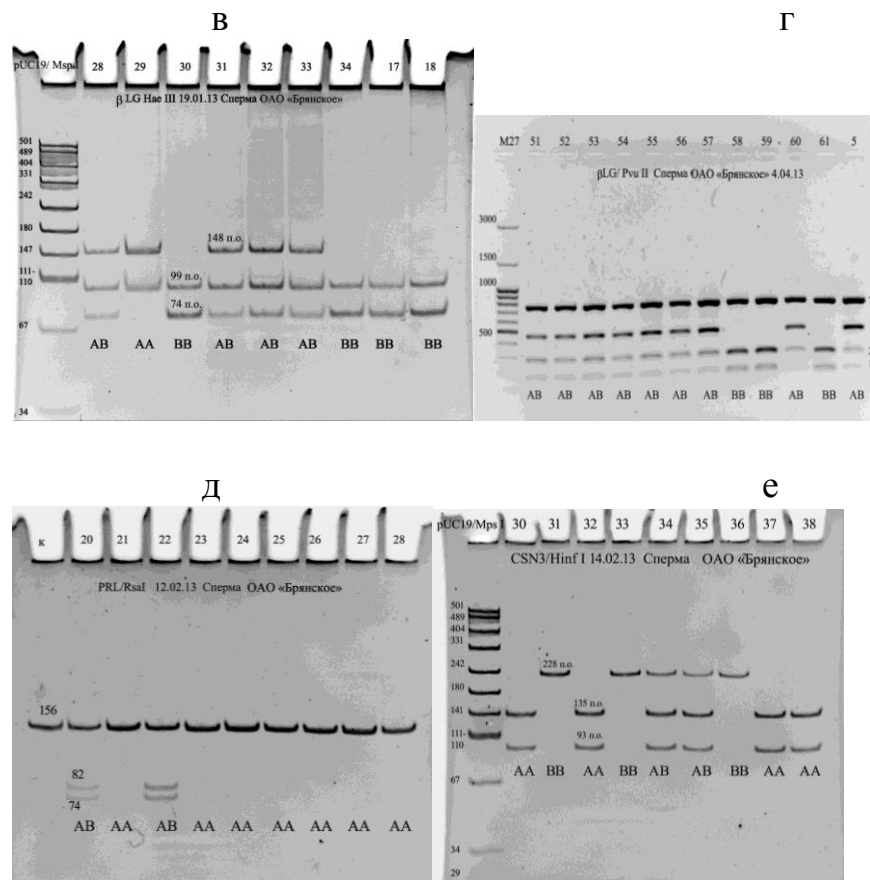


Рис. 9 Электрофоретический анализ продуктов рестрикции при определении генотипа по исследуемым генам: а – GH по MspI-маркеру; б - GH по AluII-маркеру; в – β-лактоглобулин по Medra; г- β-лактоглобулин по Гладырь; д- PRL; е – CSN3. Генотипы образцов указаны на иллюстрациях

Обобщенные данные по аллельному полиморфизму этих генов представлены в таблице 5.

Из данных таблицы видно, что для каждого исследуемого молекулярного маркера, обнаружено по два альтернативных аллельных варианта, включая гены, для которых показано существование других более редких аллелей (каппа-казеин, лактоглобулин). Кроме быков красно-пестрой и абердин-ангусской пород, представленных слишком малой выборкой, у всех остальных пород имеются оба аллельных варианта изучаемых генов в разных соотношениях.

По обоим молекулярным маркерам гена соматотропина наблюдается самая сильная неравномерность по частотам аллелей: «-» и V аллели представлены гораздо реже, чем «+» и L аллели. Аллельные варианты генов пролактина, каппа-казеина и β-лактоглобулина представлены в целом более равномерно. Интересно отметить, что у быков черно-пестрой породы частота В аллеля гена каппа-казеина, определяющего пригодность молока для сыроделия, составляет 26%, в то время как у коров в некоторых племенных хозяйствах Брянской области этот аллель вообще отсутствует (Дроздов, 2013).

Можно отметить, что брянские быки, изученные в данной работе, являются носителями несколько более низкого потенциала молочной продуктивности по сравнению с быками ОАО «Невское» и быками из Беларуси (приложение), обладая при этом более высоким соотношением аллелей устойчивости и чувствительности. Складывается



впечатление, что между устойчивостью к лейкозу и молочной продуктивностью имеется обратная связь. Но по данным Сацука (2009) и Мачульской (2009), наибольшей продуктивностью обладают животные с УЧ генотипами, различия между носителями только У или Ч аллелей на фоне нейтральных не достоверна. Поэтому можно предположить, что повышенная частота аллелей чувствительности у быков – улучшателей голштинской породы объясняется изначальной генетической узостью быков этой породы.

Изучение аллельного полиморфизма генов, связанных с молочной продуктивностью и качеством молока, показало наличие значительного разнообразия этих генов у быков производителей. В частности, частота В-аллеля каппа-казеина у быков черно-пестрой породы ОАО «Брянское» составляет около 25% при практически полном отсутствии в изученных стадах коров черно-пестрой породы Брянской области (Дроздов, 2013). Это обеспечивает определенные возможности для подбора производителей с учетом улучшения аллельного состава генов, связанных с продуктивностью и качеством молока, особенно в хозяйствах, снабжающих заводы по производству сыров и молочнокислых продуктов.

При анализе аллельного полиморфизма генов  $\beta$ -лактоглобулина быков-производителей разных пород ОАО «Брянское» были использованы две альтернативные методики, которые позволяют определять одни и те же А и В аллели, но по разным сайтам мутаций, поскольку эти аллели отличаются сразу по двум аминокислотным заменам. Полное совпадение результатов наблюдается только для симментальской породы (n=9), а для всех остальных пород у отдельных особей разные методики дают противоречащие результаты. Эти данные подтверждают полученные ранее на более репрезентативных выборках коров результаты, свидетельствующие о рекомбинационном расщеплении двух данных мутаций и, соответственно, о существовании еще двух аллелей (Дроздов, 2013).

В целом можно заключить, что использование молекулярно – генетических подходов, наряду с традиционными требованиями племенного дела, открывает дополнительные возможности для оздоровления животных и повышения их продуктивности.

## ВЫВОДЫ

1. Проведен молекулярно – генетический анализ ДНК спермы у трех групп быков-производителей черно-пестрой голштинизированной породы из Брянской области, Ленинградской области и Беларуси, а также небольших выборок быков других пород из ОАО «Брянское», исследован аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3, ответственного за устойчивость к вирусу лейкоза КРС, и генов, связанных с молочной продуктивностью. Обнаружено в общей сложности 24 аллеля гена BoLA-DRB3 и 17 из них у черно-пестрой породы, а также все парные аллели изучаемых генов молочной продуктивности.

2. В аллельных спектрах гена BoLA-DRB3 быков черно-пестрой-голландской породы преобладают аллели чувствительности к вирусу лейкоза КРС. Их частота увеличивается с ростом степени голштинизации и потенциала продуктивности (60 – 71%), а доля аллелей устойчивости падает (19 – 8,3%).

3. С увеличением уровня голштинизации также связано явление аллельного сужения – аллельное разнообразие гена BoLA-DRB3 уменьшается с 15 (у быков ОАО «Брянское») до 9 аллелей (у быков ЖодиноАгроПлемЭлита»). Аллельное сужение может привести к ослаблению потенциала устойчивости к различным болезням.

4. У быков-производителей других пород наблюдается преобладание нейтральных аллелей гена BoLA-DRB3 (44 – 87%, против 21% у черно-пестрой), при этом частота аллелей устойчивости почти 25% (кроме абердин-ангусской), а минимальная частота генов восприимчивости - 5% у швицкой. У четырех быков абердин-ангусской породы аллелей устойчивости не обнаружено.

5. Аллельный анализ генов, связанных с продуктивностью и качеством молока, позволил выявить все парные аллели для каждого изучаемого гена при соотношении частот аллелей от 1:9 до 1:1, кроме красно-пестрой и абердин-ангусской пород с очень маленькой выборкой (n=4).

### **ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ**

Молекулярно-генетический анализ быков производителей по маркерам хозяйственно-важных признаков позволяет расширить возможности традиционной селекционно-племенной работы в животноводческих хозяйствах.

Результаты, полученные при выполнении данной работы целесообразно использовать при разработке плана мероприятий для оздоровления хозяйств Брянской области от вирусного лейкоза крупного рогатого скота и повышении его продуктивности, в частности, предлагается:

1. В хозяйствах, благополучных в отношении вируса лейкоза, подбирать сперму быков – производителей так, чтобы избегать чрезмерного накопления аллелей чувствительности и поддерживать при этом по возможности больший уровень ЧУ генотипов и разнообразие нейтральных аллелей.

2. В хозяйствах, где требуется оздоровление от вируса лейкоза, проводить на период оздоровления от вируса насыщение поголовья аллелями устойчивости при уменьшении частот аллелей восприимчивости, используя для этого сперму быков с УУ и УН генотипами, для чего необходимо проводить поиск быков с генотипом УУ.

3. В связи с тем, что в некоторых хозяйствах Брянской области, в том числе имеющих цеха по переработке молока, отсутствуют коровы с В-аллелем каппа-казеина, планировать племенную работу таким образом, чтобы увеличить их частоту. Это позволит повысить выход творожного сгустка и качество сырной продукции.

Таблица 5. Генетическая структура быков разных пород ОАО «Брянское» по генам GH, βLG, PRL, CSN3

Порода быков	Частоты аллелей и генотипов																													
	Соматотропин по MspI-маркеру					Соматотропин по AluII-маркеру					β-лактоглобулин по Medrano					β-лактоглобулин по Гладырь					Пролактин					Каппа-казеин				
	+/+	+/-	-/-	+	-	LL	LV	VV	L	V	AA	AB	BB	A	B	AA	AB	BB	A	B	AA	AB	BB	A	B	AA	AB	BB	A	B
Чернопестрая	0,76	0,24	-	0,88	0,12	0,72	0,28	-	0,86	0,14	0,1	0,55	0,35	0,38	0,62	0,14	0,52	0,34	0,4	0,6	0,62	0,35	0,03	0,79	0,21	0,62	0,24	0,14	0,74	0,26
Hobs	0,24				0,28					0,55					0,52					0,35					0,24					
Hex	0,21				0,24					0,47					0,48					0,33					0,38					
χ <sup>2</sup>	0,004				0,007					0,014					0,003					0,0012					0,0516					
симментальская	0,67	0,33	-	0,83	0,17	0,56	0,33	0,11	0,72	0,28	-	0,78	0,22	0,39	0,61	-	0,78	0,22	0,39	0,61	0,78	0,22	-	0,89	0,11	0,22	0,45	0,33	0,44	0,56
Hobs	0,33				0,33					0,78					0,78					0,22					0,45					
Hex	0,28				0,4					0,48					0,48					0,2					0,49					
χ <sup>2</sup>	0,009				0,012					0,188					0,188					0,002					0,0033					
швицкая	0,8	0,2	-	0,9	0,1	0,7	0,3	-	0,85	0,15	0,3	0,5	0,2	0,55	0,45	0,3	0,6	0,1	0,6	0,4	0,6	0,4	-	0,8	0,2	0,3	0,5	0,2	0,55	0,45
Hobs	0,2				0,3					0,5					0,6					0,4					0,5					
Hex	0,18				0,26					0,5					0,48					0,32					0,5					
χ <sup>2</sup>	0,002				0,006					0					0,03					0,02					0					
краснопестрая	0,5	0,5	-	0,75	0,25	1	-	-	1	-	-	0,75	0,25	0,37	0,63	-	0,5	0,5	0,25	0,75	0,5	0,5	-	0,75	0,25	1	-	-	1	-
Hobs	0,5				-					0,75					0,5					0,5					-					
Hex	0,38				-					0,47					0,38					0,38					-					
χ <sup>2</sup>	0,038				-					0,167					0,038					0,038					-					
Аббердин-ангусская	1	-	-	1	-	0,75	0,25	-	0,88	0,12	-	-	1	-	1	-	0,25	0,75	0,12	0,88	0,25	0,75	-	0,63	0,37	1	-	-	1	-
Hobs	-				0,25					-					0,25					0,75					-					
Hex	-				0,21					-					0,21					0,47					-					
χ <sup>2</sup>	-				0,008					-					0,008					0,167					-					

## Список публикаций

1. \* Смазнова И.А., Козлов А.Л., Заякин В.В., Нам И.Я. Аллельный анализ гена *BOLA-DRB3* в стадах крупного рогатого скота Брянской области // Вестник Брянского государственного университета. 2010. №4: Точные и естественные науки. Брянск: РИО БГУ. С.227-232.
2. Смазнова И.А., Кожевина О.А., Козлов А.Л., Заякин В.В., Нам И.Я. Изучение генетической устойчивости к лейкозу крупного рогатого скота методом ПЦР-ПДРФ: на примере популяции КРС Брянской области // Сборник трудов первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». Санкт-Петербург. 2010. С.249-251.
- 3.\* Смазнова И.А., Козлов А.Л., Заякин В.В., Нам И.Я. Анализ полиморфизма гена *BOLA-DRB3* у симментальской породы крупного рогатого скота // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. т. 13, №5(3) С.248-250.
4. Смазнова И.А., Немцова К.Н., Заякин В.В., Нам И.Я. Анализ генетического потенциала племенных быков Брянской области по гену *BoLA-DRB 3* // Факторы экспериментальной эволюции организмов. Сборник научных трудов. Киев: Логос. 2013 т.13 С. 99-105.
5. Смазнова И.А., Нам И.Я., Заякин В.В., Козлов А.Л. Полиморфизм гена *BoLA-DRB3* у коров разных пород Брянской области // Научное обеспечение инновационного развития животноводства. Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции. 24-25 октября. 2013 Жодино с. 144-146
6. Смазнова И.А., Аксенова Е.Н., Козлов А.Л. Анализ генетического разнообразия крупного рогатого скота разных пород Брянской области и Беларуси по гену *BOLA-DRB3*, кодирующему устойчивость КРС к лейкозу // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Трансфер инновационных биотехнологий в растениеводстве, животноводстве, медицине, экологии». Брянск 2012 г., изд. БГУ.
7. \*\* Nam I.Ya., Zayakin V.V., Smaznova I.A., Egiazaryan A.V., Sulimova G.E., Sheiko I.P., Budevich A.I. High Genetic Susceptibility to Leukemia in Breeding Black Pied and Holstein Cattle // Middle-East Journal of Scientific Research. 2014. V.20 (10).P. 1297-1301

\* Журналы, рекомендованные ВАК.

\*\* Статья, опубликованная в изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus.

Автор приносит глубокую благодарность научным руководителям д.б.н. Нам Ирине Ян Гуковне и Заякину Владимиру Васильевичу за помощь в работе, неизменный интерес и доброжелательное отношение.