



УДК 575.174.015.3: 612.1:636.237.23

Н.Н. КОЧНЕВ, доктор биологических наук, профессор,**Т.И. КРЫЦЫНА**, аспирантка,**Р.Б. АЙТНАЗАРОВ***, кандидат биологических наук, научный сотрудник,**Г.М. ГОНЧАРЕНКО****, доктор биологических наук, заведующая лабораторией,**Н.С. ЮДИН***, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник*ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный аграрный университет,***ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН,**** ГНУ Сибирский научно-исследовательский институт животноводства Россельхозакадемии**e-mail: kochnev@nsau.edu.ru*

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА -824 A/G ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ КОРОВ¹

Исследовано влияние полиморфизма –824 A/G гена TNF- α на молочную продуктивность коров красной степной породы СХА ПЗ «Степной» Немецкого национального района Алтайского края. Ген TNF- α кодирует цитокин, регулирующий иммунный ответ. Ранее показано, что полиморфизм –824 A/G гена TNF- α влияет на развитие молочной железы, продолжительность сервис-периода, а также продуктивность коров в зависимости от пола рожденного теленка. В выборке из 148 животных частоты генотипов G/G, G/A и A/A были соответственно 56, 38 и 6 % при частоте аллеля G 75 % и аллеля A – 25 %. Распределение частот генотипов соответствовало равновесию Харди – Вайнберга. Животные, имеющие генотип G/A, достоверно превосходили по удою за третью лактацию животных с генотипом G/G на 10 %, а также по количеству молочного жира и белка за третью лактацию на 9 и 11 % соответственно. По другим показателям (удой, выход жира и белка за первую лактацию, за наивысшую лактацию, среднее за четыре лактации) достоверных различий не обнаружено.

Ключевые слова: красная степная порода, полиморфизм, фактор некроза опухоли альфа, TNF- α , молочная продуктивность, ДНК-маркер.

Селекционно-племенная работа в продуктивном животноводстве обладает методами, позволяющими использовать биологические характеристики организма животного в качестве маркеров хозяйственно полезных признаков. После разработки в середине 80-х годов XX в. технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР) удалось открыть новый класс генетических маркеров, определение которых основано на полиморфизме ДНК. Быстрое развитие методов анализа ДНК привело к увеличению количества ДНК-маркеров и разработке маркерной селекции (marker associated selection). Как известно, количественные признаки имеют полигенный характер наследования и контролируются множеством генов, локализованных в различных локусах ДНК. Среди них выделяют полигены с аддитивным эффектом, олигогены, гены-модификаторы, вклад которых в формирование признаков продуктивно-

¹ Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-00968-а) и экспедиционного гранта СО РАН.

сти различен [1]. Установлены связи молочной продуктивности с генами каппа-казеина [2], альфа-лактальбумина [3], бета-лактоглобулина [4], соматотропина [5] и др. Изучение генетических маркеров на уровне ДНК продолжается не только по генам, прямо влияющим на признаки молочной продуктивности, но и по генам, непосредственно не связанным с этими признаками, исходя из возможного их сцепленного наследования или плейотропного действия генов-кандидатов.

Фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) представляет собой белок, относящийся к классу цитокинов. TNF- α образуется в активированных макрофагах, тучных клетках, клетках нейроглии и в ряде случаев продуцируется активированными Т-лимфоцитами. TNF- α является многофункциональным белком, оказывающим цитотоксическое действие как на опухолевые клетки, так и на клетки, пораженные вирусами, а также стимулирует образование других активных веществ (простагландинов, тромбоксана), обладает иммуномодулирующим и противовоспалительным действием, активирует систему гемостаза, играет важную роль в развитии молочной железы [6, 7]. В ряде работ показана ассоциация полиморфизма -824 A/G в промоторе гена TNF- α с продолжительностью сервис-периода [8], молочной продуктивностью коров в зависимости от пола теленка [9] и с уровнем удоев коров черно-пестрой породы [10].

Цель исследования – изучить генетическую структуру стада красной степной породы по полиморфизму -824 A/G гена фактора некроза опухоли и выявить вероятную связь этого полиморфизма с показателями молочной продуктивности.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены на 148 коровах красной степной породы СХА ПЗ «Степной» Алтайского края. Данные по молочной продуктивности получены на основе зоотехнического учета. Геномную ДНК выделяли с помощью стандартного метода протеолитической обработки с последующей экстракцией фенол-хлороформом. Однонуклеотидный полиморфизм гена TNF- α -824 A/G изучали методом ПЦР-ПДРФ с использованием прямого праймера 5'-CCGAGAAATGGGACAACCT-3' обратного праймера 5'-GCCATGTATCCCCAAAGAAT-3'. Амплификацию фрагмента размером 145 п.н. проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 75 мМ ТрисHCl (pH 9,0), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01%-й твин, 3 мМ MgCl₂, по 200 мкМ каждого dNTP, по 1 мкМ каждого праймера, 2,5 ед. активности Taq-полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск), 6%-й глицерин и 0,5-1 мкг ДНК в течение 35 циклов (95 °С – 30 с, 62 °С – 30 с, 72 °С – 30 с) с предварительной денатурацией при 95 °С – 3 мин. Продукт амплификации подвергали рестрикции ферментом EcoICRI («СибЭнзим», Россия) при условиях, рекомендуемых производителем. Ампликон 145 п.н. или оставался неразрезанным (аллель G), или разрезался на фрагменты 81 и 64 п.н. (аллель A). Электрофоретический анализ фрагмента проводили в 4 % ПААГ с добавлением бромистого этидия.

Статистический анализ осуществляли с помощью компьютерной программы Microsoft Excel. Оценку достоверности различий показателей молочной продуктивности коров с разными генотипами проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ частоты генотипов по полиморфизму -824 A/G гена TNF- α в стаде красной степной породы выявил, что 38 % составляли гетерозиготные коровы G/A, 56 – гомозиготные G/G и 6 % – гомозиготные A/A (табл. 1). Частота встречаемости аллеля G составила 75 %, аллеля A – 25 %. Общая степень гомозиготности по этому гену в стаде – 62 %. Проверка нулевой гипотезы методом χ^2 показала соответствие наблюдаемого количества особей разных генотипов теоретически ожидаемому по распределению Харди – Вайнберга, что указывает на генетическое равновесие в стаде.

Учитывая высокую встречаемость аллеля G в выборке, можно предполагать его селективное преимущество по отношению к аллелю A. У коров черно-пестрой и серой украинской породы частота аллеля G составляет 58 и 48 % соответственно [9]. Повышенная частота встречаемости аллеля G установлена также у якутского скота (77 %) и зубров (100 %), что может быть следствием естественного отбора животных, живущих в экстремальных условиях среды [9]. Не исключено также, что повышенная частота аллеля G в красной степной породе связана с эффектом основателя.

Ранее проведенное исследование коров красной степной породы показало, что частота встречаемости аллелей A и G исследованного нами полиморфизма у животных была приблизительно одинаковой [10]. Однако необходимо учитывать, что структура племенного стада зависит от множества факторов, в том числе эффекта производителя – носителя того или иного аллеля. В связи с этим генотипическое разнообразие в разных стадах в отсутствие панмиксии может существенно отличаться даже в пределах одной породы.

Проанализированы показатели молочной продуктивности в группах коров, различающихся по генотипу гена TNF- α (табл. 2). Средний возраст животных в группах составлял четыре лактации, что позволяет сравнивать показатели по реализованной за этот период молочной продуктивности. При относительно невысокой фенотипической изменчивости удоя (в пределах 20 %) установлено повышение этого показателя на 10 % в группе коров генотипа G/A по третьей лактации по сравнению с удоем коров генотипа G/G ($p < 0,01$). Кроме этих достоверных различий наблюдалась

Таблица 1
Генетическая структура стада коров красной степной породы по полиморфизму -824 A/G гена TNF- α

Показатель	Генотип			Частоты аллелей и генотипов
	G/G	G/A	A/A	
Наблюдаемое число особей	83	55	10	P (G/G) = 56 % P (G/A) = 38 % P (A/A) = 6 %
Теоретически ожидаемое число особей	83	56	9	P(G) = 0,75 P(A) = 0,25
Разность	0	1	1	$\chi^2 = 0,11$

Таблица 2

Удой коров разных генотипов по полиморфизму -824 A/G гена TNF-а

Лактация	Показатель	Генотип		
		G/G (n = 83)	G/A (n = 55)	A/A (n = 10)
Первая	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, кг	3518 $\pm$ 64	3601 $\pm$ 98	3515 $\pm$ 210
	lim, кг	2242–5550	2428–5032	2591–4512
	σ , кг	587	724	665
	Cv, %	17	20	19
Третья	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, кг	3766 $\pm$ 87	4170 $\pm$ 132**	3886 $\pm$ 233
	lim, кг	2052–6175	2942–6594	3375–4676
	σ , кг	748	832	521
	Cv, %	20	20	13
Наивысшая	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, кг	4549 $\pm$ 90	4553 $\pm$ 130	4212 $\pm$ 350
	lim, кг	3023–6723	3022–6594	3060–5657
	σ , кг	796	913	990
	Cv, %	17	20	24
Средняя за четыре лактации	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, кг	3833 $\pm$ 58	3876 $\pm$ 78	3706 $\pm$ 274
	lim, кг	2897–5040	2871–5034	2859–5135
	σ , кг	510	547	775
	Cv, %	13	14	21

Здесь и в табл. 3.

* $p < 0,05$.** $p < 0,01$ по сравнению с группой G/G.

тенденция к превышению удоя у гетерозигот G/A по отношению к гомозиготам A/A ($p < 0,05$). Известно, что одним из условий устойчивого воспроизводства популяции является поддержание оптимального уровня генетического разнообразия как основы естественного отбора и характерное распределение генетических классов по отдельным локусам, соответствующим гомо- и гетерозиготам [11]. При этом гетерозиготы могут иметь преимущество по ряду признаков адаптации, возможно и по молочной продуктивности. Хотя достоверных различий по первому, наивысшему и среднему за все лактации удою между коровами разных генотипов не установлено, факт превосходства гетерозигот по отношению к гомозиготам по удою за третью лактацию свидетельствует об их возможном селективном преимуществе.

Результаты оценки жирно- и белкомолочности коров в зависимости от генотипов гена TNF- α подтверждают выводы, сделанные при анализе удоев (табл. 3). Несмотря на отсутствие статистически значимых различий между коровами разных генотипов по проценту жира и белка в молоке, количество молочного жира и белка за третью лактацию у гетерозигот G/A было на 9 и 11 % соответственно выше ($p < 0,05$) по сравнению с гомозиготами G/G.

Таблица 3

Жиро- и белковомолочность коров в зависимости от генотипов по полиморфизму -824 A/G гена TNF- α

Показатель	Генотип					
	G/G (n = 83)		G/A (n = 55)		A/A (n = 10)	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Cv	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Cv	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Cv
<i>Первая лактация</i>						
Жирномолочность, %	4,40 $\pm$ 0,03	5	4,39 $\pm$ 0,01	5	4,39 $\pm$ 0,01	5
Белковомолочность, %	2,98 $\pm$ 0,01	3	2,98 $\pm$ 0,01	2	2,97 $\pm$ 0,01	3
Количество молочного жира, кг	155,3 $\pm$ 2,9	17	160,8 $\pm$ 3,0	15	154,2 $\pm$ 9,0	19
Количество молочного белка, кг	104,6 $\pm$ 3,5	20	106,6 $\pm$ 3,0	15	101,1 $\pm$ 8,0	20
<i>Третья лактация</i>						
Жирномолочность, %	4,39 $\pm$ 0,03	5	4,41 $\pm$ 0,01	6	4,39 $\pm$ 0,01	2
Белковомолочность, %	2,98 $\pm$ 0,01	3	3,00 $\pm$ 0,01	4	2,97 $\pm$ 0,01	2
Количество молочного жира, кг	167,5 $\pm$ 4,1	21	183,7 $\pm$ 6,0*	19	170,6 $\pm$ 10	13
Количество молочного белка, кг	112,2 $\pm$ 2,9	21	125,6 $\pm$ 5,0*	23	115,7 $\pm$ 8,0	14
<i>Наивысшая лактация</i>						
Жирномолочность, %	4,29 $\pm$ 0,01	5	4,28 $\pm$ 0,01	4	4,34 $\pm$ 6,0	6
Белковомолочность, %	3,04 $\pm$ 0,01	4	3,04 $\pm$ 0,01	4	3,09 $\pm$ 0,01	5
Количество молочного жира, кг	195,1 $\pm$ 3,7	17	194,8 $\pm$ 6,0	20	182,6 $\pm$ 15	23
Количество молочного белка, кг	139,8 $\pm$ 3,1	19	140,0 $\pm$ 5,0	23	130,6 $\pm$ 12	26
<i>В среднем за четыре лактации</i>						
Жирномолочность, %	4,35 $\pm$ 0,01	2	4,36 $\pm$ 0,01	3	4,34 $\pm$ 0,01	2
Белковомолочность, %	3,01 $\pm$ 0,01	2	3,00 $\pm$ 0,01	2	3,03 $\pm$ 0,01	1
Количество молочного жира, кг	166,7 $\pm$ 2,5	13	168,1 $\pm$ 3,4	14	160,9 $\pm$ 12	20
Количество молочного белка, кг	115,3 $\pm$ 2,0	14	116,5 $\pm$ 2,0	15	112,5 $\pm$ 8,0	21

Ранее были установлены достоверные различия по удою за 305 дней первой лактации между животными красной степной породы с разным генотипом по полиморфизму -824 G/A гена TNF- α [10]. Наивысший удой отмечен у гомозигот G/G, гетерозиготы занимали промежуточное положение по этому показателю. В наших исследованиях обнаружено сверхдоминирование гетерозигот по сравнению с гомозиготами лишь за третью лактацию. Наблюдаемые противоречия могут быть связаны как с особенностями технологии содержания скота в различных хозяйствах (взаимодействие генотип – среда), так и с локальными генетическими особенностями популяций красной степной породы (взаимодействие между различными генами). В пользу последнего предположения свидетельствует

наличие межпородных особенностей ассоциации изученного полиморфизма с удоями. Так, животные черно-пестрой породы с гетерозиготами G/A имели сниженный средний удой за пять лактаций по сравнению с ко-ровами с гомозиготами G/G [9].

Таким образом, результаты исследований коров по полиморфизму в гене TNF- α свидетельствуют о наличии ассоциации его с показателями молочной продуктивности, что позволяет за счет включения в традицион-ные селекционные правила отбора коров с эффективными генотипами G/A достичь в более короткие сроки увеличения молочной продукции в стадах красной степной породы.

ВЫВОДЫ

1. Частота встречаемости генотипов G/G, G/A и A/A в стаде красной степной породы составляла 56, 38 и 6 % соответственно при частоте аллелей G и A – 75 и 25 %.

2. Коровы с генотипом G/A имели превосходство по удою, количеству жира и белка за третью лактацию в среднем на 10 % по сравнению с гомо-зиготами G/G.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Петухов В.Л., Жигачёв А.И., Назарова Г.А. Ветеринарная генетика. – М.: Колос, 1996. – 384 с.
2. Горячева Т.С. Полиморфизм к-казеина и его влияние на молочную продуктивность коров симментальской породы в Республике Алтай // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2011. – № 11-12. – С. 60–64.
3. Сельцов В.И., Костюнина О.В., Загороднев Ю.П. и др. Оценка молочной продуктивности коров разных пород в связи с полиморфизмом по гену альфа-лактальбумина // Достиже-ния науки и техники АПК. – 2013. – № 3. – С. 57–60.
4. Валитов Ф., Ракина Ю., Гареева И., Долматова И. Влияние полиморфизма гена В-лакто-глобулина крупного рогатого скота на качество молока // Молоч. и мясн. скотоводство. – 2011. – № 6. – С. 15–16.
5. Урядников М.В. Молочная продуктивность черно-пестрых коров с разным генотипом по гену соматотропина // Зоотехния. – 2010. – № 8. – С. 2–3.
6. Кевра М.К. Фактор некроза опухолей: изучение роли в организме // Мед. новости. – 1995. – № 8. – С. 3–22.
7. Warren M.A. et al. Tumor necrosis factor deficiency inhibits mammary tumorigenesis and a tumor necrosis factor neutralizing antibody decreases mammary tumor growth in neu/erbB2 transgenic mice // Mol. Cancer Ther. – 2009. – № 8. – P. 2655–2663.
8. Shirasuna K., Kawashima C., Murayama C. et al. Relationships between the first ovulation postpartum and polymorphism in genes relating to function of immunity, metabolism and reproduction in high-producing dairy cows // J. Reprod. Dev. – 2011. – N 57. – P. 135–142.
9. Yudin N.S. et al. Association of polymorphism harbored by tumor factor alpha gene and sex of calf with lactation performance in cattle // Asian Australas. J. Anim. Sci. – 2013. – Vol. 26, N 10. – P. 1379–1387.
10. Люханов М.П., Короткевич О.С., Себежко О.И., Юдин Н.С. Однонуклеотидный полимор-физм в популяции крупного рогатого скота красной степной породы // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 1. – С. 326.
11. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. – М.: Наука, 1989. – 328 с.

Поступила в редакцию 17.07.2014

N.N. KOCHNEV, Doctor of Science in Biology, Professor,
T.I. KRYTSYNA, Postgraduate,
R.B. AITNAZAROV*, Candidate of Science in Biology, Researcher,
G.M. GONCHARENKO**, Doctor of Science in Biology, Laboratory Head,
N.S. YUDIN***, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher

Novosibirsk State Agrarian University,
*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
**Siberian Research Institute of Animal Husbandry,
Russian Academy of Agricultural Sciences,
*** Novosibirsk State University
e-mail: kochnev@nsau.edu.ru

INFLUENCE OF -824 A/G POLYMORPHISM IN THE TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA GENE ON MILK PERFORMANCE TRAITS IN RED STEPPE CATTLE

The influence of -824 A/G polymorphism in the TNF- α gene on milk performance traits in Red Steppe cattle was studied. The tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) gene encodes a pleiotropic cytokine that plays a critical role in immune response and mammary gland development. Recently, it was found that TNF- α -824 A/G gene polymorphism in cattle is associated with recovery of ovarian activity postpartum and with the reproductive efforts of cows over the course of lactation events depending on the sex of progeny. Among the 148 animals sampled, genotype frequencies of G/G, G/A, and A/A were 56, 38, and 6%, respectively, where frequency of allele G was 75%, and frequency of allele A was 25%. Milk yield, milk fat yield, and milk protein yield for third lactation were significantly higher in heterozygotes G/A compared to G/G homozygotes (10%, 9%, and 11%, respectively). No significant associations were found for other milk performance traits (milk yield, milk fat yield, and milk protein yield for first lactation, highest lactation, and average yield for all lactations).

Keywords: Red Steppe cattle, polymorphism, tumor necrosis factor-alpha, TNF- α , milk production, DNA marker.

УДК 636.082:619:636.22

К.Н. НАРОЖНЫХ, заведующий лабораторией

ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный аграрный университет
e-mail: nkn.88@mail.ru

СОДЕРЖАНИЕ, ИЗМЕНЧИВОСТЬ И КОРРЕЛЯЦИЯ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ВОЛОСЕ ГЕРЕФОРДСКОГО СКОТА

Приведены результаты исследования концентрации алюминия, кобальта, меди, никеля, титана и железа в волосе у быков герефордской породы в возрасте 17–18 мес, выращенных в условиях Западной Сибири. Для анализа отобрано 17 образцов волоса животных. Уровень химических элементов в волосе определяли методом атомно-эмиссионного спектрального анализа. Анализ проводили на двухструйном дуговом плазмотроне «Факел» и многоканальном атомно-эмиссионном спектрометре «Гранд». Установлена избирательность в аккумуляции химических элементов в волосе. Концентрацию содержания тяжелых металлов в волосе можно изобразить в виде ранжированного ряда: кобальт < никель < титан < медь < алюминий < железо в соотношении 1 : 2,5 : 4,6 : 42,8 : 94 : 278,7. Выявлен ряд положительных корреляций между парами элементов. Установлены значительные различия между отдельными животными по способности аккумуляции алюминия и титан в волосе. Уровень алюминия в волосе характеризуется высокой фенотипической изменчивостью, концентрация меди – относительно низкой.

Ключевые слова: герефордский скот, корреляция, химический элемент, тяжелые металлы.