

УДК 636.2.082

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ MSTN, TG5, CAPN1
У МЯСНЫХ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
БЕЛАРУСИ**

**О. А. Епишко¹, Н. А. Сонич¹, В. К. Пестис¹, Т. И. Кузьмина²,
В. В. Пешко¹, Е. С. Чебуранова¹, Е. А. Манцевич¹**

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28
e-mail: labgen@mail.ru)

² – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
генетики и разведения сельскохозяйственных животных

Ключевые слова: полиморфизм, ген, ПЦР, MSTN, TG5, CAPN1.

Аннотация. На эффективность производства продукции животноводства оказывают влияние множество факторов, одними из наиболее значительных являются генетический потенциал животных, используемых в племенной работе, и определенные условия кормления. Использование информативных ДНК-маркеров позволяет вести отбор в раннем возрасте по признакам, сцепленным с полом или проявляющимся в зрелом возрасте, а также характеризующимися полигенной природой наследования. В качестве позиционных и функциональных генов-кандидатов связанных с качеством мяса мы рассмотрели гены MSTN, TG5, CAPN1 у мясных пород крупного рогатого скота Беларуси.

Изучен полиморфизм генов, который выявил различия в соотношении предпочтительных генотипов у животных абердин-ангусской, лимузинской и герефордской пород. Наибольшая концентрация желательных аллелей по генам CAPN1 и TG наблюдалась у животных абердин-ангусской породы. Мутация в гене MSTN присутствовала только у животных абердин-ангусской породы, у животных других пород мутаций по данному гену не выявлено.

**POLYMORPHISM OF GENES MSTN, TG5, CAPN1 AT MEAT
BREEDS OF CATTLE OF BELARUS**

**Epishko O. A.¹, Sonich N. A.¹, V. K. Pestis¹, T. I. Kuzmina²,
Peshko V. V.¹, E. S. Cheburanova¹, E. A. Mancevich¹**

¹ – EI «Grodno State Agrarian University»
(Belarus, Grodno, 230008, 28 Tereshkova st.
e-mail: labgen@mail.ru)

² – All-russian research institute of genetics and breeding farm animals
(St. Petersburg, Russian Federation)

Key words: *polymorphism, gene, PCR, MSTN, TG5, CAPN1.*

Summary. *On production efficiency of production of livestock production affect a set of factors, one of the most considerable is the genetic potential of the animals used in breeding work and particular conditions of feeding. Use of informative DNA markers allows conducting selection at early age on signs, linked to a floor or shown at mature age, and characterized by the polygenic nature of inheritance. As positional and functional candidate genes of the bound to quality of meat, we considered genes of MSTN, TG5, CAPN1 at meat breeds of cattle of Belarus.*

Polymorphism of genes, which revealed distinctions in the ratio of preferable genotypes at animals Aberdeen - Angus, limuzinsky and gerefordsky breeds, is studied. The greatest concentration of desirable alleles on genes of CAPN1 and TG was observed at animals Aberdeen - the Angus breed. The mutation was present at a gene of MSTN only at animals Aberdeen - the Angus breed, at animal other breeds of a mutation on this gene is not revealed.

Введение. Разведением мясного скота в Республике Беларусь занимаются 263 сельскохозяйственные организации, в 231 скот содержится на отдельных фермах.

Ускоренное развитие мясного скотоводства сегодня следует рассматривать как проблему государственного значения, решение которой позволит научно, обоснованно и в интересах всего населения в перспективе удовлетворить платёжеспособный спрос на говядину за счёт отечественного производства. Объёмы реализации крупного рогатого скота на убой сокращаются и перспектив их роста в ближайшее время без применения кардинальных мер не ожидается. Источником поступления говядины в стране остаётся молочное животноводство [1], поэтому сегодня в стране ведется большая работа по наращиванию мясного поголовья в стране. Однако развитие мясного скотоводства предусматривает не только увеличение объемов производства мяса, но и улучшение его качества.

На эффективность производства продукции животноводства оказывают влияние множество факторов, одними из наиболее значительных являются генетический потенциал животных, используемых в племенной работе [2, 3], и определенные условия кормления. Генетическое усовершенствование существующих пород животных – длительный и трудоемкий процесс, т. к. большинство экономически значимых показателей имеют полигенную природу, т. е. определяются многими генами. Маркерная селекция в качестве дополнительного метода может стать мощным инструментом селекционного отбора животных, характеризующихся внутримышечным накоплением жира. В мясном скотоводстве генетическое улучшение производителей возможно по направлениям: отбор отцов и матерей как быка, так и коровы. Применение маркерной селекции возможно по каждому из них с целью сокращения

временного интервала на выявление животных-носителей желательных аллелей по контролируемым или улучшаемым признакам. Использование информативных ДНК-маркеров позволяет вести отбор в раннем возрасте по признакам, сцепленным с полом или проявляющимся в зрелом возрасте, а также характеризующимся полигенной природой наследования [4]. Миостатин – белок, подавляющий избыточный рост мышечной ткани. Образуется в мышцах животных, затем выделяется в кровь, оказывая свое действие на мышцы за счет связывания с рецепторами ACVR2B (activin type II receptor). Миостатин активен в мышцах, используемых для движения (скелетные мышцы) до и после рождения. Это обычно ограничивает рост мышц, гарантируя, что мышцы не становятся слишком большими.

Известна мутация гена миостатина (MSTN) – nt821(del11), которая приводит к усиленному формированию мышечной массы (феномен «двойной мускулатуры»). Мутации, которые уменьшают производство миостатина, приводят к чрезмерно быстрому росту мышечной ткани (фенотип двойной мускулатуры). Однако развитие двойной мускулатуры связано с такими негативными последствиями, как снижение рождаемости и затруднения при отеле.

В качестве позиционного и функционального гена-кандидата, связанного с качеством мяса, рассматривается ген тиреоглобулина (TG5), находящийся в области центромеры хромосомы 14 крупного рогатого скота. TG5 – гликопротеин и предшественник тиреоидных гормонов трийодтиронина и тетраiodтеранина, которые участвуют в образовании жировых клеток и мраморности. Точный механизм влияния полиморфизма гена TG5 на формирование качественных признаков мясной продуктивности ещё не известен, но установлена связь его вариантов с мраморностью, в частности, содержанием внутримышечного жира в длиннейшей мышце спины [5]. Исследования, проведённые на группах скота ангусской и шортгорнской пород, в коммерческих линиях скота, а также в группах скота породы Вагу, показали, что скот, гомозиготный или гетерозиготный по аллелю Т (генотипы ТТ или СТ) скот отличается более высокой мраморностью по сравнению с животными, несущими генотип гомозиготный по аллелю С (генотип СС). В группах скота породы Вагу различия в степени мраморности между гомозиготными генотипами достигали 14-20% [1, 6].

Еще одним потенциальным геном мясной продуктивности рассматривают ген кальпастатин (CAPN1) – белок-ингибитор активности кальпаина. Этот белок участвует в процессе регуляции протеолиза при созревании мяса, специфично угнетая протеолитическую активность кальпаинов. Кальпастатин-кальпаиновая система увеличивает надеж-

ность контроля. Кальпастин не только ингибирует активность кальпаина, но и его завязываемость с мембранами. Мутация гена кальпаина, картированного на 29 хромосоме крупного рогатого скота, представлена полиморфизмом 2 нуклеотидов, обуславливающим аминокислотную замену (глицин/аланин) и приводящим к более высокой нежности мяса по сравнению с глициновым аллелем (> 30%) [7].

Использование генов-маркеров позволяет изучать, контролировать и прогнозировать важные параметры у животных. К генам-маркерам мясной продуктивности относят MSTN, TG5, CAPN1. Установлено влияние генотипов по генам на физико-химические показатели нежности мяса при созревании. Отмечается, что гены миостатина, кальпаина, кальпастина ответственны за формирование нежности мяса.

Цель работы: изучить полиморфизм генов MSTN, TG5, CAPN1 у мясных пород крупного рогатого скота Беларуси.

Материал и методика исследований. Исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «ГГАУ». В качестве объекта исследований использовали крупный рогатый скот абердин-ангусской, лумузинской и герфордской пород, содержащихся в ОАО «Агро-Мотоль» Ивановского района Брестской области, УСП «Новый Двор-Агро» Свислочского района Гродненской области, СПК «Озеранский» Мостовского района Гродненской области, РСУП «Гродненское племпредприятие». Для изучения полиморфизма генов MSTN, TG5, CAPN1 провели генотипирование животных по разработанной методике ПЦР-ПДРФ анализа с некоторыми модификациями температурных и временных режимов.

В качестве биопроб для проведения ДНК-тестирования использовали биологический материал в виде ткани (ушной выщип). В процессе взятия каждую пробу подписывали индивидуальным номером. ДНК выделяли перхлоратным методом.

Для диагностики точечной мутации MSTN использовали праймеры:

MSTN – 1: 5' GGG GGG GAG AGA TTT TGG GCT TGA TTG TGA – 3',

MSTN – 2: 5' GGG GGG GTG CAA TAA TCC AAT CCC ATC CAA – 3'.

Для диагностики точечной мутации TG5 использовали праймеры:

TG5 – 1: 5' GGG GAT GAC TAC GAG TAT GAC TG – 3',

TG5 – 2: 5' GTG AAA ATC TTG TGG AGG CTG TA – 3'.

Для диагностики точечной мутации CAPN1 использовали праймеры:

CAPN1 – 1: 5' TCT TCT CAG AGA AGA GCG-CAG – 3',

CAPN1 – 2: 5' CTG-CGC-CAT-TAC-TAT-AGA-TC – 3'.

ПЦР-анализ выполняли согласно протоколу, представленному в таблице.

Реагенты	Концентрация на 1 пробу		
	MSTN	TG5	CAPN1
dH ₂ O	До 20 мкл	До 25 мкл	До 10 мкл
dNTP	2,0 мМ	2,0 мМ	0,8 мкл
MgCl ₂	1.5 мМ	1.25 мМ	1 мкл
Буфер	1x	1x	1x
Taq полимераза	1 е.а.	1 е.а.	1 е.а.
MSTN – 1	15-25 пМ	15-25 пМ	15-25 пМ
MSTN – 2	15-25 пМ	15-25 пМ	15-25 пМ
Проба ДНК	100-200 нг	100-200 нг	100-200 нг

Режим амплификации MSTN:

x1: 94⁰С – 4 мин

x40: 94⁰С – 30 с, 68⁰С – 30 с, 72⁰С – 30 с

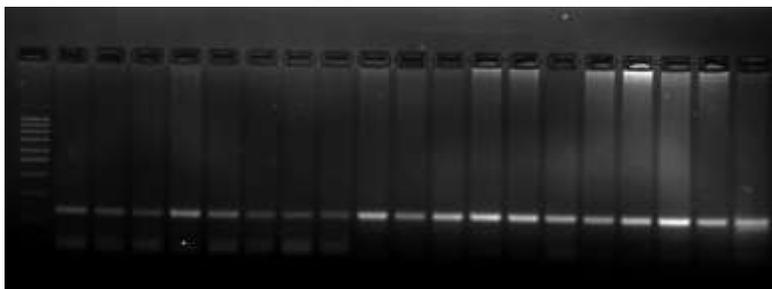
x1: 72⁰С – 5 мин.

ПЦР-продукт

Генотип AA = 119 bp,

Генотип BB = 108 bp,

Генотип AB = 119/108 bp (рисунок 1).



М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Рисунок 1 – Электрофореграмма технического результата предложенного способа идентификации мутации гена MSTN, ассоциированной с мясной продуктивностью крупного рогатого скота на основе ПЦР-анализа

Пояснение к рис. 1. Обозначения:

М – ДНК-маркер 50bp (ОДО «Праймтех», Беларусь),

1-18 – генотип AA,

19 – генотип AB.

Детекцию результатов ПЦР-анализа MSTN осуществляли методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле в TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия.

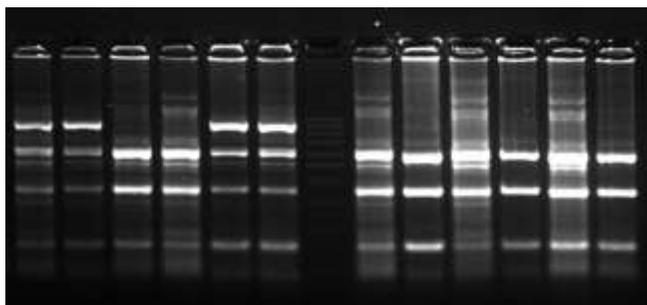
Режим амплификации TG:

x1: 94⁰С – 4 мин;

x31: 94⁰С – 1 мин, 57⁰С – 1 мин, 72⁰С – 1 мин;

x1: 72⁰С – 4 мин.

На этапе ПДРФ применяется эндонуклеаза рестрикции – P_{su}I, с генерацией генотип специфических фрагментов: ТТ (норма) = 473/75 bp; СС (способствует накоплению внутримышечного жира) = 295/178/75 bp; СТ (предрасположен к накоплению внутримышечного жира) = 473/295/178/75 bp (рисунок 2).



1 2 3 4 5 6 М 7 8 9 10 11 12

Рисунок 2 – Электрофореграмма технического результата предложенного способа определения гена тиреоглобулина (TG5) у крупного рогатого скота мясного направления

Пояснение к рис.2. Обозначения:

М – ДНК-маркер 50bp (ОДО «Праймтех», Беларусь),

1,2,5,6 – генотип СТ,

3,4,7,8,9,10,11,12 – генотип СС.

Режим амплификации CAPN1:

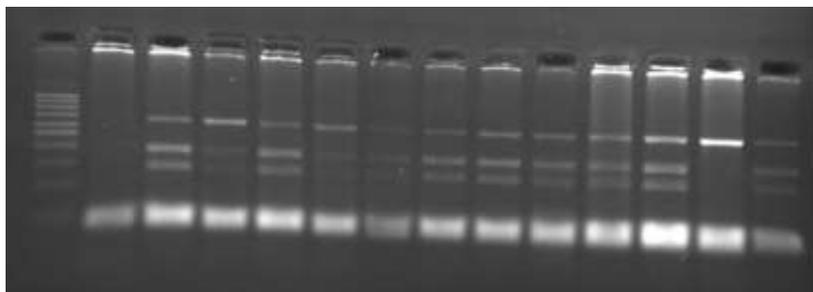
x1: 93⁰С – 5 мин, 93⁰С – 1 мин, 59⁰С – 1 мин;

x1: 72⁰С – 1 мин

x35, 72⁰С – 5 мин

12⁰С – удержание.

На этапе ПДРФ применяется эндонуклеаза рестрикции – P_{su} I Tth1111) с генерацией генотип специфических фрагментов: АА – 341 bp, GА – 341/195/146 bp, GГ – 195/146 bp (рисунок 3).



М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Рисунок 3 – Электрофореграмма технического результата предложенного способа идентификации мутации гена CAPN1: ассоциированного с мясной продуктивностью крупного рогатого скота на основе ПЦР-анализа

Пояснение к рис. 3. Обозначения:

М – ДНК-маркер 50bp (ОДО «Праймтех», Беларусь),

2,3,3,5,6,7,8,9,10,11,13 – генотип GA,

12 – генотип AA.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенных исследований выявлен полиморфизм по генам миостатина (MSTN), тиреоглобулина (TG) и кальпастатина (CAPN1). Анализ полученных результатов показал различия в соотношении разных генотипов у животных абердин-ангусской, лимузинской и герефордской пород.

У животных абердин-ангусской породы частота желательных генотипов гена MSTN^{AA} составила 98%, при изучении полиморфизма у животных лимузинской и герефордской породы не выявлено ни одного животного с мутантным аллелем по гену MSTN.

Анализ животных абердин-ангусской породы по гену CAPN1 выявил наличие генотипов CAPN1^{AA} – 20%, CAPN1^{GA} – 65%; CAPN1^{GG} – 15%, у лимузинов преобладали животные с генотипом CAPN1^{GA} – 56,4%, а концентрация генотипов CAPN1^{GA} и CAPN1^{GG}, составила 36,6% и 7% соответственно. У животных герефордской породы частота встречаемости генотипа CAPN1^{AA} составила 46%, CAPN1^{GA} – 51%; CAPN1^{GG} – 3%.

Среди исследованных животных абердин-ангусской породы по гену TG распределение генотипов было следующим: TG^{CC} – 44,5%, TG^{CT} – 52,8% и всего 2,7% животных были с генотипом TG^{TT}. У животных герефордской породы частоты встречаемости были следующими: TG^{CC} – 68%, TG^{CT} – 32%, у лимузинов: TG^{CC} – 54%, TG^{CT} – 46%, животных с генотипом TG^{TT} не выявлено ни у животных лимузинской породы, ни у животных породы герефорд.

Заключение. Таким образом, результаты исследований показали различия в соотношении предпочтительных генотипов у животных абердин-ангусской, лимузинской и герефордской пород. Наибольшая концентрация желательных аллелей по генам CAPN1 и TG наблюдалась у животных абердин-ангусской породы. Мутация в гене MSTN присутствовала только у животных абердин-ангусской породы, у животных других пород мутации по данному гену не выявлено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амерханов Х. Производство говядины и пути его увеличения в России / Амерханов Х. // Молоч. и мясн. скотоводство, 2003. – № 6. – С. 3-10.
2. Зелепухин А. Племенные ресурсы мясного скотоводства России / Зелепухин А., Каюмов Ф. // Молоч. и мясн. скотоводство. - 2003. - № 6.
3. Эрнст Л. К. Перспективы селекции сельскохозяйственных животных / Эрнст Л. К. // Науч. тр. ВИЖа. – 2005. – в. 63. – т. 1. – 41 с.
4. Fiems, L. O.; Van Caelenbergh, W.; Vanacker, J. M.; De Campeneere, S.; Seynaeve, M. Prediction of empty body composition of double-musled beef cows. Livest. Prod. Sci. 2005, 92,249-259.
5. Spelman R. J. Genetic and economic responses for within-family markers-assisted selection in dairy cattle breeding schemes / Spelman, R. J., Garrick D. J. // J. Dairy Sci. 1998. - Vol. 81. - P. 2942-2950.
6. Saici R. K. Primer-directed enzymatic amplification of with a thermostable DNA polymerase / Saici R. K., Gelfand D., et. al. // Science. - 1988. - P. 487-491.
7. Wiesner I. Insertion of a reamplification round into the ISSR-PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns / I. Wiesner, D. Wiesnerova // Cell Mol. Biol. Letters. – 2003. – Vol. 8. – P. 743-748.

УДК 636.592.082.23

ВЛИЯНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЦЫПЛЯТ НА ИХ РАЗВИТИЕ В ПЕРИОД РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА ПРИ РАЗНЫХ СИСТЕМАХ СОДЕРЖАНИЯ

**А. И. Киселёв¹, В. С. Ерашевич¹, В. Ю. Горчаков²,
О. И. Горчакова², А. С. Белявский²**

¹ – РУП «Опытная научная станция по птицеводству»

г. Заславль, Республика Беларусь

² – УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28

e-mail: labgen@mail.ru)

Ключевые слова. Бройлеры, внутренние органы, содержание, двигательная активность