

4. Шейко, И. П. Свиноводство в Республике Беларусь / И. П. Шейко // Белорусское сельское хозяйство. – 2006. – № 2. – С. 12-15.
5. Шейко, И. Скрещивание специализированных мясных пород свиней Беларуси / И. Шейко // Свиноводство. – 2002. – № 5. – С. 4-5.
6. Шейко, И.П., Смирнов В.А. Свиноводство. -Мн.: Ураджай, 1997.- С.84-87.
7. Шейко, И.П. Репродуктивные, откормочные и мясные качества свиней породы дюрок при различных вариантах подбора родительских пар / И.П. Шейко, Т.Н. Тимошенко, Т.Л. Шиман // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2011. - № 1. – С. 74-80.
8. Anon, J. Crossbreeding programs for commercial pork production / J. Anon // Washington Agr. ext. Bull. – 1983. – Vol. 1232. – P. 1-6.

УДК636.2.082.2

ТЕХНОЛОГИЯ ДНК ТИПИРОВАНИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К НАСЛЕДСТВЕННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

О.А. Епишко, П.В. Пестис, С.Г. Змитревич, М.Ю. Шевченко

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 15.08.2013 г.)

Аннотация. Одними из наиболее значимых пороков, оказывающих негативное влияние на интенсификацию племенной и селекционной работы, являются дефицит уридинмонофосфатсинтазы (DUMPS) и комплексный порок позвоночника (СVM). Данная проблема актуальна и в животноводстве Беларуси в связи с интенсивной голштинизацией скота.

Summary. In foreign practice of cattle breeders the deficiency of DUMPS and CVM is considered to be one of the most significant defects rendering negative influence on an intensification of breeding and selection work, this problem is also actual in the animal husbandry of Belarus in connection with an intension golshthinization of cattle.

Введение. Одной из самых больших и важных проблем животноводства была и остается проблема недополучения здорового и жизнеспособного потомства. Использование искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов значительно повысило роль одного животного и одновременно риск в распространении определенных полиморфных типов генов генетических дефектов, что привело к насыщению популяций летальными мутациями. Поэтому на сегодняшний день возникла острая необходимость более широкого использования молекулярно-генетических маркеров как инструмента для решения некоторых селекционных задач, а в частности, выявления моногенных наследственных заболеваний, которые фенотипически могут быть вы-

явлены только у рецессивных гомозиготных носителей в ходе развития молодняка или на более позднем постэмбриональном развитии [1].

ДНК-тестирование ремонтного молодняка на наличие мутаций в раннем возрасте позволит выявить и скрытых носителей в гетерозиготном состоянии и не допустить распространение наследственных заболеваний в популяциях крупного рогатого скота, а тестирование быков-производителей и быкопроизводящих коров – исключить получение особей на стадии эмбрионального развития. Данные мероприятия позволяют оздоровить племенное поголовье Республики [3, 4].

Без использования генной диагностики выявление скрытых носителей возможно только при помощи анализирующего спаривания или с помощью биохимических тестов, результаты которых не всегда являются однозначными.

В зарубежной практике животноводов принято считать, что одними из наиболее значимых пороков, оказывающих негативное влияние на интенсификацию племенной и селекционной работы, являются дефицит уридинмонофосфатсинтетазы (DUMPS) и комплексный порок позвоночника (CVM). Данная проблема актуальна и в животноводстве Беларуси в связи с интенсивной голштинизацией скота.

Дефицит уридинмонофосфатсинтетазы (DUMPS) – моногенный аутосомнорецессивный признак. У крупного рогатого скота мутация фенотипически проявляется у гомозиготных особей, вызывая гибель эмбрионов после 40 дней эмбрионального развития. Этим самым оказывая отрицательное влияние на плодовитость животных. Только небольшой процент особей выживает, однако они погибают вскоре после рождения. Таким образом, своевременное выявление наследственного заболевания позволит выявить и в дальнейшем исключить носителей данного заболевания, что будет способствовать интенсификации племенной работы страны [5, 6].

Комплексный порок позвоночника (CVM) – широко распространенный рецессивный генетический порок голштинского скота. Две трети плодов-носителей данного заболевания резорбируются или погибают до 260 дня постнатального развития, одна треть телят-носителей мутации рождается мертворожденной обычно за 1-2 недели до ожидаемого срока отела. Только небольшой процент особей выживает, однако они погибают вскоре после рождения.

Международными племенными службами введены обязательные проверки быков-производителей на данные генетические дефекты и вносится запись в родословные племенных каталогов.

Проведенные сразу после разработки теста молекулярно-генетические исследования показали, что в Голландии 38,8% быков-произво-

дителей – скрытые носители данных мутаций, во Франции – 42,82%, в США – 20%, в Италии – 15,4%, в Канаде – 6,42%, в Германии – 7,15%, в Китае – 46,8% [7, 9].

Необходимо тщательно изучать родословную коров, чтобы избежать осеменения коров быками-производителями с теми коровами, родословная которых предполагает, что они могут быть носителями мутаций. Это поможет снизить распространение мутаций в стадах и предотвратить появление уродств в потомстве.

Российскими учеными было изучено распространение DUMPS и SVM среди быков-производителей, использующихся на племпредприятиях России, а также проанализировано происхождение таких животных. Данные свидетельствуют, что доля быков-носителей DUMPS и SVM на племпредприятиях России составляет 4-3,7% соответственно. Это означает, что в среднем 1 из 27 производителей, используемых в системе искусственного осеменения, является скрытым носителем этих наследственных дефектов [10].

Широкое распространение мутации DUMPS и SVM среди голштинского скота позволило предположить, что аллель, несущий мутацию, положительно коррелирует с признаками продуктивности, используемыми в качестве критериев в селекционных программах. Для подтверждения или опровержения этой гипотезы ученый Кюе с соавторами в 2005 г. изучили влияние носительства SVM на некоторые селекционно-значимые признаки продуктивности (удой, содержание жира и белка в молоке, длительность сервис-периода). Было исследовано около 3 млн. записей продуктивных параметров 1,7 млн. дочерей быков с известным генотипом по аллелю SVM. Была установлена положительная ассоциация несущего мутацию аллеля со всеми изучаемыми признаками. Поскольку различия по молочной продуктивности между дочерьми скрытых носителей и неносителей незначительны, исключение животных с мутированным аллелем из популяции скота существенно не повлияет на продуктивность [1, 2].

Кроме того, известны случаи, когда выдающиеся производители одновременно являются носителями нескольких мутаций наследственных заболеваний. Например, К.М. Белл 1667366 одновременно являлся носителем двух наследственных пороков SVM и BLAD, семя которого широко использовалось в 50-60-х годах для осеменения коров во многих странах. Только в США от Carlin-M Ivanhoe Bell получено 79 тысяч дочерей, оцененных по продуктивности, и более 1200 сыновей, оцененных по дочерям.

Логично предположить, что выдающиеся производители, которые широко используются в настоящее время, могут быть одновременно

носителями мутаций DUMPS и SVM. Однако данное предположение требует изучения для его подтверждения либо опровержения.

В связи с интенсивной голштинизацией молочного скота Беларуси также остро стоит проблема выявления скрытых носителей DUMPS и SVM.

Проведение исследований, направленных на разработку методов ДНК-анализа, позволяющих диагностировать мутации в генах, детерминирующих наследственные заболевания DUMPS и SVM, актуально и имеет большое народно-хозяйственное значение. Однако покупка лицензированных наборов для идентификации данных мутаций требует больших вложений, и встает вопрос о разработке более дешевого метода диагностирования животных по данным мутациям.

Цель исследований – разработать импортозамещающую технологию идентификации наследственных заболеваний дефицита уридинмонофосфатсинтетазы (DUMPS) и комплексного порока позвоночника (SVM), в популяциях крупного рогатого скота разводимого в Республике Беларусь.

Материалы и методика исследований. На базе УО «Гродненский государственный аграрный университет», в научно-исследовательской лаборатории ДНК-технологий проводятся исследования по разработке импортозамещающей технологии по идентификации наследственных заболеваний дефицита уридинмонофосфатсинтетазы (DUMPS) и комплексного порока позвоночника (SVM), крупного рогатого скота, разводимого в Республике Беларусь. Импортозамещающая технология предполагает использование не наборов, а отечественных реактивов, с помощью которых возможно удешевление себестоимости тестирования животного. Поэтому нашей задачей является разработка импортозамещающей технологии идентификации аномалий DUMPS (дефицит уридинмонофосфатсинтетазы) и SVM (комплексный порок позвоночника).

Результаты исследований и их обсуждение. Во многих странах в родословных быков указаны результаты тестирования на гетерозиготность по UMPS: DP-носитель мутации DUMPS, TD - свободный от мутации.

Для проведения амплификации гена UMPS нами были подобраны следующие последовательности праймеров:

F: 5-GCA AAT GGC TGA AGA ACA TTC TG-3"

R: 5-GCT TCT AAC TGA ACT CCT CGA GT-3"

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 10 мкл, включающая: вода -4,6 мкл; буфер ПЦР 5-х -2,0 мкл; dNTP смесь 10-х (1,7 мМ каждого) - 1,0 мкл, два праймера по - 0,4 мкл; Taq-полимераза

(1мол/1000 U) - 0,1 мкл; ДНК 70-100 нг - 1,5 мкл. Режим проведения ПЦР для гена UMPS: 45 циклов: (95 ° C - 30 сек.; 58 ° C -30 сек.; 72 ° C - 1 мин). Длина амплифицированного фрагмента 108 п.н.

Для анализа аллельных вариантов гена UMPS продукт амплификации обрабатывали рестриктазой AvaI в термостате на протяжении 3-х часов при температуре 37 ° C. Смесь для рестрикции готовили в объеме 15 мкл: вода - 6 мкл; буфер (10mM) - 1,5 мкл; рестриктазы Ava I - 0,5 мкл; ПЦР смесь -7 мкл. Разделение продуктов рестрикции проводили в 4%-ном агарозном геле (рис. 1).

	ПЦР	TD	DP
108	—		
89			—
53		—	—
36		—	—
19		—	—

Рисунок 1 – Схема расположения рестрикционных фрагментов гена UMPS в зависимости от генотипа при использовании рестриктазы Ava I

ПЦР – продукт амплификации; DP – носитель мутации DUMPS;
TD – нет мутации

У животных гетерозиготных носителей DUMPS оказывается четыре рестрикционных фрагмента: 89 п. н., 53 п.н., 36 п.н., 19 п.н., для животных свободных от мутации – три фрагмента: 53 п.н., 36 п.н., 19 п.н.

Идентификация аномалии CVM (комплексное позвоночное уродство). Данное заболевание вызвано точечной мутацией гена SLC35A3, которая заключается в замене нуклеотида G на T в позиции 559 гена, кодирующего белок-транспортер уридин 5'-дифосфат-N-ацетилглюкозамина и находится в 3-й хромосоме. В результате такой замены незаменимая аминокислота валин меняется на фенилаланин в позиции 180 [11].

В международных стандартах было принято решение о введении отметки в родословные племенных животных по наличию мутантного гена CVM: CV - носитель мутации, TB - свободный от мутации.

1. Для амплификации гена SLC35A3 мы использовали следующие праймеры:

F: 5-TCA GTG GCC CTC AGA TTC TC-3"

R: 5-CCA AGT TGA ATG TTT CTT ATC CA-3"

Смесь для проведения ПЦР готовили в объеме 10 мкл: вода -4,6 мкл; буфер ПЦР 5-х (15м Mg-1, 0 мл) -2,0 мкл; dNTP смесь 10-х (1,7 mM каждого) 1,0 мкл, два праймера (70 нг каждого) - 0,8 мкл; Taq-по-

лимеразы (1мол/1000 U) - 0,1 мкл; ДНК 70-100 нг - 1,5 мкл. Режим ПЦР для гена SLC35A3 включал: 35 циклов (94 °С - 30 сек., 60 °С - 30 сек; 72 °С - 30 мин). Длина продукта амплификации 177 п.н.

Продукт амплификации анализировали методом SSCP: денатурировали в буфере (формамид, NaOH, EDTA и два красителя: ксиленцианол и бромфеноловый синий) и наносили на 14% полиакриламидный гель. Три полосы на электрофорезе обозначали носителей мутации, две – свободные от мутации.

В результате проведенных исследований по подбору оптимальных методических подходов проведения анализа идентификации мутаций было выявлено, что при проведении ПЦР-ПДРФ и PSR-SSCP методов необходимо моделирование методик. В частности, необходимо изменять температуру отжига праймеров и изменить реакционный состав. В целом подобранные режимы позволяют определить мутацию в гене, однако для более полного и точного анализа необходимо протестировать более большую выборку животных.

Заключение. На основе разработанной методики возможно проведение мониторинга распространения этих мутаций среди быков-производителей, использующихся на племпредприятиях Беларуси, а также анализ происхождения таких животных. Необходимо провести тестирование всех быков-производителей, а также коров быкопроизводящей группы на выявление мутации DUMPS и CVM. Мониторингу должен подвергаться и импортный голштинизированный чернопестрый скот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дементьева, Н.В. Генотипирование племенного крупного рогатого скота в целях выявления генетических дефектов и аллелей гена каппа-казеина // Материалы междунар. Конф. Санкт-Петербург 2009, С 39-42.
2. Эрнст, Л., Зиновьева, Н., Гладырь, Е. Комплексный порок позвоночника у голштинов // Животноводство России, 2007, с.55-53.
3. Grzybowski, G., Grzybowski, T., Wozniak, M., Chacinska-Buczek, I., Smuda, E., Lubieniecki, K. Badania przesiewowe na obecność genu wczesniej obumieralnooci zarodków DUMPS u bydła w Polsce // Med. Wet. - 1998. - V.54. - P.189-193.
4. Kamiński, S., Grzybowski, G., Prusak, B., Rusk, A. No incidence of DUMPS carriers in Polish dairy cattle // J. Appl. Genet. - 2005. - V.46, №4. - P. 395-397.
5. Odalys Uffo, Atzel Acosta. Molecular diagnosis and control strategies for the relevant genetic diseases of cattle // Biotechnologia Aplicada. - 2009. - V.26, №3. - P.204-208.
6. Schwenger, B., I. Tamen, C. Aurich: Detection of the homogenous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro // J. Reprod. Fert. - 1994. - V.100. - P.511-514.
7. Shanks, R.D. and J.L. Robinson: Deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein cattle // Cornell. Vet. - 1990. - V.80 - P. 119-122.
8. Harlizius, B, Schröber, S, Tammen, I, Simon, T. Isolation of the bovine uridine monophosphate synthase gene to identify the molecular basis of DUMPS in cattle // J.Anim. Breed Genet. - 1996. - V.113. - P.303-309.

9. Agerholm, J.S., Bendixen, C., Andersen, O., Arnbjerg, J. Complex vertebral malformation in Holstein calves // J. Vet. Diagn. Invest. - 2001. - V.13.-P.283-289.
10. Revell, S. Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK // Vet. Rec. – 2001. – V.24. - P.659-660.
11. Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., et al. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation // Genome Res. - 2006. - V.16. - P.97–105.

УДК 636.4.082

КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ СВИНЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ

Н.Н. Климов, С.И. Коршун, Н.Б. Зайцева

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 28.06.2013 г.)

Аннотация. Установлено, что скрещивание помесных свиноматок БКБ×БМ с хряками породы ландрас способствовало большему накоплению белковых веществ в жировой ткани у полученных потомков (содержание протеина 2,57%). По содержанию в сала минеральных веществ животные подопытных групп практически не различались, а значение данного показателя у них находилось в пределах 0,07-0,08% ($P>0,05$). Мясо и бульон всех групп характеризовались высокой дегустационной и органолептической оценкой на уровне 7,0-8,0 баллов и выше. Вместе с тем дегустационная оценка мяса и бульона показала, что животные генотипа (БКБ×БМ)×Л получили наивысшее количество баллов – 7,83 и 7,79 соответственно.

Summary. It is established the crossing of local sows BLW×BM with boars of Landrase breed promoted bigger accumulation of albumens in fatty tissue at the received descendants (the maintenance of a protein of 2,57%). According to the content of mineral substances in fat animals of experimental groups practically didn't differ, and the value of this indicator was in limits of 0,07-0,08% ($P>0,05$). Meat and broth of all groups were characterized by a high tasting and organoleptic assessment at the level of 7,0-8,0 points and above. However, the tasting assessment of meat and broth showed that animals of a genotype (BLW×BM)×L received the highest number of points – 7,83 and 7,79 respectively.

Введение. Свиноводство – технологичная отрасль животноводства, которой отводится особая роль в увеличении производства мяса. Она динамично развивается на основе интенсивных технологий и технических решений в области содержания и кормления различных половозрастных групп животных, а также использования новых и усовершенствованных пород и линий свиней. В Дании потребление сви-