

discussed. The method of successive polyploidization is proposed for constructing of bisexual tetraploid race of silkworm. It is shown, that traditional breeding techniques, combined with the methods of cloning, polyploidy form creation and lethal elimination are the means to create the open parthenozygotic population of the silkworm that will be most adequate to solve the problems of Ukrainian sericulture.

Key words: sericulture, parthenocloning, polyploidy, lethality, variability



УДК 636.2.082:575.113.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ МУТАНТНОГО АЛЛЕЛЯ, ВЫЗЫВАЮЩЕГО КОМПЛЕКС АНОМАЛИЙ ПОЗВОНОЧНИКА (СVM) ЧЕРНО-ПЕСТРОГО СКОТА

**С.Н. МАРЗАНОВА¹, Д.А. ДЕВРИШОВ¹, И.С. ТУРБИНА¹,
В.А. НАГОРНЫЙ¹,**

**Я.И. АЛЕКСЕЕВ², Н.В. КОНОВАЛОВА², Д.Г. СОЧИВКО²,
П.И. ЛЮЦКАНОВ³,**

М.Х. ТОХОВ⁴, Н.С. МАРЗАНОВ⁴

*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии
имени К.И. Скрябина¹*

*Государственное Научное Учреждение Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Закрытое
Акционерное Общество «Синтол»²*

*Научно-практический институт биотехнологий в зоотехнии и ветеринарной
медицины Академии наук Молдовы³*

*Государственное Научное Учреждение Всероссийский научно-исследовательский
институт животноводства Россельхозакадемии⁴*

*Приводится краткая характеристика метода определения аллеля, вызывающего
комплекс аномалий позвоночника (СVM) черно-пестрого скота, разводимого в Рос-*

© С.Н. Марзанова, Д.А. Девришов, И.С. Турбина,
В.А. Нагорный, Я.И. Алексеев, Н.В. Коновалова,
Д.Г. Сочивко, П.И. Люцканов, М.Х. Тохов, Н.С. Марзанов, 2013

Розведення і генетика тварин. 2013. № 47

сии. Анализ образцов спермы и крови 488 животных из различных регионов Российской Федерации с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR) показал, что гетерозиготными носителями аллеля 559T гена SLC35A3 являются 10 животных (2,0%), а число особей с нормальным генотипом – 478 (98,0%). Частота аллеля SVM составила 0,01.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, RT-PCR, SVM, аллель

Введение. По данным ФАО, ареал голштинской породы черно-пестрой масти охватывает 128 государств мира. Жесткая селекционная работа при создании голштинской породы привела к тому, что наряду с высокой продуктивностью выдающиеся быки оказались носителями аллелей наследственных заболеваний. Эти мутации распространились по всему миру, являясь «шлейфом» высокой молочной продуктивности. Одним из таких заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования является комплекс аномалий позвоночника (Complex Vertebral Malformation, SVM). Причиной болезни является миссенс-мутация в гене *SLC35A3*, замена гуанина на тимин (G559T), в результате в синтезируемом белке происходит замена аминокислоты валина на фенилаланин в 180 позиций (V180F).

Впервые природа этой патологии изучалась у датского голштинского скота в 1999 г., в результате чего и была выявлена мутация, вызывающая развитие SVM. Носителем и главным источником распространения мутантного аллеля явился элитный бык голштинской породы – Карлин М. Айвенго Белл 1667366 [1, 2]. Он оказал огромное влияние на улучшение молочной продуктивности у черно-пестрого скота не только в Российской Федерации, но и во всем мире.

Данная мутация выявлена у черно-пестрого скота многих стран мира. В гомозиготном состоянии аллель SVM вызывает высокую эмбриональную смертность, массовые аборт, большое число мертворожденных телят. Телята, гомозиготные по аллелю SVM, при рождении имеют множественные анатомические отклонения, затрагивающие шейную и грудную области позвоночника, что проявляется уменьшенным числом ребер и контрактурами конечностей.

Метод молекулярной диагностики этого наследственного заболевания был запатентован датскими учеными, а позднее и в других странах. Начиная с 2007 г., в открытой печати появляются новые методы молекулярно-генетической идентификации SVM [4, 5]. Однако в условиях Российской Федерации они потребовали существенной доработки.

Целью данной работы являлась разработка и внедрение в практику метода выявления аллеля SVM у чёрно-пестрого скота, установление его частоты, анализ родословных быков-носителей данной мутации.

Материалы и методы исследований. Проведено исследование 488 образцов спермы и крови черно-пестрого скота на наличие аллеля SVM. От быков было получено 462 образца и 26 образцов – от коров. ДНК выделяли из образцов спермы быков и венозной крови коров с помощью фенольно-хлороформного

[6] и сорбентного (ДНК-сорб-В, ЗАО «Синтол») методов. RT-PCR (Real-time Polymerase Chain Reaction) проводили на приборе «Rotor Gene Q» («Corbett Research», Австралия). Реакционная смесь имела следующий состав: 50 мМ KCl, 50 мМ TRIS-HCl, 250 нМ dNTP, 2,5 мМ MgCl₂, 2,5 ед. ДНК-полимеразы Syntaq. Праймеры использовали в концентрации 200 нМ, флуоресцентные зонды – в концентрации 100 нМ. Все реактивы произведены компанией «Синтол».

Для детекции мутаций в исследуемом фрагменте генома применялись аллельспецифические зонды. Они были подобраны таким образом, чтобы один из зондов специфически гибридизовался при температуре проведения элонгации цепей с аллелем нормального типа, а второй зонд – с мутантным. Зонды метили разными флуорофорами, а результаты реакции с ними регистрировались при проведении RT-PCR на двух различных каналах детекции прибора «Rotor Gene Q» («Corbett Research», Австралия). После отработки всей методологии и выявления мутантного аллеля формировали генеалогии быков, у которых по результатам RT-PCR был выявлен аллель SVM.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием общепринятых методов, частоту аллелей и генотипов по гену *SLC35A3* определяли с помощью критерия χ^2 [7].

Результаты исследований и их обсуждение. Под генетической генеалогией мы понимаем характеристику родословных, составленную на основе результатов ДНК-тестов и традиционных методов исследования. В первую очередь был проведен анализ спермы черно-пестрого быка Пломбира 998. Бык Пломбир 998 принадлежал племенному хозяйству ОАО «Смоленское». После закупки его семени в регионы Северного Кавказа он был широко использован в популяции черно-пестрой породы, разводимой в условиях двух северокавказских республик – Кабардино-Балкарии и Ингушетии. Несмотря на его известную родословную и отсутствие результатов генетического тестирования на носительство аллелей двух моногенных заболеваний – SVM и VLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency), сперма этого быка интенсивно использовалась для осеменения коров в племенных хозяйствах двух республик.

Отцом быка Пломбира 998 был Пионер 188. Бык-производитель Пионер 188 принадлежал ОАО ГЦВ из Московской области и являлся сыном Карлин М. Айвенго Белла 1667366. Сам Карлин М. Айвенго Белл 1667366 был сыном Пенстейт Айвенго Стар 1441440, который передал своему сыну два мутантных аллеля, обуславливающих VLAD и SVM. Однако бык Пионер 188 не был тес-тирован на носительство аллелей двух наследственных заболеваний – VLAD и SVM, поскольку он использовался в системе племенной службы СССР, а позднее и Российской Федерации, до разработки методов молекулярной диагностики наследственных аномалий.

Пломбир 998 получил обе мутации от отца Пионера 188. Линия быка Монтвика Чифтейна 95679, куда входит Пионер 188, является одной из консолидированных популяций в голштинской породе. Она дает лучших высокопродуктивных потомков, поэтому при отборе ремонтного молодняка специалисты ОАО ГЦВ всегда используют эту информацию.

Исследование 488 животных черно-пестрого скота из различных регионов Российской Федерации по выявлению аллеля SVM показало, что гетерозиготными носителями мутации являются 10 животных, или 2,0%, а число особей с нормальным генотипом оказалось соответственно равным 478 или 98,0%.

Частота аллеля SVM в исследованной выборке черно-пестрого скота составила 0,01. При этом сравнение ожидаемого и наблюдаемого числа генотипов выявило отсутствие нарушения генетического равновесия по гену *SLC35A3* в исследованной группе животных ($\chi^2=0,11$; $df=1$; $P > 0,05$).

Проведенное исследование показало, что быки Голливуд 64, Бэтман 8694, Спектр 1729, Кубок 1459, Кодек 1452 (Российская Федерация) являются носителями аллеля SVM. Из генеалогического анализа полученных материалов следует, что эти животные были правнуками и праправнуками Карлин М. Айвенго Белла 1667366. Из 5 быков-носителей в племенной сети России были использованы только два – Кубок 1459 и Кодек 1452.

В ряде генетических лабораторий Российской Федерации накоплен большой опыт по молекулярной диагностике дефицита лейкоцитарной адгезии (BLAD) у чистопородных и помесных животных голштинской породы [3, 8, 9]. Полученные данные заносятся в периодически издаваемые каталоги быков. Что же касается комплекса аномалий позвоночника, то проведение молекулярной диагностики SVM в Российской Федерации в течение длительного времени было затруднено в связи с невозможностью приобретения патента на диагностику, разработанного датскими учеными. Создание предложенной методической базы даст возможность удешевить тестирование быков на носительство аллеля SVM в условиях России.

Выводы. RT-PCR метод диагностики аллеля SVM, вызывающего комплекс аномалий позвоночника у крупного рогатого скота, предложен в Российской Федерации. Проведен анализ носительства аллеля SVM у элитных быков и племенных коров. Анализ родословных элитных быков-производителей позволил заложить основы ветеринарно-медицинского консультирования по предупреждению молекулярных болезней на современном этапе разведения молочного скота.

Благодарность. Выражаем благодарность руководству Открытого акционерного общества «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных» (пос. Быково Московской области), руководству Открытого акционерного общества «Кабардино-Балкарское» по воспроизводству и биотехнологиям (г. Нальчик, КБР), оказавшим помощь в сборе биологического материала для проведения научных исследований.

1. *Complex vertebral malformation in Holstein calves* / J.S. Agerholm [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2001. – Vol. 13. – P. 283–289.

2. *Evaluation of the inheritance of the complex vertebral malformation syndrome by breeding studies* / J.S. Agerholm [et al.] // Acta. Vet. Scand. – 2004. – Vol. 45. – P. 133–137.

3. *Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Holstein and Braun Swiss AI bulls in Iran / A. Norouzy [et al.] // Genetica. – 2005. – Vol. 41. – N12. – P. 1697–1701.*

4. *Rusc A. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls / A. Rusc, S. Kaminski // J. Appl. Genet. – 2007. – Vol. 48. – N 3. – P. 247–252.*

5. *Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based Testing on disease frequency in the Holstein population / E. Schutz, M. Scharfenstein, B. Brenig // J. Dairy Sci. – 2008. – Vol. 91. – P. 4854–4859.*

6. *Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук : пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 322 с.*

7. *Марзанов Н.С. Иммунология и иммуногенетика овец и коз / Марзанов Н.С. – Кишинев: Изд-во «Штиинца», 1991. – 238 с.*

8. *Геногеография BLAD в популяциях черно-пестрого скота России и за рубежом / Н. Марзанов [и др.] // Молочное и мясное скотоводство. – 2008. – N 4. – P. 2–5.*

9. *Марзанов Н.С. Скрининг гена дефицита лейкоцитарной адгезии у черно-пестрого голштинизированного скота / Н.С. Марзанов [и др.]. – Сельскохозяйственная биология. – 2003. – N 6. – P. 23–30.*

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ДІАГНОСТИКИ МУТАНТНОГО АЛЕЛЯ, ЩО ВИКЛИКАЄ КОМПЛЕКС АНОМАЛІЙ ХРЕБТА (CVM) У ЧОРНО-РЯБОЇ ХУДОБИ

С.Н. Марзанова¹, Д.А. Деврішов¹, І.С. Турбіна¹, В.А. Нагорний¹, Я.І. Алексєєв², Н.В. Коновалова², Д.Г. Сочівко², П.І. Люцканов³, М.Х. Тохов⁴, Н.С. Марзанов⁴

Московська державна академія ветеринарної медицини та біотехнології імені К. І. Скрябіна¹

Державна Наукова Установа Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської біотехнології Россельхозакадемії, Закрите Акціонерне Товариство «Синтол»²

Науково-практичний інститут біотехнологій в зоотехнії та ветеринарної медицини Академії наук Молдови³

Державна Наукова Установа Всеросійський науково-дослідний інститут тваринництва Россельхозакадемії⁴

Наводиться коротка характеристика методу визначення алеля, що викликає комплекс аномалій хребта (CVM) у чорно-рябої худоби, що розводиться в Росії. RT-PCR аналіз зразків сперми і крові 488 тварин з різних регіонів Російської Федерації показав, що гетерозиготними носіями алеля 559T гена SLC35A3 є 10 тварин (2,0%), а кількість особин з нормальним генотипом – 478 або 98,0%. Частота алеля CVM склала 0,01.

Ключові слова: PCR-RT, CVM, велика рогата худоба, алель

USE OF THE TEST SYSTEM FOR THE MUTANT ALLELE CAUSING COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION (CVM) IN BLACK AND WHITE CATTLE

S.N. Marzanova¹, D.A. Devrishov¹, I.S. Turbina¹, V.A. Nagorny¹, Ya.I. Alekseev²,
N.V. Konovalova², D.G. Sochivko², P. I. Liutskanov³, M.Kh. Tokhov⁴, N.S. Marzanov⁴

*The Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after
K.I. Skriabin¹*

*State Scientific Institution All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural
Biotechnology, Agricultural Academy of Russia, Closed Joint Stock Company «SINTOL»²
Scientific and Practical Institute of Biotechnology in Animal Husbandry and Veterinary
Medicine, Academy of Sciences of Moldova³*

*State Scientific Institution All-Russian Scientific Research Institute of Animal of
Agricultural Academy of Russia⁴*

The article presents short characteristics of DNA isolation method developments hereditary disease mutant allele ascertainment, particularly a vertebral anomalies complex and CV allele in Black-and-White cattle bred in Russia. Analysis of semen and blood of 488 animals in different regions of the Russian Federation on mutant CV allele ascertainment has shown that heterozygous mutation carriers are 10 animals or 2,0%, and 478 units or 98,0% have appeared to be normal-genotype animals.

Key words: PCR-RT, CVM, cattle, allele



УДК 636.2.082:575.113.1

ПОПУЛЯЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЯК ОБҐРУНТУВАННЯ ШЛЯХІВ ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ СВИНЕЙ МИРГОРОДСЬКОЇ ПОРОДИ

О.І. МЕТЛИЦЬКА¹, В.Ю. НОР²

Інститут розведення і генетики тварин НААН (Чубинське, Україна)¹

Інститут свинарства і АПВ НААН (Полтава, Україна)²

metlitska@mail.ru, maestropoltava@rambler.ru

Проведено популяційно-генетичний аналіз свиней миргородської породи із застосуванням сучасних ДНК-технологій. За використання ISSR-праймерів визначено

© О.І. Метлицька, В.Ю. Нор, 2013

Розведення і генетика тварин. 2013. № 47