

2. Nie, Q. The PIT1 gene polymorphisms were associated with chicken growth traits / Q. Nie, M. Fang, L. Xie, M. Zhou, Z. Liang, Z. Luo, G. Wang, W. Bi, C. Liang, W. Zhang, X. Zhang // BMC Genetics, 2008. – С. 20.
3. Дементьева, Н. В. Полиморфизм в промоторе гена пролактина и его ассоциация с направлением продуктивности у кур / Н. В. Дементьева, А. А. Крутикова // Научный журнал КубГАУ. – № 111 (07). – 2015. – С. 4.
4. Кулибаба, Р. А. Полиморфизм генов гормона роста, рецептора гормона роста, пролактина и рецептора пролактина в связи с яичной продуктивностью у кур породы полтавская глинистая / Р. А. Кулибаба // Сельскохозяйственная биология. – Том 50. – № 2. – 2015. – С. 198-207.
5. Что такое гомозиготный и гетерозиготный генотип [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://unotices.com/answer-u/21172>. – Дата доступа: 30.05.2022.
6. Полиморфизм гена пролактина у кур и петухов отечественной селекции / Н. М. Юрага [и др.] // Сборник научных статей по материалам XXIV международной научно-практической конференции «К 70-летию образования университета» (Ветеринария, зоотехния), г. Гродно 2021. – С. 214-216.
7. Kansaku, N. Prolactin and growth hormone in birds: protein structure, gene structure and genetic variation. / N. Kansaku, G. Hiyama, T. Sasanami, D. Zadworny // The Journal of Poultry Science, 2008, 45. – P. 1-6.
8. Nie, Q. Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. / Q. Nie, M. Lei, J. Ouyang, H. Zeng, G. Yang, X. Zhang // Genet. Sel. Evol., 2005. 37. – P. 339-360.
9. Ip, S.C.Y. Genomic growth hormone gene polymorphisms in native Chinese chickens. / S.C.Y. Ip, X. Zyang, F.C. Leung // Exp. Biol. Med. 2001, 226(5). – P. 458-462.
10. Аборигенная порода [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki>. – Дата доступа: 30.05.2022.

УДК 636.22/.28.082.4

## МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ ФЕРТИЛЬНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

**Е. И. Юрченко, О. В. Вертинская**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»  
г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,  
г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: [elurch1986@mail.ru](mailto:elurch1986@mail.ru))

**Ключевые слова:** коровы, полиморфизм, фертильность, методика, ПЦР-анализ.

**Аннотация.** Экспериментально смоделирована и отработана методика определения полиморфизма генов *APAF1*, *SMC2*, *GART*, *APOB*, ассоциированных с гаплотипами фертильности (определяющих фертильность) крупного рогатого скота, разводимого в Республике Беларусь. В результате проведенного генотипирования коров голштинской породы молочного направления продуктивности отечественной селекции были выявлены носители всех вышена-

званных мутаций по трём лактациям, что свидетельствует об отсутствии селекции по данным генам.

## METHOD FOR DETERMINING THE FERTILITY GENES OF DAIRY CATTLE PRODUCTIVITY BY MOLECULAR GENETIC METHODS

E. I. Urchenko, O. V. Vertinskaya

EI «Grodno state agrarian university»

Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail: elurch1986@mail.ru)

**Key words:** cows, polymorphism, fertility, technique, PCR analysis.

**Summary.** Experimentally modeled and tested a method for determining the polymorphism of the *APAF1*, *SMC2*, *GART*, *APOB* genes associated with fertility haplotypes (determining fertility) of cattle bred in the Republic of Belarus. As a result of the genotyping of cows of the Holstein breed of dairy productivity of domestic selection, carriers of all the above mutations were identified for three lactations, which indicates the absence of selection for these genes.

(Поступила в редакцию 03.06.2022 г.)

**Введение.** Политика государства в области агропромышленного производства ориентирована на повышение конкурентоспособности сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия с целью наращивания экспортного потенциала и обеспечения стабильности внутреннего продовольственного рынка.

В целях рационального использования племенной продукции (материала) и сохранения генофондных пород Советом Министров Республики Беларусь были утверждены государственные программы в области племенного дела. Государственной программой в области племенного дела предусматривается выполнение комплекса мероприятий, направленных на повышение генетического потенциала племенных животных с целью увеличения их продуктивности.

Одной из задач племенных субъектов является внедрение в практику достижений науки, передового опыта и прогрессивных технологий в области племенного дела, получения наибольшего числа потомков от племенных производителей с высокой генетической ценностью.

Согласно Закону Республики Беларусь «О племенном деле в животноводстве» от 20 мая 2013 г. № 24-3, использованию в селекционном процессе подлежат животные с генетическим сертификатом, включающим аномалии [3]. В настоящее время в Республике Беларусь действует утвержденное положение о проведении молекулярной генетической экспертизы племенной продукции государств-членов

Евразийского экономического союза, согласно которому вся племенная продукция подлежит тестированию с целью выявления генетически детерминированных заболеваний.

Современное развитие животноводства базируется на постоянном углублении и усовершенствовании знаний и навыков эффективной работы. Методы классической селекции не справляются с возложенными задачами интенсификации производства, что стимулирует поиск их решений. Одним из таких решений является исследование молекулярно-генетических маркеров, отрицательно влияющих на ряд хозяйственно полезных признаков.

Толчок развитию маркерной селекции дал американский ученый Кэри Муллисон, который изобрел технологию полимеразной цепной реакции. Основой селекции на уровне ДНК является нахождение локусов хозяйственно полезных признаков. С помощью генетических маркеров можно наиболее точно и быстро провести генетический анализ. Особенно важно нахождение генетических маркеров признаков, которые фенотипически проявляются относительно поздно. Создание высокопродуктивных стад сокращается в разы с помощью геномных технологий. Для дальнейших разработок в генетике животноводства большое значение имеет тщательный выбор генотипов и наличие банков данных по результатам тестирования, с помощью которых специалисты могут контролировать процесс распространения нежелательных мутаций.

Проблема недополучения здорового и жизнеспособного потомства при разведении сельскохозяйственных животных остается актуальной уже не один десяток лет. Интенсивная селекция по желаемым признакам привела к росту инбридинга и, как следствие, к появлению новых рецессивных мутаций в популяции. Длительный период времени причиной снижения воспроизводительной способности принято было считать погрешности в кормлении и содержании животных, стрессовые воздействия на организм, послеродовые осложнения и метаболические процессы, обусловленные лактацией. Лишь сравнительно недавно причиной снижения репродуктивных качеств сельскохозяйственных животных были названы генетические факторы.

Снижение фертильности поголовья скота голштинской породы молочного направления отечественной селекции связано со многими причинами, одной из которых является накопление в популяции генетических дефектов в гомозиготном состоянии. Интенсивное использование искусственного осеменения быками, скрытыми носителями мутаций, привело к накоплению в популяции крупного рогатого скота различного рода Lof-мутаций и к увеличению частоты встречаемости

скрытых носителей среди коров и быков-производителей. Четвертая часть потомства от таких родителей погибает еще на эмбриональной стадии развития или рождается с дефектами, несовместимыми с жизнью [1]. Признаки плодовитости очень важны, поскольку оказывают большое влияние на экономическую составляющую ведения молочно-го животноводства. Экономические потери из-за проблем с фертильностью в основном вызваны низким надоем, увеличенными интервалами между отелами, увеличением затрат на осеменение, небольшим количеством телят на корову в год, увеличением выбраковки, высокими затратами на замену и более короткой продолжительностью репродуктивной жизни. В настоящее время в мире у голштинского скота зарегистрировано 12 гаплотипов фертильности, ассоциированных с эмбриональной смертностью или гибелью телят в постнатальный период [4].

Голштинский гаплотип HCD – генетический дефект, ассоциированный с гибелью телят в первые недели или месяцы жизни. У носителей мутации происходит нарушение в метаболизме холестерина [6]. Голштинский гаплотип HH1 расположен на 5 хромосоме. Внутри гаплотипа идентифицирован рецессивный аллель гена APAF1. Гомозиготность по данному аллелю приводит к спонтанным абортам.

Голштинский гаплотип HH3 расположен на 8 хромосоме. Внутри гаплотипа идентифицирован рецессивный аллель гена SMC2. Гомозиготность по данному аллелю приводит к эмбриональной смертности до 60-х суток стельности. Голштинский гаплотип HH4 расположен на 1 хромосоме. Внутри гаплотипа идентифицирован рецессивный летальный аллель гена GART. Гомозиготность по данному аллелю приводит к гибели эмбрионов на ранней стадии развития [5].

Диагностика мутаций, ассоциированных с летальными наследственными заболеваниями, играет важную роль в системе генетического мониторинга молочного скота.

**Цель работы** – адаптирование методики и изучение полиморфизма генов APAF1, SMC2, GART, APOB, ассоциированных с гаплотипами фертильности (определяющих фертильность) крупного рогатого скота, разводимого в Республике Беларусь.

**Материал и методика исследований.** Объектом наших исследований являлся генетический материал (ушной выщип) коров голштинской породы молочного направления продуктивности отечественной селекции, содержащихся в СПК им. Деньщикова Гродненского района. Опытное поголовье коров подобрано с учетом количества лактаций. Были сформированы три группы: коровы первого ( $n = 150$ ), второго ( $n = 150$ ) и третьего отелов ( $n = 136$ ). Генотипирование животных по генам APAF1, SMC2, GART, APOB

проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

Постановку ПЦР-анализа выполняли согласно протоколу, представленному в таблице.

Таблица – Компоненты и концентрации реакционных смесей при определении генов АРОВ, АРАF1, SMC2 и GART

Реагенты	Концентрация на 1 пробу			
	АРОВ	АРАF1	SMC2	GART
dH <sub>2</sub> O	До 15 мкл	До 15 мкл	До 15 мкл	До 15 мкл
dNTP	1 мкл	1,5 мкл	1 мкл	1,5 мкл
MgCl <sub>2</sub>	0,7 мкл	0,75 мкл	0,75 мкл	0,75 мкл
Буфер	1x	1x	1x	1x
Тақполимераза	1 е. а.	1 е. а.	1 е. а.	1 е. а.
Праймер F – 1	20-25 пМ	20-25 пМ	20-25 пМ	20пМ
Праймер R – 2	20-25 пМ	20-25 пМ	20-25 пМ	20пМ
Праймер N – 3			20-25 пМ	
ДНК	50-100 нг			50-100 нг

Для диагностики мутации в гене АРОВ использовали следующую последовательность синтетических олигонуклеотидов:

АРОВ F – 1:5'ССААСАСТТАСТТГААТТССААGAGCACCC;

АРОВ R – 2:5'ТСТТСТGGТТСТТАGТGТТАGСАТ.

Режим амплификации гена АРОВ:

x1: 95 °С – 7 мин;

x35: 94°С – 30 с, 68 °С – 30 с, 72 °С – 30 с;

x1: 72 °С – 7 мин.

ПЦР-продукт:

Генотип NN = 327 bp (свободный от мутации),

Генотип AN = 327/215 bp (носитель мутации),

Генотип AA = 215 bp (летальный) (рисунок 1).

Визуализацию продукта амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 2%-м агарозном геле (при напряжении 120 В).

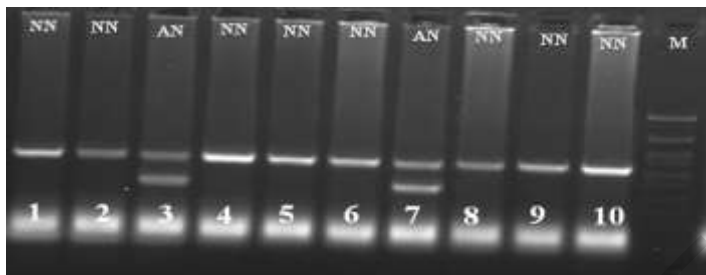


Рисунок 1 – Электрофореграмма фрагментов ПЦР участка гена АРОВ (М – ДНК-маркер молекулярного веса 50 bp; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10 – генотип АРОВ<sup>NN</sup>; 3, 7 – АРОВ<sup>AN</sup>)

Для диагностики мутации в гене АРАF1 использовали следующую последовательность синтетических олигонуклеотидов:

АРАF1 F – 1:5'TATAGACTGTGAGAATTTCCAGG- 3';

АРАF1 R – 2:5'TTATCGACCTCCTTGCTTGCCTGC- 3'.

Режим амплификации гена АРАF1:

x1: 95 °С – 7 мин;

x 40: 94 °С – 30 с, 61 °С – 30 с, 72 °С – 45 с;

x1: 72 °С – 7 мин.

ПЦР-продукт:

Генотип QQ = 123/33 bp (свободный от мутации),

Генотип QX = 156/123/33 bp (носитель мутации),

Генотип XX = 156 bp (летальный) (рисунок 2).

Визуализацию продукта амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 2%-м агарозном геле (при напряжении 120 В). Длина амплифицированного фрагмента – 156 bp.

Для рестрикции амплифицированного участка используют эндонуклеазу BstC8I. Реакцию проводят при температуре 37 °С. Продукт рестрикции гена разделяют электрофоретически в 3-4%-м агарозном геле (при напряжении 130 В) в 1×ТВЕ буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе гель-документирования GelDoc RX+ (BIORAD).

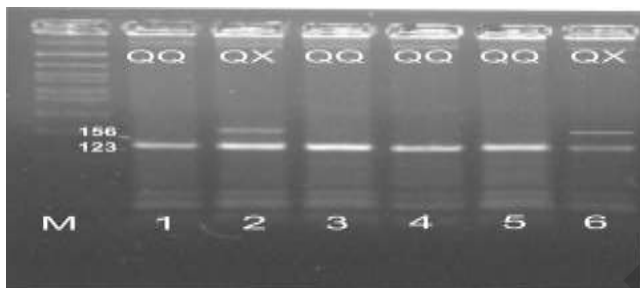


Рисунок 2 – Электрофореграмма фрагментов ПЦР участка гена ARAF1 (М – ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp; 1, 3, 4, 5 – генотип ARAF1<sup>Q</sup>; 2, 6 – ARAF1<sup>Q</sup>/<sup>X</sup>)

Для диагностики мутации в гене SMC2 использовали следующую последовательность синтетических олигонуклеотидов:

SMC2F– GGTCTTTAGTGGCTCTGTCA- 3';

SMC2R– TCTTACCTGAGAATGTGTGA- 3';

SMC2N– TCTTACCTGAGAATGTGTGG- 3'.

Режим амплификации гена SMC2:

x1: 94 °C – 4 мин;

x 25: 94 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с;

x1: 72 °C – 3 мин.

ПЦР-продукт:

Генотип ТТ = 219/155 bp (свободный от мутации),

ГенотипСТ = 219/155/112 bp (носитель мутации),

ГенотипСС = 219/112 bp (летальный) (рисунок 3).

Визуализацию продукта амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 2%-м агарозном геле (при напряжении 120 В).



Рисунок 3 – Электрофореграмма фрагментов ПЦР участка гена SMC2 (М – ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp; 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17 – генотип SMC2<sup>TT</sup>; 4, 12 – SMC2<sup>ST</sup>)

Для диагностики мутации в гене GART использовали следующую последовательность синтетических олигонуклеотидов:

GART F – GAAGGTGTCCTCTATGCTGG- 3';

GART R – TTTAAGAAGTGGGAGGATC- 3'.

Режим амплификации гена GART:

x1: 95 °С – 8 мин;

x 35: 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин;

x1: 72 °С – 10 мин.

ПЦР-продукт:

Генотип AA = 154/59/58/5 bp (свободный от мутации),

Генотип AC = 154/117/5 bp (носитель мутации),

Генотип CC = 117 bp (летальный) (рисунок 4).

Визуализацию продукта амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 2%-м агарозном геле (при напряжении 120 В). Длина амплифицированного фрагмента – 279 bp.

Для рестрикции амплифицированного участка гена GART использовали эндонуклеазу MseI. Реакцию проводили при температуре 37 °С. Продукт рестрикции гена разделяли электрофоретически в 3-4%-м агарозном геле (при напряжении 130 В) в 1×TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе гель-документирования GelDoc RX+ (BIORAD).

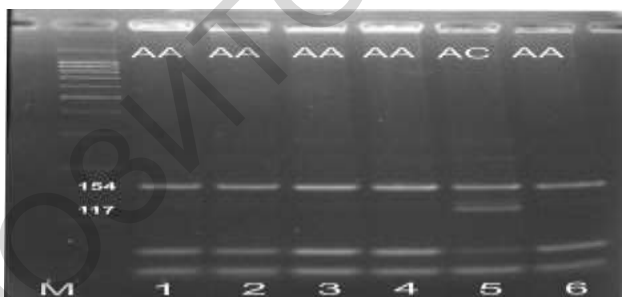


Рисунок 4 – Электрофореграмма фрагментов ПЦР участка гена GART (M – ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp; 1, 2, 3, 4, 6 – генотип GART<sup>AA</sup>; 5 – GART<sup>AC</sup>)

**Результаты исследований и их обсуждение.** Экспериментально смоделированные методики позволят провести генотипирование коров голштинской породы отечественной селекции по генам APAF1, SMC2, GART, APOB. На основании генотипирования будет рассчитана частота встречаемости их аллелей и генотипов по Е. И. Меркурьевой [2].



Выявление носителей всех вышеуказанных мутаций будет свидетельствовать об отсутствии селекции по данным генам.

**Заключение.** Разработанные и адаптированные методики ДНК-тестирования позволят выявить скрытых носителей в гетерозиготном состоянии и не допустить распространение наследственных заболеваний в популяции, а также исключить получение особей на стадии эмбрионального развития. Данные мероприятия позволят оздоровить племенное поголовье и обеспечить генетическую безопасность племенного материала крупного рогатого скота Республики Беларусь.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Генетические аномалии крупного рогатого скота / Н. В. Ковалюк [и др.] // Сборник научных трудов краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – Том 7. – № 1. – 2018. – С. 27-32.
2. Меркурьева, Е. К. Генетические основы селекции в скотоводстве: учеб. пособие / Е. К. Меркурьева. – М.: Колос, 1977. – 239 с.
3. Закон Республики Беларусь «О племенном деле в животноводстве» от 20 мая 2013 г. № 24-3.
4. Escoufflaire H. C. A splice site mutation in CENPU is associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle // Journal of Dairy Science. – 2020. – V. 103. – No 1. – P. 607-612.
5. Зиновьева, Н. А. Гаплотипы фертильности голштинского скота / Н. А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – № 4. – С. 6-18.
6. Позовникова, М. В. Живая масса и уровень холестерина в сыворотке крови телят с генетической мутацией в гене APOB / М. В. Позовникова // Материалы ежегодной международной научной конференции. Отв. редактор Т. В. Седлецкая. – Издательство: Ленинградский государственный университет имени А. С. Пушкина, 2020 – С. 8-10.

УДК 636.22.28[636.0827636.034]:636.083(476.1)

### ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СОДЕРЖАНИЯ КОРОВ НА ИХ ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ КАЧЕСТВА И МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ

**О. И. Якшук**

«Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,

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

**Ключевые слова:** *способы содержания коров, воспроизводительные качества, молочная продуктивность, экономическая эффективность.*

**Аннотация.** *Установлено, что коровы при беспривязном содержании имели лучшие показатели воспроизводства. Так, продолжительность сервис-периода у них была меньше на 10 дней, или 10,1 %, выход телят на 100 коров выше на 1 голову, коэффициент воспроизводительной способности выше на 0,03, оплодотворяемость после первого осеменения выше на 3 п. п. Молочная продуктивность коров с беспривязным содержанием была ниже на 228 кг, или 4,6 %, жирномолочность выше на 0,2 %, количество молочного жира выше на*