

ВНУТРИПОРОДНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ БЕЛОРУССКОГО РАЗВЕДЕНИЯ ПО ПОЛИМОРФНЫМ ВАРИАНТАМ ГЕНОВ СОМАТОТРОПИНОВОГО КАСКАДА

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Одним из основных приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь является получение сельскохозяйственных животных, обладающих повышенной молочной продуктивностью и исследование генетических, физиологических и биохимических механизмов формирования продуктивности [1, 2]. Эффективная реализация селекционных программ в настоящее время требует привлечения современных методов молекулярных исследований. Одним из новейших селекционных направлений является маркер-сопутствующая селекция (marker assisted selection (MAS), сочетающая информацию о полиморфных вариантах генов, отвечающих за развитие качественных признаков, с данными об их фенотипическом проявлении. В этой связи значительный интерес представляют гены соматотропинового каскада, так как гормон роста (соматотропин) является центральным регулятором роста и лактации у млекопитающих, а гормоны, опосредующие его воздействия на ткани-мишени, влияют на внутриклеточный белковый, углеводный и липидный метаболические обмены. На сегодняшний момент у представителей различных пород крупного рогатого скота для каждого из генов соматотропинового каскада выявлен широкий спектр полиморфных вариантов, в том числе и обусловленных онднуклеотидными заменами. Однако, эти данные носят фрагментативный, а

иногда и противоречивый характер. Поэтому нами сделана попытка провести комплексное исследование ассоциации генов-кандидатов соматотропинового ряда с количественными признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота.

Так как изучаемые полиморфизмы генов соматотропинового каскада встречаются редко и частота их по данным других исследователей различна не только у представителей разных пород, но и в пределах одной породы, то целью первого этапа работы был анализ генетической структуры популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения.

Нами исследованы *HinFI*- и *StuI*-полиморфизмы гена гипофизарного фактора-1 *bPit-1*, запускающего экспрессию гена гормона роста [3, 4]; *RsaI*-полиморфизм гена пролактина *bPrl*, белковый продукт которого является гуморальным регулятором лактации [5]; *AluI*-полиморфизм гена гормона роста *bGH* одного из ключевых регуляторов роста и лактации у млекопитающих [6]; *SspI*-полиморфизм гена рецептора гормона роста *bGHR*, белок которого осуществляет передачу гуморального сигнала гормона роста к клеткам-мишеням [7]; и *SnaBI*-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста-1 *bIGF-1*, запускающего внутриклеточные метаболические ответы на воздействие соматотропина [8].

Материалы и методы

Объект исследования – выборки из популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения.

Материалом для исследования послужили 329 образцов ДНК, выделенных из крови коров черно-пестрой породы, предоставленных

животноводческими предприятиями Минской области. Источником информации о молочной продуктивности послужили племенные карты исследуемых животных.

Относительные частоты аллелей исследуемых генов определяли методом прямого подсчета по формуле:

$$P_{(A)} = (2N_1 + N_2) / 2n$$

где N_1 - число гомозигот по исследуемому аллелю;

N_2 - число гетерозигот;

n - объем выборки [9].

Статистическую ошибку относительных частот аллелей генов вычисляли по формуле [10]:

$$S_p = (\sqrt{pq}) / n$$

где p - частота исследуемого аллеля;

$q = 1 - p$

n - объем выборки

Сравнение выборок по распределению абсолютных частот аллельных вариантов ис-

следуемых генов проводили с помощью критерия χ^2 по Пирсону. Число степеней свободы равно единице.

Соответствие фактического распределения генотипов теоретически ожидаемому оценивали с помощью критерия χ^2 . Число степеней свободы равняется числу генотипов минус число аллелей.

$$\chi^2 = \sum (H_o - H_e) / H_e$$

где H_o - наблюдаемые частоты генотипов

H_e - ожидаемые частоты генотипов:

$$AA = p^2;$$

$$AB = 2pq;$$

$$BB = q^2 \text{ [11].}$$

Определение генотипов животных осуществлялось методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализа каждого полиморфизма приведены в таблице 1.

Таблица 1

Индивидуальные характеристики условий ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов соматотропинового каскада

Полиморфизм	Условия амплификации	Последовательности праймеров
<i>bPit-1-HinfI</i> [3]	94°C-1 мин; (95°C-45с; 56°C-60с; 72°C-60с)х35; 72°C-10мин	<i>HinfI</i> -F: 5'-aaaccatcatctccctctt-3'
		<i>HinfI</i> -R: 5'-aatgtacaatgtgcctctctag-3'
<i>bPit-1-StuI</i> [4]	95°C-5 мин; (95°C-45с; 55°C-45с; 72°C-45с)х35; 72°C-10мин	<i>StuI</i> -F: 5'-caaatggctctttctgtgttacagg-3'
		<i>StuI</i> -R: 5'-ctttaaactcattggcaaacctttc-3'
<i>bPrl-RsaI</i> [5]	95°C-5 мин; (95°C-30с; 63°C-30с; 72°C-30с)х30; 72°C-10мин	<i>RsaI</i> -F: 5'-gcctccagaagtcgtttgttttc-3'
		<i>RsaI</i> -R: 5'-cgagtccttatgagcttgattctt-3'
<i>bGH-AluI</i> [6]	95°C-5 мин; (95°C-30с; 64°C-30с; 72°C-60с)х30; 72°C-10 мин	<i>AluI</i> -F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3'
		<i>AluI</i> -R: 5'-gttcttgagcagcgct-3'
<i>bGHR-SspI</i> [7]	95°C-5 мин; (95°C-30с; 60°C-30с; 72°C-30с)х30; 72°C-10 мин	<i>SspI</i> -F: 5'-aatactgggctagcagtgacaatat-3'
		<i>SspI</i> -R: 5'-acgtttcactgggtgatga-3'
<i>bIGF-1-SnaBI</i> [8]	95°C-5 мин; (95°C-30с; 64°C-30с; 72°C-30с)х35; 72°C-10 мин	<i>SnaBI</i> -F: 5'-attacaaagctgcctgcccc-3'
		<i>SnaBI</i> -R: 5'-accttaccgctatgaaaggaact-3'

Схемы рестрикционного анализа продуктов амплификации исследуемых генов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Схемы ПДРФ-анализа продуктов амплификации исследуемых полиморфных участков генов соматотропинового каскада

Полиморфизм гена	Рестриктаза	Замена нуклеотида /замена аминокислоты	Распознаваемый нуклеотид /аллель	Генотипы и соответствующие длины рестрикционных фрагментов
<i>bPit-1-HinfI</i> Экзон 6	<i>HinfI</i>	A→G	A /b <i>Pit-1-HinfI</i> ^B	<i>Pit-1-HinfI</i> ^{AA} : 451; <i>Pit-1-HinfI</i> ^{BB} : 244+207; <i>Pit-1-HinfI</i> ^{AB} : 451+244+207;
<i>bPit-1-StuI</i> Экзон 2	<i>StuI</i>	C→A Pro→His	C /b <i>Pit-1-StuI</i> ^C	<i>Pit-1-StuI</i> ^{AA} : 234; <i>Pit-1-StuI</i> ^{CC} : 197+37; <i>Pit-1-StuI</i> ^{AC} : 197+37+234;
<i>bPrl-RsaI</i> Экзон 4	<i>RsaI</i>	A→G	A /b <i>Prl-RsaI</i> ^B	<i>Prl-RsaI</i> ^{AA} : 156; <i>Prl-RsaI</i> ^{BB} : 82+74; <i>Prl-RsaI</i> ^{AB} : 156+82+74;
<i>bGH-AluI</i> Экзон 5	<i>AluI</i>	C→G Leu→Val	C /b <i>GH-AluI</i> ^L	<i>GH-AluI</i> ^{VV} : 208; <i>GH-AluI</i> ^{LL} : 172+35; <i>GH-AluI</i> ^{LV} : 208+172+35
<i>bGHR-SspI</i> Экзон 8	<i>SspI</i>	T→A Phe→Val	T /b <i>GHR-SspI</i> ^F	<i>GHR-SspI</i> ^{YY} : 182; <i>GHR-SspI</i> ^{FF} : 158+24; <i>GHR-SspI</i> ^{FY} : 182+158+24
<i>bIGF-1-SnaBI</i> Экзон 1	<i>SnaBI</i>	T→C	T /b <i>IGF-1SnaBI</i> ^A	<i>IGF-1SnaBI</i> ^{BB} : 249; <i>IGF-1SnaBI</i> ^{AA} : 223+26; <i>IGF-1SnaBI</i> ^{AB} : 249+223+26

Результаты и обсуждение

Результаты исследования относительных частот аллельных вариантов генов соматотропинового каскада у животных черно-

пестрой породы разводимых на разных предприятиях Республики Беларусь представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Распределение относительных частот аллелей исследуемых генов в популяции
черно-пестрого скота ($P \pm m_p$)**

Название полиморфизма	Аллель	Относительная частота аллеля $\pm$ статистическая ошибка		
		РУСП «Племенной завод Красная звезда»	СПК АК «Снов»	Минская птицефабрика №1
<i>bPit-1-HinF1</i>	<i>bPit-1-HinF1^A</i>	0,368$\pm$0,012	0,212$\pm$0,002	0,179$\pm$0,003
	<i>bPit-1-HinF1^B</i>	0,632 $\pm$ 0,012	0,788 $\pm$ 0,002	0,821 $\pm$ 0,003
<i>bPit-1-StuI</i>	<i>bPit-1-StuI^A</i>	0,013$\pm$0,003	0,118$\pm$0,002	0,174$\pm$0,003
	<i>bPit-1-StuI^C</i>	0,987 $\pm$ 0,003	0,882 $\pm$ 0,002	0,826 $\pm$ 0,003
<i>bPrl-RsaI</i>	<i>bPrl-RsaI^A</i>	0,882 $\pm$ 0,008	0,893 $\pm$ 0,002	0,853 $\pm$ 0,003
	<i>bPrl-RsaI^B</i>	0,118$\pm$0,008	0,107$\pm$0,002	0,147$\pm$0,003
<i>bGH-AluI</i>	<i>bGH-AluI^L</i>	0,829 $\pm$ 0,009	0,874 $\pm$ 0,002	0,243 $\pm$ 0,003
	<i>bGH-AluI^V</i>	0,171$\pm$0,009	0,126$\pm$0,002	0,757$\pm$0,003
<i>bGHR-SspI</i>	<i>bGHR-SspI^F</i>	0,711 $\pm$ 0,012	0,777 $\pm$ 0,002	0,798 $\pm$ 0,003
	<i>bGHR-SspI^Y</i>	0,289$\pm$0,012	0,223$\pm$0,002	0,202$\pm$0,003
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^A</i>	0,566 $\pm$ 0,01	0,599 $\pm$ 0,002	0,537 $\pm$ 0,004
	<i>bIGF-1-SnaBI^B</i>	0,434$\pm$0,01	0,401$\pm$0,002	0,463$\pm$0,004

В дальнейшем было проведено сравнение полученных относительных частот аллельных вариантов среди животных разных выборок. Выборки трех предприятий сравнивались попарно:

1. РУСП «Племенной завод Красная звезда» - СПК АК «Снов»;
2. РУСП «Племенной завод Красная звезда»

- Минская птицефабрика №1;

3. СПК АК «Снов» - Минская птицефабрика №1.

Данные по результатам сравнения относительных частот аллельных вариантов исследуемых генов в разных популяциях коров черно-пестрой породы представлены в таблице 4.

Таблица 4

Сравнение распределения абсолютных частот аллелей генов соматотропинового каскада в популяциях черно-пестрого скота*

Название полиморфизма	РУСП «Племенной завод Красная звезда»/ СПК АК «Снов»		РУСП «Племенной завод Красная звезда»/ Минская птицефабрика №1		СПК АК «Снов» / Минская птицефабрика №1	
	χ^2	p*	χ^2	p*	χ^2	p*
<i>bPit-1-HinF1</i>	8,52	0,003	11,50	0,001	0,91	0,340
<i>bPit-1-StuI</i>		0,002**		0,000**	3,59	0,058
<i>bPrl-RsaI</i>		0,452**		0,343**	2,00	0,157
<i>bGH-AluI</i>	1,08	0,298	80,69	0,000	234,53	0,000
<i>bGHR-SspI</i>	1,57	0,210	2,49	0,115	0,35	0,556
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	0,29	0,593	0,19	0,661	2,16	0,14

*- Полученные данные рассматривались как статистически значимые при уровне значимости $P < 0,05$.

** - Значения p рассчитаны с помощью точного критерия Фишера, двусторонний тест.

Анализ распределения относительных частот полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада в разных популяциях выявил статистически значимые отличия для гена гипофизарного фактора роста-1 *bPit-1* по обоим исследуемым полиморфизмам (*bPit-1-HinF1* и *bPit-1-StuI*) в группе животных предприятия «Племенной завод Красная звезда» (табл. 3, 4). Из исследуемой выборки этого предприятия выяснилось, что относительная частота редкого аллеля *bPit-1-HinF1^A* выше, чем в популяциях предприятий «Снов» и «Минская птицефабрика № 1» (табл. 3). Причем по отношению к популяции предприятия «Снов» в популяции животных «Племенной завод Красная звезда» частота этого редкого аллеля выше в 1,7 раза, а по отношению к популяции «Минская птицефабрика №1» – в 2 раза (табл. 3).

Исследование распределения относительных частот *StuI*-полиморфных аллелей гена *bPit-1* выявило статистически значимые отличия также для выборки популяции животных предприятия «Племенной завод Красная звезда» (табл. 4). Но по данному полиморфизму относительная частота редкого аллеля *bPit-1StuI^A* в популяции этого предприятия оказалась ниже по отношению к двум другим выборкам. Так, относительная частота аллеля *bPit-1StuI^A* в популяции предприятия «Племенной завод Красная звезда» была в 9 раз ниже по сравнению с выборкой из популяции предприятия «Снов» и в 13,4 раза ниже по сравнению с выборкой предприятия «Минская птицефабрика № 1» (табл. 3).

Исследование распределения относительных частот *AluI*-полиморфных аллелей гена гормона роста *bGH* выявило статистически

значимое отличие по этому показателю для выборки животных предприятия «Минская птицефабрика №1» по отношению к двум другим (табл. 4). Необходимо отметить, что практически все гомозиготные по аллелю *bGH-AluI^V* животные (70 из 74-х) черно-пестрой породы были выявлены в выборке из популяции этого предприятия. Относительная частота редкого аллеля *bGH-AluI^V* среди животных этой группы значительно превышала таковую в выборках из популяций двух других предприятий. Превышение составило 4,4 раза по отношению к выборке предприятия «Племенной завод Красная звезда» и 6 раз по отношению к выборке предприятия «Снов» (табл. 3).

Полученные данные демонстрируют высокую внутрипородную гетерогенность среди популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения по локусам генов гипофизарного фактора *bPit-1* (полиморфизмы *bPit-1-StuI* и *Pit-1-HinF1*) и гена гормона роста *bGH* (полиморфизм *bGH-AluI*). Наблюдаемое явление может быть связано с особенностями ведения селекционной работы на данных предприятиях.

Нами отмечено, что для каждой пары аллелей каждого из исследуемых генов аллель, являющийся редким в одной группе, оказывался редким во всех остальных популяциях.

Также нами было проанализировано соответствие распределения генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга для исследуемых генов соматотропинового каскада среди животных черно-пестрой породы. Анализ соответствия проводился с помощью критерия χ^2 . Полученные данные представлены в таблице 5.

Таблица 5

Анализ соответствия распределения частот генотипов в белорусских популяциях голштинского и черно-пестрого крупного рогатого скота по генам соматотропинового каскада теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга

Название полиморфизма	Генотип	РУСП «Племенной завод Красная звезда» n=38		СПК АК «Снов» n=182		Минская птицефабрика №1 n=109	
		n	χ^2	n	χ^2	n	χ^2
<i>bPit-1-HinF1</i>	<i>bPit-1-HinF1^{AA}</i>	7	1,65	6	0,91	1	1,81*
	<i>bPit-1-HinF1^{AB}</i>	14		65		37	
	<i>bPit-1-HinF1^{BB}</i>	17		111		71	
<i>bPit-1-StuI</i>	<i>bPit-1StuI^{AA}</i>	0	37,25*	0	2,22*	0	3,69*
	<i>bPit-1StuI^{AC}</i>	1		43		38	
	<i>bPit-1StuI^{CC}</i>	37		139		71	
<i>bPrl-RsaI</i>	<i>bPrl-RsaI^{AA}</i>	29	0,04*	145	0,08*	78	0,49*
	<i>bPrl-RsaI^{AB}</i>	9		35		30	
	<i>bPrl-RsaI^{BB}</i>	0		2		1	
<i>bGH-AluI</i>	<i>bGH-AluI^{LL}</i>	25	0,63*	140	0,19*	14	15,47
	<i>bGH-AluI^{LV}</i>	13		38		25	
	<i>bGH-AluI^{VV}</i>	0		4		70	
<i>bGHR-SspI</i>	<i>bGHR-SspI^{FF}</i>	19	0,04*	111	0,18	68	0,37*
	<i>bGHR-SspI^{FY}</i>	16		61		38	
	<i>bGHR-SspI^{YY}</i>	3		10		3	
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	14	1,47	68	0,70	34	1,01
	<i>bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	15		82		49	
	<i>bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	9					

*-значения χ^2 рассчитаны с поправкой Йетса. Значение χ^2 для уровня значимости 0,05 составляет 3, 84.

Нами выявлено, что среди выборки животных предприятия «Племенной завод Красная звезда» наблюдается отклонение наблюдаемого распределения частот генотипов от теоретически ожидаемого равновесного распределения Харди-Вайнберга по *bPit-1 StuI*-полиморфизму. Ранее отмечено, что относительные частоты аллельных вариантов гена *bPit-1* по этому полиморфизму статистически значимо отличаются от таковых в выборках других популяций (табл. 3, 4).

По *HinFI*-полиморфизму в выборке животных «Племенной завод Красная звезда» также выявлено отличие относительных частот аллельных вариантов гена *bPit-1*, а наблюдаемое распределение частот генотипов по этому

полиморфизму соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

Отмечаемое в популяции коров предприятия «Минская птицефабрика №1» отличие распределения относительных частот *AluI*-аллельных вариантов гена гормона роста *bGH* (табл. 3, 4) от двух других популяций сопровождается отклонением наблюдаемого распределения частот генотипов от теоретически ожидаемого равновесного распределения Харди-Вайнберга.

По другим полиморфизмам исследуемых генов наблюдаемое распределение частот генотипов соответствовало теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

Заключение

Нами исследованы относительные частоты встречаемости полиморфных вариантов пяти генов соматотропинового каскада в трех различных популяциях крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения. А именно, *bPit-1-HinF1* и *bPit-1-StuI*-полиморфизмы гена гипофизарного фактора роста-1, *bPRL-RsaI* полиморфизм гена пролактина, *bGH-AluI*-полиморфизм гена гормона роста и *bIGF-1-SnaBI*-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста-1.

Выявлено, что в парах аллельных вариантов каждого из исследуемых генов, редкий аллель совпадал в выборках всех трех популяций.

Т.е., ситуации, когда аллель, являющийся редким в одной выборке, оказался бы более распространенным в другой выборке, нами отмечено не было.

Внутрипородные различия распределения относительных частот аллельных вариантов были выявлены для гена гипофизарного фактора *bPit-1* по *HinF1*- и *bPit-1-StuI*-полиморфизмам, а также для *AluI*-полиморфизма гена гормона роста *bGH*.

Отклонения распределения частот генотипов от теоретически ожидаемого равновесного распределения Харди-Вайнберга наблюдается только по тем полиморфизмам и в тех же выборках, по которым отмечены внутрипородные отличия распределения относительных частот аллельных вариантов.

Выявленные тенденции в дальнейшем будут учтены при исследовании ассоциации полиморфизмов генов соматотропинового каскада с признаками молочной продуктивности у коров голштинской и черно-пестрой пород.

Список использованных источников

1. Структура приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2006–2010 годы, утверждена Указом Президента Республики Беларусь № 315 от 06.07.2005.
2. Перечень приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 гг., утвержденный постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 17 мая 2005 г. № 512.
3. Edriss, V., Edriss, V.a., Rahmani, H. R. Pit-1 Gene polymorphysm of Holstein Cows in Isfahan Province. *iotecnology* 7 (2): 209–2126 2008.
4. Huang W. A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in dairy cattle. / W. Huang, C. Maltecca and H. Khatib. // *Animal Genetics*. – 2008. – Vol. 39. – P. 554–557.
5. Alipanah, M. Kappa-Casein and PRL-RSA I Genotypic Frequencies in two russian cattle breeds / M. Alipanah, L. A. Kalashnikova, G. V. Rodionov // *Archivos Zootec*. – 2008. – Vol. 57, № 218. – P. 131–138.
6. Zhou, G L, Liu, H G, Liu C, Guo, S L, Zhu, Q and Wu, Y H. 2005. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *Journal of Biosciences* 30: 595.
7. Viitala, S., Szyda, J., Bloot, S., Schulman, N., Lidauer, M., Mäki-Tanila, A., Georges, M., Vilkkilä, J.H., 2006. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire cattle. *Genetics* 173: 2151–2164.
8. Siadkowska, E. L. Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle / E. L. Siadkowska // *Animal Science Papers and Reports*. – 2006. – Vol. 24, № 3. – P. 225–237.
9. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях. / М.: Наука, – 1989.
10. Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов // Минск: БГУ, – 1961.
11. Рокицкий, П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов // Минск: БГУ. 1961.
12. Айала, Ф., Кайгер, Дж., Современная генетика. Т 3., М.: Мир, 1988. – 335 с.

Дата поступления статьи 22 сентября 2010 г.