

АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ВРХ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ЩОДО ВДОСКОНАЛЕННЯ ПОКАЗНИКІВ МОЛОЧНОЇ ПРОДУКТИВНОСТІ

Н.Б. Новак, к.с.-г.н., ДП «Укрметртестстандарт»

Р.В. Облап, к.б.н., Білоцерківський національний аграрний університет

Проведено комплексний аналіз генетичної структури поголів'я української чорно-рябої молочної худоби за 8 генами кількісних ознак, асоційованих з показниками молочної продуктивності ВРХ. Розроблено біотехнологічні підходи щодо вдосконалення показників молочної продуктивності корів за рахунок використання генетичного потенціалу тварин.

Ключові слова: велика рогата худоба, гени кількісних ознак, ДНК-маркери.

Вступ. Збільшення виробництва молока та яловичини залишається актуальною проблемою для України та багатьох країн світу. Одним з найважливіших шляхів її розв'язання є виведення нових високопродуктивних порід великої рогатої худоби (ВРХ), стійких до захворювань та адаптованих до місцевих умов утримання [1-3]. Цілеспрямоване створення таких порід ВРХ можливе за наявності знань щодо функціонування генів, які контролюють ознаки продуктивності. Сучасні біотехнологічні і молекулярно-біологічні методи дають можливість проводити комплексний аналіз генетичної структури й виявляти господарсько-цінні генотипи, які напряму пов'язані з кількісними та якісними показниками продуктивності, і використовувати отриману інформацію для вирішення конкретних селекційних завдань [4-6]. Одним із найбільш ефективних методів дослідження генетичної структури тварин є метод з використанням молекулярно-генетичних маркерів.

Серед широкого різноманіття наявних молекулярно-генетичних методів дослідження спадкового матеріалу, для оцінки генофонду тварин, перевагу надають методу полімеразної ланцюгової реакції з поліморфізмом довжин рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ) та ПЛР в реальному часі (ПЛР-РЧ) [6,7].

Мета роботи – розробка біотехнологічного підходу до вирішення проблеми генетичного вдосконалення та покращення показників продуктивності ВРХ; оцінка генетичного потенціалу чорно-рябої молочної породи; виявлення кореляційних зв'язків між генофондом та показниками молочної продуктивності корів для вдосконалення селекційного процесу у тваринницьких господарствах України.

Матеріали і методи дослідження. Досліджували чистопорідне поголів'я української чорно-рябої молочної породи (251 голова).

Для аналізу генів кількісних ознак ВРХ, які пов'язані з молочною продуктивністю, використовували метод ПЛР-ПДРФ [8]. Всього досліджено вісім локусів: два гени – κ -казеїн і β -лактоглобулін, які кодують білки молока й регулюють його вихід та процент вмісту жиру. Три

гени, які кодують гормони – гормон росту, пролактин і гіпофізарно-пов'язаний фактор транскрипції Pit1. Перші два задіяні в процесах лактогенезу та експресії генів молока, Pit1 – регуляції експресії генів гормону росту і пролактину. Фактор транскрипції STAT5A, як посередник активації генів білків молока пролактином та гормоном росту. Гени лептину і ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази 1 – як регулятори енергетичного метаболізму та синтезу тригліцеридів [6,9].

Для встановлення кореляційних зв'язків між генотипами досліджених QTL та показниками молочної продуктивності тварин досліджено вміст жиру та білка в молоці. Відбір проб молока і їх підготовку до аналізу здійснювали згідно з ГОСТ 13928. Визначення масової частки жиру згідно ГОСТ 5867-90 (кислотний метод, СТ СЭВ 3838-82) та білка в молоці згідно ГОСТ 25179-82 (колориметричний метод).

Статистичну обробку результатів здійснювали шляхом аналізу розподілу алельних та генотипових частот, рівня гетерозиготності, відхилення від стану рівноваги відповідно до закону Харді-Вайнберга, кореляційним і регресійним аналізом, проведеним із використанням статистичних програм «POPGENE 1.32», «MINITAB 14» та «STATISTICA 7» (ANOVA).

Результати та обговорення. Для аналізу генетичної структури поголів'я української чорно-рябої молочної породи досліджували поліморфізм генів κ -казеїну, β -лактоглобуліну, пролактину, лептину, гормону росту, PIT1, STAT5A, та DGAT1. За всіма 8-ми молекулярно-генетичними маркерами виявлено поліморфізм (табл.1). За локусами κ -казеїну (CSN κ) і β -лактоглобуліну (BLG) визначено 2 основних алельних варіанти, типових для європейських порід ВРХ – А та В; за локусом пролактину (PRL) – алельні варіанти Prl A і Prl G; за гормоном росту (GH) – алельні варіанти Gh L й Gh V; за локусом лептину (LEP) – генетично детерміновані алельні варіанти Lер A, Lер B та рідкісний алель Lер C. Локуси DGAT1, PIT1 і STAT5A також відзначались наявністю двох алельних варіантів – А і К, А і В та С і Т.

Таблиця 1. Розподіл алельних частот, гетерозиготність та χ^2 за генами кількісних ознак

Локус, алель	Частота	Гетерозиготність		χ^2	P
		H_o	H_e		
к-казеїн A B	0,894	0,203	0,189	1,387	0,239
	0,106				
β -лактоглобулін A B	0,361	0,474	0,462	0,172	0,678
	0,639				
Пролактин A G	0,119	0,239	0,211	4,540	0,033
	0,881				
Гормон росту L V	0,815	0,307	0,303	0,051	0,821
	0,185				
Лептин A B C	0,753	0,462	0,403	17,453	0,001
	0,137				
	0,110				
DGAT1 A K	0,683	0,426	0,434	0,073	0,786
	0,317				
PIT-1 A B	0,163	0,263	0,274	0,404	0,525
	0,837				
STAT5A C T	0,217	0,434	0,341	19,103	0,000
	0,783				

На підставі алельних частот розраховано основні показники генетичної мінливості, зокрема – гетерозиготність (H), ефективну кількість алелей (n_e), інформаційний індекс Шеннона (I) та індекс фіксації Райта (F_{is}). Розподіл алельних частот у дослідженій групі тварин, в основному, відповідав очікуваному (відповідно до закону Харді-Вайнберга), за винятком локусів пролактину, лептину і STAT5A. Найвищий рівень спостережуваної гетерозиготності (H_o) зафіксовано за локусом β -лактоглобуліну (47,4%), найменший – локусом к-казеїну – 20,3%. Статистично достовірні відмінності між спостережуваною і очікуваною гетерозиготністю в дослідженій групі тварин ВРХ виявлено за трьома локусами – пролактину ($P < 0,05$), лептину і STAT5A ($P < 0,001$), які характеризувались надлишком гетерозигот. Встановлено, що спектр показника n_e знаходився в межах від 1,233 (кCSN) до 1,856 (BLG). Значення індексу I варіювали від 0,377 до 0,729, і були співрозмірні зі значеннями показника n_e . Найменше значення зафіксовано за локусом кCSN, найбільше – LEP. Розрахунок індексу фіксації Райта F_{is} , що відображає інбридинг особини відносно популяції, також показав наявність надлишку гетерозигот за локусами STAT5A ($F_{is} = -0,277$), лептину ($F_{is} = -0,149$) та пролактину ($F_{is} = -0,136$).

Отже, оцінка основних параметрів генетичної різноманітності показала, що у поліморфному стані перебуває 100% проаналізованих локусів. Середнє число алелей на локус становить 2,13, ефективне число алелей – 1,51, середня спостережувана та середня очікувана гетерозиготність дорівнюють 0,351 і 0,327, відповідно. Виявлено високу частоту зустрічання господарсько цінних алелей за локусами β -лактоглобуліну (Blg B – 0,639), гормону росту (Gh L – 0,815), ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази 1 (Dgat1 A – 0,683), факторів транскрипції PIT-1 (Pit1 B –

0,837) та STAT5A (Stat5A T – 0,783).

Для порівняльної характеристики показників молочної продуктивності та встановлення кореляційних зв'язків з генами кількісних ознак у тварин української чорно-рябої молочної породи в 2007–2008 рр. визначали наступні показники – жирномолочність молока (%), вміст загального білка (%), надій за 305 днів лактації, масову частку молочного жиру та білка за лактацію (кг).

Згідно з методикою досліджень на відмінність, однорідність та стабільність порід ВРХ, нами проведено аналіз розподілу тварин за надоем, вмістом жиру і білка в молоці. Отримані результати свідчать, що серед наявного поголів'я 19,1% тварин характеризується високим і надзвичайно високим виходом молока, 45,8 – середнім, 25,5 – низьким і 9,6% – надзвичайно низьким. Високим відсотком жирномолочності (> 4%) характеризувалися 11,1% популяції тварин, середнім – 59,4 і низьким (< 3%) – 29,5%. За вмістом білка в молоці тварин української чорно-рябої молочної породи поділили на дві групи. Тварини з відносно низькою масовою часткою білка в молоці (< 3%) склали 41,8%, високим (> 3%) – 58,2%.

Для розробки селекційної програми господарства на перспективу, з метою консолідації показників молочної продуктивності, зокрема вмісту загального білка і жиру, з'ясовували напрям і величину взаємозв'язків між основними селекційними показниками. Зокрема, розраховано кореляцію між показниками молочної продуктивності корів та дослідженими генами кількісних ознак, що напряму чи опосередковано пов'язані з ознаками молочної продуктивності (табл.2).

Встановлено, що за умов зростання надою корів збільшується кількість молочного жиру і молочного білка. Коефіцієнти кореляції між цими показниками становили 0,793 та 0,962 ($P < 0,001$). Також високу позитивну кореляцію ($r = 0,727$;

$P < 0,001$) виявлено між кількістю отриманого молочного жиру і білка. Низька позитивна кореляція між надоем та вмістом білка в молоці корів ($r = 0,140$) дає змогу ефективніше вести селекцію тварин у напрямі збільшення виходу молока і вмісту в ньому загального білка. Високий ступінь кореляції було встановлено між генотипами гена

DGAT1 та масовою часткою жиру ($r = 0,748$, $P < 0,001$) і білка в молоці ($r = -0,629$, $P < 0,001$). Обернену кореляційну залежність виявлено між геном STAT5A та кількістю загального білка ($r = -0,632$, $P < 0,001$) і виходом молока за лактацію ($r = -0,633$, $P < 0,001$).

Таблиця 2. Кореляція між показниками молочної продуктивності корів та дослідженими генами кількісних ознак (r)

Показники	Жир, %	Білок, %	Надій, кг	Жир, кг	Білок, кг
Жир, %					
Білок, %	-0,484***				
Надій, кг	-0,141*	0,140*			
Жир, кг	0,466***	-0,152*	0,793***		
Білок, кг	-0,200**	0,327***	0,962***	0,727***	
κ-казеїн	-0,103	0,028	-0,068	-0,111	-0,050
β-лактоглобулін	-0,105	0,104	-0,044	-0,098	-0,031
Гормон росту	0,078	-0,026	0,009	0,043	0,005
Лептин	-0,100	0,202**	0,023	-0,031	0,047
PIT1	0,007	-0,017	-0,055	-0,039	-0,050
Пролактин	0,067	-0,085	-0,038	0,009	-0,040
DGAT1	0,748***	-0,629***	-0,219***	0,240***	-0,305***
STAT5A	0,278***	-0,250***	-0,633***	-0,386***	-0,632***

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

Таким чином, оцінка основних характеристик молочної продуктивності тварин української чорно-рябої молочної породи показує, що вони відзначаються відносно високим вмістом білка в молоці за середнього рівня надою та жирномолочності. Подальша племінна робота в господарстві має бути спрямована на підвищення жирномолочності і збільшення надоїв молока за рахунок отримання тварин з бажаними генотипами генів DGAT1 та STAT5A.

Висновки. На прикладі української чорно-рябої молочної породи ВРХ розроблено біотехнологічні підходи, щодо комплексної оцінки генетичного потенціалу тварин.

Досліджено генетичну структуру української чорно-рябої молочної породи ВРХ за вісьмома молекулярно-генетичними маркерами кількісних ознак, які пов'язані з молочною продуктивністю. Виявлено високу частоту зустрічання господарсько цінних алелей за локусами β-лактоглобуліну, гормону росту, ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази 1, факторів транскрипції Pit-1 та STAT5A. Встановлено високий рівень генетичної мінливості дослідженої породи ВРХ. Виявлено,

що у поліморфному стані перебуває 100% проаналізованих локусів, середнє число алелей на локус становить 2,13, ефективне число алелей – 1,51, середня спостережувана та середня очікувана гетерозиготність дорівнюють відповідно 0,351 і 0,327.

Встановлено кореляційний зв'язок між масовою часткою жиру в молоці ($r = 0,748$, $P < 0,001$), масовою часткою білка в молоці ($r = -0,629$, $P < 0,001$) та генотипом КК гена ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази 1. Встановлено обернену кореляційну залежність між генотипом ТТ гена фактора транскрипції STAT5A, кількістю загального білка ($r = -0,632$, $P < 0,001$) і виходом молока за лактацію ($r = -0,633$, $P < 0,001$). Виявлені залежності засвідчують можливість використання даних кореляційних зв'язків для подальшого вдосконалення селекційного процесу та отримання високопродуктивних тварин української чорно-рябої молочної породи за рахунок проведення селекції в напрямі виведення тварин з генотипами АА або КК за локусом DGAT1 та ТС за локусом STAT5A.

Список використаної літератури:

1. Безуглий М. Д. Розвиток біотехнології відтворення сільсько-господарських тварин / М. Д. Безуглий, О. Є. Гузеватий // Вісник аграрної науки. – 2006. – № 12. – С. 83-86.
2. Зубець М.В. Генетика і селекція у скотарстві / М.В. Зубець, В.П. Буркат, М.Я. Єфіменко, Ю.П. Полупан // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – К.: Логос, 2001. – Т. 4. – С. 181-198.
3. Вінничук Д. Т. Шляхи створення високопродуктивного стада / Д. Т. Вінничук, П. М. Мережко. – К.: Урожай, 1991. – 240 с.
4. Williams J.L. The use marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology / Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. – 2005. – 24 (1). – P. 379-391.
5. Dybus A. Zależności pomiędzy polimorfizmem wybranych genów bydła czarno-białego a cechami użytkowości mlecznej: rozprawa doktorska / A. Dybus. – Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, 2001

6. Глазко В. И. ДНК-технологии / В. И. Глазко – К. : Аграрная наука. – 1997. – С. 25–48.
7. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др. – Бином. Лаборатория знаний. – 2009. – 223 с.
8. Методичні рекомендації щодо використання методу полімеразної ланцюгової реакції в скотарстві: Методичні рекомендації / Р.В. Облап, Н.Б. Новак, М.Д. Мельничук, Т.М. Димань, О.В. Дубін. – Біла Церква: Видавництво БНАУ, 2010. – 68 с.
9. Новак Н.Б. Аналіз поліморфізму генів кількісних ознак, пов'язаних з молочною та м'ясною продуктивністю, в ряді порід ВРХ України / Н.Б. Новак, Р.В. Облап, М.Д. Мельничук // Збірник наукових праць Українського товариства генетиків та селекціонерів ім. М.І. Вавилова "Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології". – 2007. – Т.1. – С. 284–288.

Выполнен комплексный анализ генетической структуры поголовья украинской черно-пестрой молочной породы КРС по 8 генам количественных признаков связанных с показателями молочной продуктивности животных. Разработаны биотехнологические подходы по улучшению показателей молочной продуктивности скота за счет использования генетического потенциала животных.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, гены количественных признаков, ДНК-маркеры

The complex analysis of genetic structure of ukrainian black-white breed of milk cattle for eight quantitative traits genes which are associated with milk productive traits were done. Biotechnological approaches for improving of traits of cattle milk production were performed.

Key words: cattle, genes of quantitative traits, DNA-markers.

Дата надходження в редакцію: 5.11.2012 р.

Рецензент: д.с.г.н., професор Л.М.Хмельничий

УДК 636. 034. 082. 018

МОРФОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ТЕЛИЦЬ УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ

М.І. Кузів, к.с.-г.н., Інститут біології тварин НААН

Є.І. Федорович, д.с.-г.н., Інститут біології тварин НААН

Н.М. Кузів, к.с.-г.н., нститут біології тварин НААН

Наведені результати досліджень морфологічних та біохімічних показників крові телиць української чорно-рябої молочної породи в різні вікові періоди. Встановлено, що з віком тварин ці показники дещо змінювалися: вміст загального білка в сироватці крові, кількість еозинофілів і сегментоядерних нейтрофілів збільшувалися, вміст глюкози, кількість лімфоцитів, резервна лужність, активність аспартат- і аланінамінотрансфераз знижувалися, а кількість еритроцитів, лейкоцитів, та вміст гемоглобіну в крові мали хвилеподібний характер.

Ефективна племінна робота вимагає знань не тільки загальних закономірностей фізіології організму, що розвивається, а й породних особливостей інтер'єрних показників тварин. Останніми роками ведеться інтенсивний пошук допоміжних біологічних тестів, які дали б можливість прискорити і підвищити точність зоотехнічних прийомів і методів оцінки конституції, продуктивних і племінних якостей тварин. Цим вимогам повністю відповідає кров – одна із важливих систем, що характеризує інтер'єр тварин [4, 5, 10, 11].

Склад крові відзначається відносною постійністю, що забезпечує збереження видових, породних та індивідуальних особливостей тварин. Але поряд з цим він досить лабільний, що дозволяє використовувати його в якості важливого механізму адаптації до змін умов життя. Морфологічні та біохімічні показники крові є важливим критерієм, що відображає загальну будову організму, його конституційні особливості, фізіологічний

стан і до певної міри характеризує обмін речовин [4].

Матеріали і методи. Дослідження проведені в динаміці на 39 телицях української чорно-рябої молочної породи в Сокальському відділенні ТзОВ «Молочні ріки» Львівської області.

Для дослідження морфологічних та біохімічних показників кров брали з яремної вени до ранішньої годівлі у 3-; 6-; 9-; 12-; 15- та 18-місячних телиць. Для отримання сироватки проби крові центрифугували. Загальний білок визначали рефрактометрично, концентрацію гемоглобіну та кількість еритроцитів – за допомогою фотоелектроколориметра, кількість лейкоцитів – шляхом підрахунку в камері Горяєва, лейкоцитарну формулу – за загальноприйнятою методикою, вміст глюкози – глюкозооксидазним методом, резервну лужність – за методикою Неводова в модифікації Міловідова [2, 3, 7].

Активність аспартатамінотрансферази та