

by additive and dominant system of genes with predominating both additive and nonadditive genes, that gives the opportunity to recommend the selection of perspective plants in early generations. **Conclusions.** Researched varieties of pea are valuable sources of high productivity characteristics in their use in the selection programs for creation of new high productive varieties suitable to growing under modern intensive technologies.

Key words: pea, variety, hybrid, inheritance, seed, gen, selection.

МИХАЙЛОВА М.Е., БЕЛАЯ Е.В., ТИХАНОВИЧ Н.И., ХОТЛЯНИК Н.В.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: M.Mikhailova@igc.bas-net.by

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ СЕЛЕКЦИОННОГО ПОГОЛОВЬЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ И БЕЛОРУССКОЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОД ПО ГЕНУ ПРОЛАКТИНА (*bPRL*)

Повышение молочной продуктивности является одним из приоритетных направлений современной селекции крупного рогатого скота. Для получения животных с желательными признаками традиционная селекция пользуется данными фенотипа, поэтому такой селекционный процесс занимает значительный промежуток времени, особенно для животных с длительным генерационным периодом, таких как крупный рогатый скот, козы, овцы. Повысить скорость, точность и эффективность традиционной селекции в настоящее время помогает маркер-сопутствующая селекция (MAS – marker assisted selection). Эта новейшая селекционная технология сочетает информацию о генетических маркерах (маркерных точках генотипа (marker loci)), связанных с участками генома, отвечающими за развитие количественных признаков (QTL – quantitative trait loci), с данными об их реализации в фенотипе. Поиск генетических маркеров молочной продуктивности для крупного рогатого скота в настоящее время ведется среди полиморфных вариантов гена пролактина (*bPRL*), который принимает значительное участие в регуляции процессов роста и лактации.

Пролактин, как и гормон роста, относится к одному и тому же семейству белковых гормонов, которые принимают участие в инициации и поддержании лактации у млекопитающих. Ген пролактина у крупного рогатого скота локализо-

ван на хромосоме 23 и содержит 5 экзонов и 4 интрона. Его транскрипция регулируется двумя независимыми промоторными регионами: проксимальный контролирует гипофизарно-специфическую экспрессию, в то время как дистальный отвечает за экстрагипофизарную экспрессию гена. Гормон пролактин (PRL) продуцируется лактотрофами – клетками передней доли гипофиза, а также в различных тканях, включая эндотелиальные клетки, нейроны, клетки молочной железы и др. [1].

Для гена пролактина (*bPRL*) крупного рогатого скота было выявлено несколько аллелей, обусловленных полиморфизмом нуклеотидной последовательности. В основном, они вызваны мутациями, определяемыми методом ПЦР-ПДРФ и SSCP без расшифровки их природы и локализации. В настоящее время в качестве маркера молочной продуктивности крупного рогатого скота достаточно широко в MAS-селекции применяется полиморфизм нуклеотидной последовательности гена *bPRL*, связанный с молчащей трансверсией А→G в третьем экзоне [2].

В связи с вышеизложенным, нами была проведена оценка выборок крупного рогатого скота голштинской и белорусской черно-пестрой пород по аллельным вариантам гена пролактина.

Материалы и методы.

Объект исследования – быкопроизводящие коровы двух пород молочного направления, составляющих основное поголовье Республики Беларусь: голштинской и белорусской черно-пестрой. Материал исследования – образцы ДНК, выделенной из крови животных голштин-

ской (n = 109), а также белорусской черно-пестрой пород (n = 296).

Определение генотипов животных осуществлялось методом ПЦР-ПДРФ. Для амплификации фрагмента гена *bPRL* используют праймеры RsaI-F и RsaI-R. [2] (RsaI-F: 5'-

gctccagaagtctgttttc-3' и RsaI-R: 5'-cgagcttatgagcttgattctt-3').

ПЦР проводят в амплификаторе в конечном объеме 2 мкл в следующем режиме: «горячий старт» – 3 мин 94°C. Затем 35 циклов амплификации в режиме: 94°C – 1 мин- денатурация; 62°C – 1 мин – отжиг праймеров; 72°C – 1,5 мин – синтез. Элонгация 5 мин при 72°C.

Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов включал обработку амплификата сайт-специфической рестриктазой и последующее разделение полученных фрагментов с помощью гель-электрофореза. Идентификация полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bPRL* в экзоне 3 проводилась с помощью рестриктазы *RsaI* (рис.).

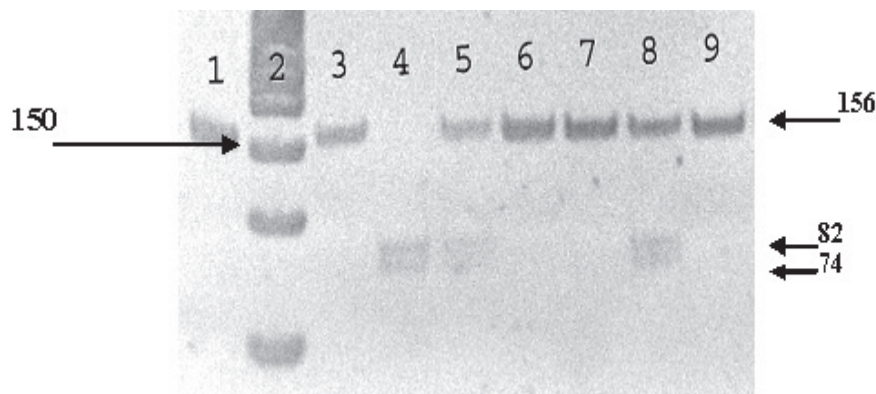


Рис. Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bPRL* – *RsaI*

Примечания: Дорожка 1 – ПЦР – продукт 156 п.н. фрагмента гена *bPRL-RsaI*; дорожка 2 – маркер молекулярных масс O’Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва; дорожки 3, 6, 7, 9 – фрагмент рестрикции 156 п.н., соответствующий генотипу *bPRL-RsaI^{AA}*; дорожка 4 – фрагменты рестрикции 82 и 74 п.н., соответствующие генотипу *bPRL-RsaI^{BB}*; дорожки 5, 8 – фрагменты рестрикции 156, 82 и 74 п.н., соответствующие генотипу *bPRL-RsaI^{AB}*. Положение на геле специфических полос показано стрелками. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле (SeaKem LE Agarose, Lonza, США).

Полиморфизм *bPRL-RsaI* обусловлен молчащей трансверсией А→G, соответствующей 103-му положению аминокислотной последовательности белка. Сайтом узнавания для рестриктазы *RsaI* является последовательность GT↓AC. Рестриктаза разрезает ампликат, содержащий нуклеотид А. Такой аллель обозначен как *bPRL-RsaI^B*. В случае присутствия G нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bPRL-RsaI^A* [2]. Длина амплифицируемого фрагмента составляет 156 нуклеотидов. Длина фрагментов после рестрикции составляет 82 и

74 п.н. На электрофореграмме могут быть визуализированы варианты полос определенной длины, характерные для генотипов: одна полоса 156 п.н. (генотип *bPRL-RsaI^{AA}*); две полосы 82 и 74 п.н. (генотип *bPRL-RsaI^{BB}*); три полосы – 156, 82 и 74 п.н. (*bPRL-RsaI^{AB}*).

Сравнение выборок по распределению частот аллелей гена *bPRL*, а также оценку соответствия фактического распределения генотипов теоретически ожидаемому по закону Харди-Вайнберга, проводили с помощью с помощью критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение.

На первом этапе исследования нами были определены частоты встречаемости аллелей и генотипов *bPRL* в обеих выборках. Результаты оценки различий распределения относительных частот аллелей гена пролактина в популяции голштинского и белорусского черно-пестрого скота приведены в табл. 1.

По данным, приведенным в табл. 1, можно отметить, что для обеих пород редким является аллель *bPRL-RsaI^B* [3, 4]. Значимых различий в распределении относительных частот аллелей

гена пролактина в популяции голштинского и белорусского черно-пестрого скота не выявлено. Данные, полученные нами, находятся в пределах частот, наблюдаемых другими авторами: у коров черно-пестрой породы соотношение частот аллелей *bPRL-RsaI^A* и *bPRL-RsaI^B* 0,11–0,29 и 0,71–0,89. По данным Chrenek et al., у коров голштинской породы частота аллелей *bPRL-RsaI^A* и *bPRL-RsaI^B* составила 0,95 и 0,05 соответственно [5–8].

Таблица 1. Распределение относительных частот аллелей гена пролактина в популяции голштинского и белорусского черно-пестрого скота ($Q \pm S_D$)

| Аллель | Наблюдаемые частоты аллелей | | Относительные частоты аллелей | | P |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|-------|
| | Голштинская порода | Черно-пестрая порода | Голштинская порода | Черно-пестрая порода | |
| <i>bPRL-RsaI^B</i> | 23 | 72 | 0,11±0,02 | 0,12±0,01 | 0,527 |
| <i>bPRL-RsaI^A</i> | 195 | 520 | 0,89±0,02 | 0,88±0,01 | |

Примечание. Различие между породами значимо при $P < 0,05$.

Нами было проанализировано также соответствие распределения генотипов теоретически ожидаемому, по закону Харди-Вайнберга, среди животных белорусской черно-пестрой и голштинской пород. Полученные данные представ-

лены в табл. 2, из которой видно, что по данному полиморфизму обе популяции находятся в состоянии генетического равновесия. В обоих случаях отмечается соответствие наблюдаемых частот генотипов теоретически ожидаемому.

Таблица 2. Распределение частот генотипов по гену пролактина в белорусских популяциях голштинского и белорусского черно-пестрого крупного рогатого скота

| Поли-морфизм | Генотип | Голштинская порода (n=109) | | | Белорусская черно-пестрая порода (n=296) | | |
|------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------|-------|------------------------------------------|-------------|-------|
| | | n наблюдаемое | n ожидаемое | P | n наблюдаемое | n ожидаемое | P |
| <i>bPRL-RsaI</i> | <i>bPRL-RsaI^{BB}</i> | 1 | 1 | 1,000 | 3 | 4 | 0,819 |
| | <i>bPRL-RsaI^{AB}</i> | 21 | 21 | | 66 | 63 | |
| | <i>bPRL-RsaI^{AA}</i> | 87 | 87 | | 227 | 228 | |

Примечание. Отклонение наблюдаемых частот генотипов от теоретически ожидаемых по закону Харди-Вайнберга значимо при $P < 0,05$.

Выводы

На основании проведенных исследований установлено:

- во-первых, для обеих исследованных выборок редким является аллель *bPRL-RsaI^B*;
- во-вторых, распределение частот аллелей гена пролактина в популяциях голштинской и белорусской черно-пестрой породы не различа-

ется;

в-третьих, распределение частот генотипов по гену пролактина в белорусских популяциях голштинского и белорусского черно-пестрого крупного рогатого скота соответствует теоретически ожидаемым по закону Харди-Вайнберга.

Литература

1. Crenshaw E.B. Cell – specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements / E.B. Crenshaw [et al.] // Genes and Develop. – 1989. – Vol. 3, №7. – P. 959–972.
2. Udina I.G. et al. Polymorphism of bovine prolactin gene, microsatellites, PCR–RFLP // Russian J. Genet. – 2001. – №4. – P. 407–411.
3. Беляя Е.В. Внутрипородный анализ генетической структуры популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада / Е.В. Беляя, М.Е. Михайлова, Н.М. Волчок, Н.И. Тиханович // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2010. – Т. 11. – С. 92–98.
4. Беляя Е.В. Сравнительный анализ генетической структуры белорусских популяций крупного рогатого скота черно-пестрой и голштинской пород по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bPRL*, *bGH*, *bGHR* и *bIGF-1*) / Е.В. Беляя, М.Е. Михайлова, Н.М. Волчок // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2011. – Т. 12 – С. 108–114.
5. Chrenek A., et al. Simultaneous analysis of bovine growth hormone and prolactin alleles by multiplex PCR and RFLP // Czech J Anim Sci. – 1998. – Vol. 43, № 2. – P. 53–55.

6. Skinkytė R. Distribution of Allele Frequencies Important To Milk Production Traits In Lithuanian Black & White And Lithuanian Red Cattle / R. Skinkytė [et al.] // Veterinaria In Zootechnika. – 2005. – Vol. 31, №3. – P. 93–97.
7. Miceikienė I. et al. Association of cattle genetic markers with performance traits // Biologia. – 2006. – № 1. – P. 24–29.
8. Brym A.E. et al. Effect of New SNP Within Bovine Prolactin Gene Enhancer Region on Expression in the Pituitary Gland // Biochem. Genet. – 2007. – Vol. 45, №9–10. – P. 743–754.

MIKHAILOVA M.E., BELAYA YE.V., TIKHANOVICH N.I. KHOTLYANIK N.V.

Institute of Genetics and Cytology at NASB

e-mail: M.Mikhailova@jgc.bas-net.by

CHARACTERIZATION OF GENETIC STRUCTURE OF CATTLE BREEDING LIVESTOCK OF HOLSTEIN AND BELORUSSIANWHITE-AND-BLACK CATTLE FOR PROLACTIN GENE (bPRL)

Aims. Estimate the frequency of alleles of prolactin gene in the two groups cattle of Holstein and black-and-white breed.

Methods. The method of PCR-RFLP was used. **Results.** The frequencies of *bPRL-RsaI^A* and *bPRL-RsaI^B* alleles of prolactin gene were determined in the two groups cattle of Holstein and black-and-white breed.

Conclusions. Evaluation of conformity observed genotype frequencies with expected genotype frequencies according to Hardy-Weinberg equilibrium. Found that the *bPRL-RsaI^B* allele is a rare in both the studied group. The distribution of allele frequencies of prolactin gene in both populations did not differ. The observed genotype frequencies correspond to the theoretically expected by the Hardy-Weinberg equilibrium.

Key words: prolactin gene, prolactin hormone, cattle, Holstein cattle, black-and-white breed.

**МОЦНЫЙ И.И.¹, КУЛЬБИДА М.П.², ЗАМБРИБОРЩ И.С.¹, ЛОБАНОВА Е.И.¹,
ЧЕБОТАРЬ Г.А.¹, ЧЕБОТАРЬ С.В.¹, БОЙКО М.С.¹**

¹ *Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и стоизучения НААНУ*

Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дорога, 3, e-mail: motsnyyii@gmail.com

² *ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова АМНУ»*

Украина, 65061, г. Одесса, Французский бульвар, 49/51

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ АНДРОГЕНЕЗА *IN VITRO* НА ПРИЗНАКИ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ПШЕНИЦЫ

В настоящее время применение удвоенных гаплоидов всё шире входит в отечественную селекционную практику. Однако, влияние культуральных факторов на некоторые агрономически ценные признаки пшеницы неоднозначно в первых поколениях *ex vitro*, что может существенно исказить оценку селекционного материала и привести к элиминации ценных комбинаций генов при выбраковке материала на ранних этапах селекционного процесса. Для анализа последствий проведения генотипов через культуру *in vitro*, в отношении количественных признаков, которые имеют полигенную де-

терминацию, высокую средовую дисперсию и сильно коррелируют между собой, необходимы методы многомерного статистического анализа, в частности – дискриминантный анализ.

Цель работы – проанализировать связь между фактором андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников и количественными признаками растений озимой пшеницы, различных по генам короткостебельности; оценить информативность комплекса признаков для дискриминации линий-дигаплоидов и исходных форм в зависимости от года репродукции в поле.

Материалы и методы

Материал исследования – короткостебельные аналоги двух известных сортов озимой пшеницы селекции СГИ – НЦСС (г. Одесса): Кооператорка К-70 (КК70), Кооператорка К-90 (КК90), Одесская 3 К-75 (Од.3К75), а также сорт

Одесская 51 (Од. 51). Для получения удвоенных гаплоидов отбирали колосья донорных растений с пыльниками, микроспоры которых находились на вакуолизированной стадии развития. Предобработку и стерилизацию материала проводили