

УДК 636.2.034.636.087.7

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА MC1R С ОКРАСКОЙ ШЕРСТНОГО ПОКРОВА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЯСНЫХ ПОРОД

В. В. Пешко, О. А. Епишко, Т. М. Коптевич

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by)

Ключевые слова: ген MC1R, ПЦР-ПДРФ, генотип, аллель, окраска шерстного покрова.

Аннотация. В статье представлена методика определения полиморфизма гена MC1R с помощью метода ПЦР-ПДРФ-анализа. Дана характеристика генетической структуры популяций крупного рогатого скота мясных пород (лимузинская, герефордская, абердин-ангусская), содержащегося в сельскохозяйственных предприятиях Республики Беларусь, по гену меланокортинового рецептора 1 типа. Установлен полиморфизм гена меланокортинового рецептора 1 типа, представленный двумя аллелями – MC1R^E и MC1R^e. Идентифицировано три генотипа: MC1R^{EE}, MC1R^{Ee} и MC1R^{ee}.

ASSOCIATION OF MC1R GENE POLYMORPHISM WITH PAINT WOOL COVER IN A CATTLE OF MEAT BREED

V. V. Peshko, O. A. Epishko, T. M. Koptevich

EI «Grodno state agrarian university»

Grodno, Republic of Belarus

(Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by)

Key words: MC1R gene, PCR-RFLP, genotype, allele, coat color.

Summary. The article presents a method for determining the polymorphism of the MC1R gene using the method of PCR-RFLP analysis. A characteristic of the genetic structure of the population of beef cattle (Limousine, Hereford, Aberdeen-Angus) contained in agricultural enterprises of the Republic of Belarus, on the gene of melanocortin receptor type 1. The gene polymorphism of the melanocortin receptor type 1, represented by two alleles – MC1R^E and MC1R^e, has been established. Three genotypes have been identified: MC1R^{EE}, MC1R^{Ee} and MC1R^{ee}.

(Поступила в редакцию 03.06.2019 г.)

Введение. Проведение селекционно-племенной работы и ее эффективность в молочном скотоводстве зависит от многих факторов: технологических (условия содержания, оптимальное кормление), средовых (создание условий для проявления генотипа в фенотипе) и гене-

тических (получение животных с высоким наследственным потенциалом). Поэтому племенная работа наряду с традиционными методами должна включать достижения в области генетики и биотехнологии животных.

В нашей стране одним из направлений совершенствования крупного рогатого скота является эффективная маркер-зависимая селекция, позволяющая вести отбор и подбор родительских форм на генном уровне, т. е. проводить селекцию по генотипу непосредственно на уровне ДНК, не учитывая изменчивость хозяйственно полезных признаков, обусловленную внешней средой и технологическими факторами, выявлять генетический потенциал животных в раннем возрасте, независимо от пола и своевременно оценивать признаки, которые фенотипически проявляются поздно.

В настоящее время основной задачей современного животноводства является получение высокопродуктивных животных, дающих высококачественную продукцию и, что немаловажно, отвечающих определенным критериям внешнего вида. Цвет шерсти является чрезвычайно важным фенотипическим признаком у животных.

До сих пор идентифицированные гены-кандидаты, которые оказывают значительное влияние на окраску у крупного рогатого скота, в основном кодируют факторы, находящиеся в меланоцитах. Парадоксальность ситуации, сложившаяся в генетике окрасов, состоит в том, что, несмотря на то, что история вопроса насчитывает много десятилетий, достаточно трудно интерпретировать молекулярно-генетическую природу формирования окраски шерстного волокна. Это нелегко сделать даже на стадии биосинтеза пигмента, находящегося непосредственно под генетическим контролем. Исключения составляют лишь мутации тирозиназного гена, поскольку активность этого фермента играет роль «узкого места» в синтезе меланинов. Цвет шерсти может быть сложным признаком, который связан со многими генами. Известно, что более 150 генов и 300 генетических локусов связаны с пигментацией и окрасом шерсти животных [2, 3, 8].

Племенное животноводство предъявляет определенные требования к внешнему виду сельскохозяйственных животных. Цвет шерсти является важной чертой для различения пород, поэтому важно расширить знания о генетическом фоне пигментации и использовать их в будущем для определения генетической картины породы. Цвет шерсти может быть сложным признаком, который связан со многими генами. MC1R (ген меланокортинового рецептора 1 типа) играет центральную роль в регуляции синтеза эумеланина (черная/коричневая окраска) и феоме-

ланина (красная/желтая окраска) в меланоцитах у крупного рогатого скота и кодируется локусом расширения – Extension (E).

Ген MC1R играет центральную роль в регуляции образования окраски шерсти животных. У крупного рогатого скота ген MC1R расположен на хромосоме 18 и состоит из одного экзона. Разнообразие цветовых окрасок шерстного покрова связано с наличием, распределением и биохимической активностью меланоцитов, в которых два типа меланинового пигмента. Меланины представляют собой пигменты с разной молекулярной массой, образованные ферментативным окислением аминокислоты тирозина, из которой синтезируются два вида пигментов: эумеланины и феомеланины. Эумеланины продуцируют черные/коричневые цвета, тогда как феомеланины производят красные/желтые цвета. Пигментация шерстного покрова в основном определяется распределением этих двух пигментов с образованием черного/коричневого и желтого/красного цветов соответственно. Доминантные аллели в локусе расширения (Extension E) индуцируют черную пигментацию, тогда как рецессивные аллели продлевают образование феомеланинов, определяя красную/желтую пигментацию [4, 7]. Тирозиназа – фермент, ограничивающий скорость и участвующий в синтезе обоих меланинов, регулируется гормоном стимулирующим меланоциты (α MSH). Этот гормон и некоторые другие меланотропные пептиды стимулируют образование меланина в меланоцитах путем связывания с рецептором меланокортина – 1 (MC1R), рецептором, связанным с G-белком, кодируемым геном Extension. Кроме того, количество эумеланина и феомеланина в меланоцитах контролируется геном Агути (ASP), который действует как антагонист передачи сигналов MSH через MC1R, даже если его механизм действия спорен. Опыты показали, что активация рецепторов приводит к увеличению черно-коричневой пигментации животных, а уменьшение рецепторной активности к увеличению красно-желтой пигментации. Выделяют три аллеля этого гена:

- доминантный черный аллель (E^D) происходит из-за T296C замены;
- рецессивный красный аллель (e) образуется в результате G-делеции (G310), которая приводит к нефункциональному рецептору и, следовательно, к низкому уровню тирозиназы, что приводит к образованию феомеланина;
- дикий тип (E^+) кодирует нормальный функциональный рецептор MSH (отсутствие 2 вышеупомянутых мутаций: T296C, G310) [2].

Доминантный черный (E^D) – доминирующий, животные с этим аллелем являются черными (сплошными или пятнистыми). Дикий тип

(E+) производит крупный рогатый скот с различной окраской (от красновато-коричневой до коричневато-черной). Две копии рецессивного красного (e) аллеля приведут к красному цвету. Другие гены ассоциированные с окраской шерстного покрова действуют как модификаторы этих базовых цветов, добавляя другие варианты. Стоит отметить, что у голштинского крупного рогатого скота могут присутствовать два других варианта, которые могут маскировать эффекты других аллелей MC1R. Они известны как «черный/красный» (красный цвет меняется на черный) и «красный вариант» (доминирующий красный цвет). Доминирующий красный переопределяет MC1R и производит доминирующий красный пигмент. Доминантный красный ген не зависит от MC1R [4, 5, 6, 7].

Цель работы – разработка методики определения полиморфизма гена MC1R методом ПЦР-ПДРФ-анализа и изучение генетической структуры популяции крупного рогатого скота мясных пород, содержащегося на сельскохозяйственных предприятиях Республики Беларусь.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в отраслевой научно-исследовательской лаборатории ДНК-технологий УО «Гродненский государственный аграрный университет». В качестве объекта исследований был использован генетический материал (ушной выщип) крупного рогатого скота (бычки) мясных пород: лимузинской (n=21, РУСП «Гродненское племпредприятие»), герефордской (n=22, СПК им. Деньщикова) и абердин-ангусской (n=78, РСУП «Олекшицы»).

ДНК-диагностику генотипов по гену MC1R проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Ядерную ДНК выделяли перхлоратным методом. Основные растворы для выделения ДНК, амплификации и рестрикции готовили по Т. Маниатису, Э. Фрич, Дж. Сэмбруку [1].

Для качественного проведения ПЦР важна не только концентрация геномной ДНК, но также и ее степень очистки, которая была определена с использованием современного спектрофотометра Implen P360 (при длине волны 260 нм). Оптимальная концентрация геномной ДНК, которой достаточно для проведения реакции, составила 100 нг/мкл. Степень очистки выделенной ДНК колебалась в пределах от 1,8 до 2,2. Нативность выделенной ДНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле по отсутствию «шлейфа» фрагментов ДНК, а также интенсивности свечения бромистого этидия в УФ свете на гель-документирующей системе GelDoc (BioRad, США).

Для амплификации участка гена MC1R использовали праймеры:

MC1R 1: 5' –GGA CCC TGA GAG CAA GCAC- 3'

MC1R 2: 5'- CTC ACC TTC AGG GAT GGTCTA- 3'

Реакционная смесь для амплификации общим объемом 20 мкл включала: ПЦР буфер 10-х, 25 mM MgCl₂, dNTP 2,0 mM, 30 пМ каждого праймера, 0,25 U Tag-полимеразы, 100 нг/мкл выделенной ДНК и H₂O до 20 мкл.

Для амплификации ПЦР использовали термоциклер C1000 Touch™ BIORAD с соответствующими температурными и временными профилями.

Режим амплификации MC1R:

x1: 95⁰C – 5 мин

x30: 94⁰C – 30 с, 57⁰C – 30 с, 72⁰C – 30 с

x1: 72⁰C – 10 мин.

Длина фрагмента гена MC1R – 296 п. н. Для рестрикции амплифицированного участка гена MC1R применяли эндонуклеазу MspI. Реакцию проводили при температуре 37⁰C. Продукты рестрикции разделяли электрофоретически в 3% агарозном геле (при напряжении 130 В) в TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе гель-документирования Gel Doc RX+ (BIORAD).

При расщеплении продуктов амплификации по гену MC1R идентифицировались следующие генотипы: EE (160; 136 п. н.), Ee (296; 160; 136 п. н.), ee (296 п. н.).

EE – 160; 136 п. н. (черная окраска шерстного покрова сплошная или черно-пестрая),

Ee – 296; 160; 136 п. н. (коричнево-черная либо красновато-коричневая окраска),

ee – 296 п. н. (красная окраска).

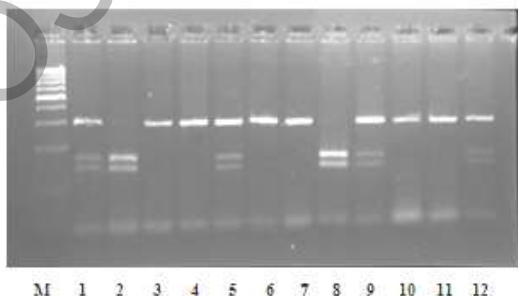


Рисунок – Электрофореграмма технического результата предложенного способа определения полиморфизма гена MC1R у крупного рогатого скота

Примечание – М-ДНК-маркер 100 п. н. (ОДО «Праймтех», Беларусь); 1, 5, 9, 12 – генотип Ee; 3, 4, 6, 7, 10, 11 – генотип ee; 2, 8 – генотип EE

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенных исследований в популяции крупного рогатого скота установлен полиморфизм гена меланокортинового рецептора I типа, представленный двумя аллелями – MC1R^E и MC1R^e. Идентифицировано три генотипа: MC1R^{EE}, MC1R^{Ee} и MC1R^{ee} (таблица 1).

Таблица – Частота встречаемости аллелей и генотипов по гену MC1R у крупного рогатого скота мясных пород

Порода	Частота встречаемости				
	аллелей		генотипов, %		
	MC1R ^E	MC1R ^e	MC1R ^{EE}	MC1R ^{Ee}	MC1R ^{ee}
Лимузинская (n=21)	0,024	0,976	–	4,8	95,2
Геррефордская (n=22)	0,341	0,659	13,6	40,9	45,5
Абердин-ангусская (n=78)	0,449	0,551	30,8	28,2	41,0

Анализ данных таблицы свидетельствует о том, что у бычков мясных пород частота встречаемости аллеля MC1R^E была на уровне от 0,024 (лимузинская) до 0,449 (абердин-ангусская). Более высокая частота встречаемости аллеля MC1R^e отмечена у бычков лимузинской (0,976) и геррефордской (0,659) пород. Среди протестированных животных чаще встречались особи с генотипом MC1R^{ee} (от 41,0% у абердин-ангусской до 95,2% у лимузинской породы). При этом среди бычков лимузинской породы животных с генотипом MC1R^{EE} не выявлено. Количество особей с генотипом MC1R^{Ee} составило 4,8-40,9%.

Представленные данные свидетельствуют о преобладании аллеля MC1R^e, что сигнализирует о низком уровне тирозиназы, приводящем к образованию феомеланина, который детерминирует красную/желтую пигментацию шерстного покрова у крупного рогатого скота.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований разработана методика проведения ПЦР-ПДРФ-анализа по выявлению полиморфизма гена меланокортинового рецептора I типа (MC1R), ассоциированного с окраской шерстного покрова у крупного рогатого скота. Подобран оптимальный режим, концентрация и объем реакционной смеси, режим амплификации и рестрикции.

Анализ распределения генотипов по гену MC1R в популяции крупного рогатого скота мясного направления продуктивности, содержащегося на сельскохозяйственных предприятиях Республики Беларусь, позволил установить преобладание животных с генотипом

MC1R^{ec} (от 41,0% абердин-ангусская порода до 95,2% лимузинская порода).

ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: «Мир». – 1984. – 480 с.
2. Preliminary study on MC1R polymorphism in some cattle breeds raised in Italy / P. Crepaldi [et. al.] / Ital. J. Anim. Sci., 2003. – 2 (Suppl. 1). – P. 13-15.
3. Hartatik, T. Sequence Analysis and Identification of Allele Distribution of Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Gene in Indonesian Cattle (*Bos sondaicus*×*Bos indicus*) / T. Hartatik / Asian. J. Anim. Sci., 2003. – 11 (Suppl. 1). – P. 40-46.
4. Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene / H. Joerg [et. al.] / Mamm. Genome, 1996. – 7. – P. 317-318.
5. Cosegregation between the chestnut coat colour in horses and polymorphisms at the melanocyte stimulating hormone (MSH) receptor locus / M. Johansson [et. al.] / Anim. Genet., 1994. – 25 (suppl. 2). – P. 35.
6. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination / H. Klungland, [et. al.] / Mamm Genome, 1995. – 6. – P. 636-639.
7. Pariset, L. A simple PCR-RFLP test for direct identification of Melanocortin Receptor 1 (MC1R) alleles causing red coat colour in Holstein cattle / L. Pariset, A. Valentini / Ital. J. Anim. Sci., 2016. – 2 (Suppl. 2). – P. 151-155.
8. New variants in the melanocortin 1 receptor gene (MC1R) in Asian cattle / Y. Zhang [et. al.] / Anim Genet., 2014. – 45 (4). – P. 609-610.

УДК 636.087.7:636.5:591.43

ВЛИЯНИЕ СКАРМЛИВАНИЯ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ «СУБАЛИН» НА ОРГАНЫ ПИЩЕВАРЕНИЯ ЦЫПЛЯТ- БРОЙЛЕРОВ

Л. И. Постернак

Винницкий национальный аграрный университет

г. Винница, Украина

(Украина, 21008, г. Винница, ул. Солнечная, 3; e-mail:

Posternak31@i.ua)

Ключевые слова: отрасль птицеводства, сельскохозяйственная птица, цыплята-бройлеры, кормовая добавка, субалин, полноценное кормление, линейные измерения, железистый желудок, мускульный желудок, рацион, контрольная группа, опытная группа, эффективность.

Аннотация. Улучшение потребления и повышение эффективности использования кормов, получение максимальной животноводческой производительности обеспечивается высоким уровнем сбалансированного кормления с использованием разных кормовых добавок. В связи с этим исследования по определению оптимальных уровней кормления цыплят-бройлеров современных кроссов являются актуальными и имеют важное народнохозяйственное значение. После проведения исследований на цыплятах-бройлерах кросса Кобб-500 с добавлением к основному рациону кормовой добавки «Субалин» в пределах