

3. Guyader-Joly, C. Effect of lecithin on in vitro and in vivo survival of in vitro produced bovine blastocysts after cryopreservation / C. Guyader-Joly, [et. all.] // Theriogenology. 1999. – Vol. 52. – P. 1193-1202.
4. Nawroth, F. Cryopreservation in assisted reproductive technology: New trends. / F. Nawroth, [et. all.] // Semin. Reprod. Med. 2005. – Vol. 23. – P. 325-331.
5. Nedambale, TL. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol / TL. Nedambale, F. Du, X. Yang, XC.Tian // Anim. Reprod. Sci. 2006. – Vol. 93. – P. 61-75.
6. Seidel, GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation / GE. Seidel // Theriogenology. 2006. – Vol. 65. – P. 228-35.
7. Sommerfeld, V. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification / V. Sommerfeld, H. Niemann // Cryobiology. 1999. – Vol. 38. – P. 95-105.
8. Vajta, G. Improving cryopreservation systems / G. Vajta, M. Kuwayama // Theriogenology. 2006. – Vol. 65. – P. 236-244.
9. Голубец, Л. В. Оценка качества ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота / Л. В. Голубец, А. С. Дешко [и др.] // Учеб.-метод. пособие – Гродно: ГГАУ, 2011 – 68 с.
10. Пестис, В. К. Производство эмбрионов крупного рогатого скота в культуре in vitro / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко [и др.] // Метод. рекомендации – Гродно: ГГАУ, 2018. – 52 с.

УДК 636.2.034.636.087.7

РАЗРАБОТКА И АДАПТАЦИЯ МЕТОДИКИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО ГЕНУ ЛАКТОФЕРРИНА

О. А. Епишко, В. В. Пешко, А. А. Ситько

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 лактоферрина, резистентность организма, молочная продуктивность, крупный рогатый скот.*

***Аннотация.** Изучен мировой опыт использования маркерных генов в селекции крупного рогатого скота для увеличения резистентности организма животных к воспалению молочной железы. Проведена адаптация методики генотипирования крупного рогатого скота по гену лактоферрина. Идентифицированы генотипы LTF AA и LTF AB. Генотип LTF BB выявлен не был.*

DEVELOPMENT AND ADAPTATION OF THE TECHNIQUE OF GENOTYPING OF CATTLE ON GENA LAKTOFERRIN

O. A. Epishko, V. V. Peshko, A. A. Sitsko

EI «Grodno state agrarian university»

Grodno, Republic of Belarus

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

ggau@ggau.by)

Key words: *gene of a laktoferrin, resistance of an organism, dairy efficiency, cattle.*

Summary. *The international experience of use of marker genes in selection of cattle directed to increase in resistance of an organism of animals to inflammation of a mammary gland is studied. The adaptation of cattle genotyping according to the laktoferrin gene was carried out. The genotypes LTF AA and LTF AB are identified. The genotype LTF BB was not identified.*

(Поступила в редакцию 03.06.2019 г.)

Введение. В настоящее время основополагающим вектором развития сельского хозяйства в Республике Беларусь является разведение высокопродуктивного молочного скота и развитие новейших промышленных технологий содержания и эксплуатации животных. Переход на новую технологию производства молока, связанный с расширением производственных мощностей и автоматизацией производства, приводит к чрезмерному воздействию производственно-хозяйственных стрессов на организм животных, что, в свою очередь, снижает иммунитет и повышает восприимчивость организма животных к заболеваниям различной этиологии, в т. ч. и к заболеваниям молочной железы.

Риск возникновения нарушений жизнедеятельности организма у высокопродуктивных животных сопряжен с непосредственным влиянием генетических и паратипических факторов.

Так, у высокопродуктивных животных генетически обусловленная ориентация интенсивности обмена веществ на синтез и производство молочной продукции приводит к уменьшению резистентности организма к неблагоприятным факторам внешней среды.

Высокопродуктивный скот, ввиду усиленного обмена веществ, обладает высокой чувствительностью к дисбалансу и дефициту питательных веществ, витаминов и минеральных элементов в кормах, что, в свою очередь, может приводить к таким серьезным обменным нарушениям, как ацидоз и кетоз. Нарушение обмена веществ в организме животных запускает механизм взаимосвязанных реакций и компенсационных процессов, приводящих к поражению молочной железы. Например, наличие ламинита и хронической хромоты у животных

приводит к снижению уровня потребления корма и двигательной активности, животные большую часть времени находятся в вынужденном лежачем положении, из-за чего степень взаимодействия молочной железы с агрессивной средой увеличивается в разы.

В свою очередь, внутренние патогенетические механизмы, угнетающие функциональную деятельность организма животного, усугубляются внешними паратипическими факторами.

Интенсификация производства приводит к высокой концентрации животных на ограниченных площадях, к частым перемещениям животных по технологическим группам без учета социально-ранговых взаимоотношений, к высокому микробному прессингу окружающей среды в условиях замкнутого режима содержания. Как итог, совокупное действие неблагоприятных физиологических и паратипических факторов приводит к появлению синдромов функциональной недостаточности иммунной, эндокринной, антиоксидантной и репродуктивной систем, приводящих к возникновению факторных заболеваний.

Воспаление молочной железы причиняет значительный экономический ущерб из-за снижения молочной продуктивности, ухудшения технологических свойств и качества молока, уменьшения фертильности коров, увеличения финансовых затрат на профилактику и лечение заболевания, преждевременной выбраковки высокопродуктивных животных.

Согласно данным Национального статистического комитета Республики Беларусь, численность поголовья крупного рогатого скота на 01.02.2019 составила 4 242 500 голов, из них 1 429 600 голов дойного стада. Уровень заболеваемости крупного рогатого скота маститом в хозяйствах может достигать до 20% и более. Субклиническая форма мастита чаще всего имеет бессимптомное течение и может охватывать до 70% поголовья. Переболевшие животные в большей степени подвержены риску повторного поражения вымени, вследствие органических поражений тканей молочной железы существует риск развития атрофии долей вымени, что может приводить к снижению молочной продуктивности до 25% и более. Исследования ученых показали, что каждая четверть вымени, которая была заражена возбудителями с высокой патогенностью, дает приблизительно на 700 кг молока меньше, чем здоровая четверть вымени [2].

Особым показателем, позволяющим проводить анализ эпизоотологической ситуации в стаде, является количество соматических клеток в молоке. Количество соматических клеток в молоке находится в прямой зависимости от возраста животных, уровня и качества кормления, физиологического состояния, однако основополагающим фактором уве-

личения количества соматических клеток является заболеванием маститом. Соответственно, данный показатель может использоваться в качестве диагностического инструмента, позволяющего проводить раннее выявление различных форм мастита, а также проводить оценку технологической пригодности, полученной продукции для изготовления молочных продуктов.

Исследования, проведенные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», показали, что существует прямая взаимосвязь между содержанием соматических клеток в сборном молоке и процентом заболеваемости коров маститом. Так, содержание соматических клеток в сборном молоке в количестве до 500 тыс./см³ говорит о степени заболеваемости в стаде на уровне 5%, а содержание соматических клеток на уровне 850-1000 тыс./см³ говорит о степени заболеваемости маститом на уровне 25% и более. Потери получаемой продукции начинаются уже при наличии более 100 тыс. соматических клеток в 1 см³ молока, а при содержании 6,4 млн. соматических клеток в 1 см³ потери достигают до 1 464 кг за лактацию. При этом также повышается бактериальная обсемененность молока, что приводит к значительному снижению сортности молока.

В странах с развитым молочным скотоводством, в зависимости от содержания соматических клеток в молоке, устанавливается классность полученного сырья и определяется его ценовая категория.

Проведенные недавно исследования показали, что расходы на корову, зараженную клиническим маститом, составляют в среднем 107 долларов США (возможна и следующая шкала: минимум – 46 долларов США, максимум – 142 доллара США) [2].

Метод селекции крупного рогатого скота с использованием молекулярно-генетических маркеров в настоящее время является одним из направлений, позволяющих повысить эффективность племенной работы, тем самым позволяя увеличить экономическую прибыль и интенсифицировать производство молочной продукции.

Актуальным направлением в селекции крупного рогатого скота является изучение ассоциации генетических маркеров с хозяйственно полезными признаками и резистентностью животных к воздействию различных факторов окружающей среды [3, 4]. В настоящее время существует множество доказательств значимости использования молекулярно-генетических маркеров в селекции молочного скота, направленной на увеличение резистентности организма животных к заболеваниям молочной железы [7].

В настоящее время учеными Sharifzaden A., Doosti A. и др. установлена тесная взаимосвязь между полиморфизмом гена лактоферрина

(LTF) с содержанием соматических клеток и заболеваемостью маститом. Лактоферрин является одноцепочечным малым гликопротеином молока, содержащим приблизительно 690 аминокислот с молекулярным весом 77 кДа. Ген LTF локализован на хромосоме 22q24, состоит из 17 экзонов и распространяется примерно на 34,5 т. п. н. геномной ДНК. Данный ген принимает активное участие в модуляции и регуляции иммунного ответа организма животных [3, 8].

Мировыми исследованиями установлено, что частота встречаемости генетических вариантов AA, BB и AB гена лактоферрина составляет соответственно 32,5; 10,0 и 57,5% у коров голштинской породы. Установлено, что аллель А гена LTF связан с устойчивостью к маститам у крупного рогатого скота. Согласно данным проведенных исследований Nematí Doust и др., частота встречаемости генотипа AA и AB по гену лактоферрина составила 70,25 и 29,75% соответственно. Генотип BB по гену лактоферрина в исследованиях выявлен не был [1, 5, 6].

Изучение полиморфизма гена лактоферрина имеет теоретическое и прикладное значение в животноводстве, т. к. существует положительная корреляция между содержанием соматических клеток в молоке и генетическими вариантами гена лактоферрина.

Цель работы – разработка и адаптация методики применения гена LTF (лактоферрина) в качестве ДНК-маркера устойчивости к маститу у высокопродуктивных животных крупного рогатого скота.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «Гродненский государственный аграрный университет». Объектом наших исследований являлся генетический материал (ушной выщип) высокопродуктивного крупного рогатого скота (n=100 голов), содержащегося в СПК им. Сенько Гродненского района Гродненской области Республики Беларусь.

ДНК-диагностику генотипов гена LTF проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Ядерную ДНК выделяли перхлоратным методом.

Для амплификации участка гена LTF, использовали следующие праймеры:

-F 5' – GCCTCATGACAACCTCCCACAC- 3';

- R: 5' - CAGGTTGACACATCGGTTGAC-3'.

ПЦР-программа включает в себя следующий режим: «горячий старт» при 94°C в течение 5 мин, 35 циклов: денатурация при 94°C – 45 с, отжиг праймеров при 62°C – 45 с, синтез при температуре 72°C – 45 сек; далее элонгация при 72°C – 5 мин. Реакционная смесь включает

в себя 10X ПЦР буфер, MgCl₂, прямой и обратный праймер, dNTP, Taq-полимеразу, дистиллированную воду и исследуемое ДНК.

Для генотипирования по локусу лактоферрина использовали эндонуклеазу EcoRI, которая имеет сайт рестрикции GAATC/C и продукт амплификации с длиной 301 п. н. Рестрикция проводится при температуре 37°C в течение 16 ч.

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе проведения обработки методом ПЦР-ПДРФ-анализа было определено наличие полиморфизма гена LTF. При проведении амплификации был получен продукт с длиной 300 п. н. (рисунок 1).

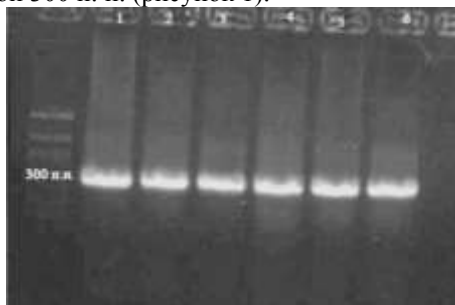


Рисунок 1 – Результат амплификации гена лактоферрина крупного рогатого скота с праймерами LTFf + LTFr. Обозначения: 1, 2, 3, 4, 5, 6 – 300 п. н.

При расщеплении продукта амплификации ПЦР с помощью эндонуклеазы EcoRI были идентифицированы следующие генотипы: LTF AA – 300 п. н., LTF AB – 300, 200, 100 п. н. Генотип LTF BB идентифицирован не был (рисунок 2).

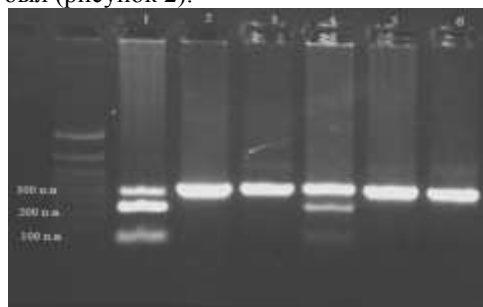


Рисунок 2 – Результат ПЦР-ПДРФ-анализа гена лактоферрина крупного рогатого скота с эндонуклеазным расщеплением ферментом EcoRI. Обозначение: 1, 4 – генотип AB (300/200/100 п. н.); 2, 3, 5, 6 – генотип AA (300 п. н.)

Заключение. 1. Анализ данных свидетельствует о возможности использования гена лактоферрина в качестве ДНК-маркера устойчивости к маститу. 2. Разработка и адаптация методики генотипирования крупного рогатого скота по гену лактоферрина позволит проводить селекцию на увеличение частоты встречаемости предпочтительного генотипа в популяциях животных и создавать стада с повышенной устойчивостью к маститу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генотипирование племенных животных с помощью молекулярно-генетических методов (методические рекомендации) / Е. С. Усенбеков [и др.]. – Алматы: Айтумар, 2014. – 81 с.
2. Как победить мастит: учеб. пособие для компании GEA Farm Technologies GmbH / В. Нельсон Филпот, Штефан С. Никерсон. – 2012. – С. 12-17, 70-72.
3. Analysis of lactoferrin gene polymorphism and its association to milk quality and mammary gland health in holstein-friesian cows / Maletić M., Vakanjac Slo-bodanka, Djelić N., Lakić Nada, Pavlović M., Nedić Svetlana, Stanimirović Z. // Acta Veterinaria (Beograd). – 2013. – № 5-6. – P. 487-498.
4. An integrated map of cattle candidate genes for mastitis: a step forward to new genetic markers / J. Ogorovc, T. Kunej, P. Dovc / Acta agriculture Slovenica. – 2008. – № 2. – P. 85-91.
5. Association of polymorphism within LTF gene promoter with lactoferrin concentration in milk of Holstein cows / T. Zabołewicz, M. Barcewicz, P. Brym, P. Puckowska, S. Kamiński // Polish Journal of Veterinary Sciences. – 2014. – № 4. – P. 633-641.
6. Association between bovine lactoferrin gene variant and somatic cell count in milk based on EcoRI restriction site/ Hemati Doust [and others]. // Iranian Journal of Veterinary Research. – 2013. – P. 62-65.
7. Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression relation to mastitis resistance / A/ Pawlik, G. Sender, A. Korwin-Kossakovska // Animal Science Papers and Reports. – 2009. – № 4. – P. 263-271.
8. Study of lactoferrin gene polymorphism in Iranian Holstein cattle using PCR-RFLP technique / A. Sharifzadeh, A. Doosti // Global Veterinaria. – 2011. – № 6 (6). – P. 530-536.