

PB CONTENT IN WOOD GROUS (*TETRAO UROGALLUS*) BODY IN TOMSK REGION

D. V. Kropachev, Yu. I. Koval

Key words: lead, accumulation, fowl meat, wood grouse, biomonitoring

Summary. The paper presents research data on the study of the degree and characteristics of anthropogenic pollutant accumulation – lead – in the body of wood grouse, Tetrao Urogalis, dwelling in West Siberia. Tetrao Urogalis peculiarities of food behavior in the winter period indicate that in addition to the main source of lead entrance into the fowl body – needles of pine, Pinus sylvestris Linnaeus, those of cedar, Pinus sibirica Du Tour – the entrance of the toxicant with gastroliths which are adsorbents of natural origin is also possible. The following regulations are revealed regarding the distribution of the toxicant in organs and tissues of the fowl obtained in Molchanovsky district of Tomsk region: bone tissue > feather > gastric contents > liver > feces > heart > gizzard stomach > lung > goiter contents. Pb high level in bone tissue and wood grouse feathering afford ground for determining the ecological ill-being in the area of research into Pb content and possibility to use the fowl species concerned as a bioindicator of environmental conditions.

УДК 575.174.015.3: 612.1:636.237.23

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА –824 А/Г ГЕНА
ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА С ПОКАЗАТЕЛЯМИ РОСТА ТЕЛЯТ**

¹Т. И. Крыцына, аспирантка¹Н. Н. Кочнев, доктор биологических наук, профессор¹Е. Б. Голубева, аспирантка²Р. Б. Айтназаров, кандидат биологических наук³Г. М. Гончаренко, доктор биологических наук^{1,2,4}Н. С. Юдин, кандидат биологических наук¹Новосибирский государственный аграрный университет²Институт цитологии и генетики СО РАН³Сибирский НИИ животноводства Россельхозакадемии⁴НИИ терапии СО РАМН

E-mail: krytsyna@list.ru

Ключевые слова: красная степная порода, полиморфизм, фактор некроза опухоли альфа, TNF-α, прирост, масса при рождении

Реферат. Представлены результаты исследований по поиску генетических маркеров роста и развития животных красной степной породы. Эти показатели являются одними из важных селекционных признаков, которые влияют на формирование конституции, экстерьера, продуктивности и жизнеспособности животных. Высокая скорость роста в ранний постнатальный период предпочтительна с экономической точки зрения. Однако в настоящее время существует проблема тяжелых отелов, вследствие которых коровы длительное время не могут восстановить здоровье и полностью реализовать свой потенциал продуктивности. Ген фактора некроза опухоли альфа кодирует многофункциональный белок, который, наряду с функциями иммунного ответа, играет важную роль в общем обмене веществ. Методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов исследован полиморфизм –824 А/Г гена фактора некроза опухоли альфа в стаде коров красной степной породы СХА ПЗ «Степной» Немецкого национального района Алтайского края. Частота редкого аллеля А в исследуемой выборке 57 животных составляла 25 %. Распределение частот генотипов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Установлена достоверная ассоциация генотипа G/A с пониженной массой телят при рождении ($P < 0,05$). По показателям среднесуточных и относительных приростов достоверных различий между животными с разными генотипами в данной выборке не выявлено.

Использование ДНК-маркеров в животноводстве, наряду с традиционными системами оценки, отбора, подбора и прогнозирования, позво-

ляет проводить так называемую MAS-селекцию (marker associated selection), которая существенно ускоряет селекционный процесс, делая его более

точным и менее затратным [1]. Одними из важных селекционных признаков являются показатели роста и развития, которые влияют на формирование будущей конституции, экстерьера, продуктивности и жизнеспособности животных [2, 3]. Высокая скорость роста в ранний постнатальный период предпочтительна с экономической точки зрения. Кроме этого, в настоящее время существует проблема тяжелых отелов, вследствие которых коровы длительное время не могут восстановить здоровье и полностью реализовать свой потенциал продуктивности [4]. В свою очередь, молочная продуктивность животных тесно коррелирует с живой массой [5], поэтому в процессе селекции по удою может увеличиваться масса телят при рождении. Для изучения этих проблем необходимо проводить исследования генетических маркеров, ассоциированных с массой новорожденных телят и прироста в процессе развития. Учитывая полифакториальную обусловленность роста и развития, использование молекулярно-генетического подхода к изучению сложного признака на основе дискретных, относительно устойчивых локусов (QTL), в последнее десятилетие представляется перспективным. Считается, что каждый QTL – это неизвестный аллель одного из полигенов, оказывающий влияние на признак.

Ген фактора некроза опухоли альфа (в англоязычной литературе tumor necrosis factor alpha – TNF- α) кодирует белок, который является многофункциональным цитокином, и, наряду с функциями иммунного ответа, регулирует аппетит, липидный метаболизм, участвует в процессах морфогенеза и пролиферации плода [6]. У крупного рогатого скота ген TNF- α расположен на 23-й хромосоме, в локусе 23q22 в районе кластера генов главного комплекса гистосовместимости BoLA [7]. Показано что однонуклеотидная замена А на G в позиции –824 промотора гена TNF- α приводит к снижению экспрессии мРНК в лейкоцитах коровы [8]. Таким образом, ген TNF- α может участвовать в регуляции различных метаболических процессов, что делает его перспективным геном-кандидатом, контролирующим массу тела и показатели роста у животных.

Ранее были изучены ассоциации генов Bhlhe 40 (basic Helix-Loop-Helix family member e40), DPP6 (dipeptidyl-peptidase 6) and CLEC3B (C-type lectin domain family 3 member B), гена соматотропина с массой телят при рождении, при отъеме и показателями среднесуточных приростов у аборигенных китайских и бразильских пород, а также

у черно-пестрой породы крупного рогатого скота [9–11]. Информация о влиянии полиморфизма гена TNF- α на показатели роста и развития телят в доступной литературе отсутствует.

Целью работы являлось исследование ассоциаций полиморфизма –824 A/G гена TNF- α с показателями роста и развития животных красной степной породы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для анализа использована кровь 57 коров красной степной породы СХА ПЗ «Степной» Алтайского края. По данным зоотехнического учёта изучены показатели живой массы этих животных при рождении, в возрасте 6, 12 и 18 месяцев, рассчитаны среднесуточный и относительный прирост в разные периоды жизни.

Лабораторные исследования проводили в лаборатории молекулярной генетики человека ИЦиГ СО РАН. Выделение геномной ДНК проводили с помощью стандартного метода протеолитической обработки с последующей экстракцией фенол-хлороформом. Однонуклеотидный полиморфизм гена (ОНП) TNF- α –824 A/G изучали методом ПЦР-ПДРФ с использованием прямого праймера 5' CCGAGAAATGGGACAACCT-3' и обратного праймера 5' - GCCATGTATCCCCAAAGAAT-3'.

Аmplификацию фрагмента размером 145 п. н. проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 75 мМ ТрисHCl (pH 9,0), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % твина, 3 мМ MgCl₂, по 200 мкМ каждого dNTP, по 1 мкМ каждого праймера, 2,5 ед. активности Taq-полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск), 6% глицерина и 0,5–1 мкг ДНК в течение 35 циклов (95 °C – 30 с, 62 °C – 30 с, 72 °C – 30 с) с предварительной денатурацией при 95 °C 3 мин.

Продукт амплификации подвергали рестрикции ферментом EcoICRI («СибЭнзим», Россия), при условиях, рекомендуемых производителем. Ампликон 145 п. н. либо оставался неразрезанным (аллель G), либо разрезался на фрагменты 81 и 64 п. н. (аллель A).

Электрофоретический анализ фрагментов проводили в 4%-м ПААГ с добавлением бромистого этидия.

Статистический анализ проводили с помощью компьютерной программы Statistica версии 8.0. Среднесуточные и относительные приросты вычисляли по стандартным методикам [12]. Оценку достоверности различий параметров ро-

ста животных с разными генотипами проводили на основе t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основании анализа однонуклеотидного полиморфизма гена TNF- α выявлено, что частота встречаемости генотипов G/G, G/A и A/A в исследуемой выборке была 54, 42 и 4% соответственно. Частота аллеля G составляла 75%, аллеля A – 25%. Распределение частот генотипов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 1,06$, $p = 0,304$).

Результаты исследования, представленные в табл. 1, показывают, что животные в различные периоды онтогенеза имели разные показатели ро-

ста и развития в зависимости от генотипа. Так, живая масса телят при рождении с генотипом G/A была значимо ниже по сравнению с гомозиготами G/G ($P < 0,05$). Тенденция превосходства этих гомозигот наблюдается также у 6- и 12-месячных телят. В более поздний период фактор среды нивелирует различия между генотипами по живой массе. Дисперсионный анализ показал, что сила влияния генотипа на массу новорожденного теленка составляет 7% ($P < 0,05$).

Учитывая, что живая масса телят при рождении была в пределах адаптивной нормы ($\pm 2 \sigma$), были сформированы равные группы ($n=19$) и проанализированы частоты генотипов и аллелей в них (табл. 2). Достоверных различий между частотами генотипов и аллелей в группах телят с разной массой при рождении не выявлено.

Таблица 1

Живая масса молодняка в разные периоды онтогенеза в зависимости от генотипа по гену TNF- α , кг

Генотип	Живая масса							
	при рождении		6 мес		12 мес		18 мес	
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	Cv, %	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	Cv, %	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	Cv, %	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	Cv, %
G/G	35,96 $\pm$ 0,57	9,2	164,2 $\pm$ 3,7	12,1	242,1 $\pm$ 2,5	5,4	328,8 $\pm$ 4,6	7,3
G/A	34,16 $\pm$ 0,65*	9,2	158,0 $\pm$ 1,4	4,4	240,4 $\pm$ 3,4	6,3	332,2 $\pm$ 3,1	4,5
A/A	35,50 $\pm$ 0,50	2,0	152,5 $\pm$ 2,5	2,3	240,5 $\pm$ 1,5	0,9	324,5 $\pm$ 2,5	1,1

* $P < 0,05$ по сравнению с генотипом G/G.

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей гена TNF- α в группах телят с разной массой при рождении, %

Генотипы и аллели	Масса при рождении, кг		
	34 и менее	от 35 до 36	37 и более
G/G	42 (28)	52 (34)	58 (38)
G/A	58 (42)	37 (27)	42 (31)
A/A	0 (0)	11 (100)	0 (0)
G	71** (39)	71** (32)	79** (36)
A	29 (39)	29 (32)	21 (29)

Примечание. В скобках указана доля животных определенного генотипа в зависимости от массы при рождении.

** $P < 0,01$ по сравнению с аллелем A.

Таблица 3

Сравнительная скорость роста животных в разные периоды в зависимости от генотипа по гену TNF- α

Показатель	G/G	G/A	A/A
Масса при рождении, кг	35,96 $\pm$ 0,57	34,16 $\pm$ 0,65	35,5 $\pm$ 2,27
Среднесуточный прирост, кг			
0–6 мес	0,711 $\pm$ 0,016	0,687 $\pm$ 0,018	0,650 $\pm$ 0,064
6–12 мес	0,447 $\pm$ 0,015	0,450 $\pm$ 0,017	0,483 $\pm$ 0,076
12–18 мес	0,512 $\pm$ 0,022	0,510 $\pm$ 0,024	0,444 $\pm$ 0,104
Относительный прирост, %			
0–6 мес	31,8 $\pm$ 0,3	32,2 $\pm$ 0,4	31,1 $\pm$ 1,3
6–12 мес	10,0 $\pm$ 0,3	10,1 $\pm$ 0,3	11,0 $\pm$ 1,5
12–18 мес	7,9 $\pm$ 0,3	8,0 $\pm$ 0,4	7,1 $\pm$ 1,7

Различия между частотами телят с разной массой при рождении в группах генотипов G/G и G/A, а также аллелей A и G были незначительными. При одинаковой частоте аллеля G в группах телят с разной массой при рождении этот аллель достоверно превосходил аллель A ($P < 0,01$).

В табл. 3 представлены данные по скорости роста животных в разные периоды жизни в зависимости от генотипа по гену TNF- α . Общей особенностью является относительно высокая интенсивность роста и развития в раннем периоде. Так, до 6-месячного возраста среднесуточный прирост во всех группах составляет примерно 688 г, в то время как в более поздние сроки около 450 г. При значимых различиях по живой массе при рождении у телят разных генотипов достоверных различий по скорости роста в другие периоды жизни не выявлено. Если предполагать, что ген TNF- α участвует в контроле роста и развития, на что указывают различия на момент рождения, то в поздние сроки его действие сглаживается за счет влияния среднего фактора.

Таким образом, результаты предварительных исследований позволяют заключить, что полиморфизм –824 A/G гена TNF- α , участвующего в регуляции различных метаболических процессов, может быть перспективным генетическим маркером

массы телят при рождении. Информация о его ассоциации с показателями роста и развития является полезной для проведения селекции племенных быков на легкость отела у дочерей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и образования России, РФФИ (проект № 13–04–00968-а) и Экспедиционного гранта СО РАН.

ВЫВОДЫ

1. В исследованной выборке животных красной степной породы наиболее распространенным является аллель G однонуклеотидного полиморфизма –824 A/G в гене TNF- α (75%), аллель A имеет частоту 25%. Частоты генотипов G/G, G/A и A/A составляют соответственно 54, 42 и 4%.
2. Генотип G/A полиморфизма –824 A/G в гене TNF- α ассоциирован с пониженной массой при рождении у телят красной степной породы по сравнению с генотипом G/G.
3. У телят красной степной породы полиморфизм –824 A/G в гене TNF- α не влияет на показатели среднесуточных и относительных приростов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Смарагдов М. Г.* Тотальная геномная селекция с помощью SNP как возможный ускоритель традиционной селекции // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 6. – С. 1–4.
2. *Кочнев Н. Н.* Селекционно-генетическая оценка генотипа быков-производителей по жизнеспособности потомства // Докл. Россельхозакадемии. – 2002. – № 2. – С. 45–48.
3. *Петухов В. Л., Жигачёв А. И., Назарова Г. А.* Ветеринарная генетика: учеб. – М.: Колос, 1996. – 384 с.
4. *Рост, развитие и воспроизводительная функция первотелок голштинской селекции* / Г. Ф. Медведев, Н. И. Гавриченко, И. А. Долин и др. // Уч. зап. УО ВГАВМ. – 2011. – Т. 47, вып. 2, ч. 2. – С. 44–47.
5. *Назарченко О. В.* Взаимосвязь между живой массой и молочной продуктивностью голштинизированных коров у дочерей быков-производителей голштинских линий Зауралья // Вестн. КрасГАУ. – 2011. – № 10. – С. 164–167.
6. *Aggarwal B. B., Gupta S. C., Kim J. H.* Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey // Blood. – 2012. – Vol. 119, – No. 3. – P. 651–665.
7. *The UCSC Genome Browser database: 2014 update* / D. Karolchik, G. P. Barber, J. Casper [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2014. – Vol. 42, No. 1. – P. D764–D770.
8. *Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection* / S. Konnai, T. Usui, M. Ikeda [et al.] // Microbes Infect. – 2006. – № 8. – P. 2163–2171.
9. *Паттерн экспрессии гена Bhlhe40 в развитии крупного рогатого скота и его ассоциации с показателями роста* / X. S. Lai, C. G. Zhang, J. Wang [et al.] // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 774–781.
10. *Genome-wide association for growth traits in Canchim beef cattle* / M. E. Buzanskas, D. A. Grossi, R. V. Ventura [et al.] // PLoS One. 2014. URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0094802> (дата обращения: 01.08.14).

11. Урядников М. В., Улубаев И. Х. Оценка аллелей и генотипов соматотропина по полиморфизму и живой массе коров черно-пестрой породы // Вестн. АГАУ. – 2011. – № 3. – С. 80–83.
12. Красота В. Ф., Джапаридзе Т. Г., Костомахин Н. М. Разведение сельскохозяйственных животных: учеб. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 2005. – 424 с.

ASSOCIATION OF POLIMORPHISM –824OF A/G OF THE GENE OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA WITH CALF GROWTH INDICES

T. I. Krytsyna, N. N. Kochnev, E. B. Golubeva, R. B. Aitnazarov, G. M. Goncharenko, N. S. Yudin

Key words: Red Steppe breed, polymorphism, tumor necrosis factor alpha, TNF- α , gain, weight at birth

Summary. The paper provides research data on the search for genetic markers of Red Steppe animals growth and development. The indices are the ones of the most important breeding traits which influence the formation of constitution, exterior, productivity and vitality of animals. High rate of growth in the early postnatal period is preferable in economic terms. However, at present, there is a problem of heavy calving. As a consequence, the cows cannot recover long, they cannot fully realize their potential of productivity. The gene of tumor necrosis factor alpha codes for the multifunctional protein which, concurrently with immune response functions, plays an important part in general metabolism. Polymorphism –824 A/G of the gene of tumor necrosis factor alpha is examined with the method of polymerase chain reaction with concomitant analysis of restriction fragments lengths in the herd of Red Steppe cow breeds at the agricultural artel of the breeding-farm “Stepnoy” of German national district in Altai Krai. The frequency of the rare allele A in the sample of 57 animals examined made up 25 %. Distribution of genotypes frequency corresponded to Hardy-Weinberg equilibrium A true association of G/A genotype is established with decreased weight of calves at birth ($p < 0.05$). No true differences among the animals with different genotypes were revealed in the sample concerned for the indices of average daily and relative gains.