

УДК 636.2.082.22

М. Е. МИХАЙЛОВА, Е. В. БЕЛАЯ

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ СОМАТОТРОПИНОВОГО КАСКАДА *bPit-1* И *bPrl* ДЛЯ ДНК-ТИПИРОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: M.Mikhailova@jgc.bas-net.by

(Поступила в редакцию 08.07.2010)

Введение. Одним из современных направлений селекции является маркер-сопутствующая селекция (marker assisted selection (MAS)), основанная на информации о взаимосвязях молекулярно-генетических полиморфизмов, маркерных точек с данными о их фенотипических проявлениях. Поиск потенциальных генов-кандидатов активно ведется среди генов, белковые продукты которых отвечают за проявление количественных признаков. Редкие полиморфные варианты таких генов, ассоциированные с повышенной продуктивностью животных по тем или иным признакам, рассматриваются в качестве генетических маркеров. В настоящее время в MAS-селекции крупного рогатого скота широко ведутся работы по выявлению полиморфных вариантов генов системы гормона роста, так как они принимают участие в формировании признаков молочной и мясной продуктивности. Однако данные исследования являются фрагментированными, это приводит к тому, что полученные результаты трудно сопоставимы и зачастую противоречат друг другу. Поэтому для более глубокого и обоснованного понимания механизмов формирования признаков молочной продуктивности, мы предприняли попытку комплексного исследования полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада. Нами исследован *HinFI*- и *StuI*-полиморфизм гена гипофизарного фактора-1 *bPit-1* (запускающего экспрессию гена гормона роста) [1, 2] и *RsaI*-полиморфизм гена пролактина, белковый продукт которого является гуморальным регулятором лактации [3]. Исследуемые полиморфные варианты генов обусловлены однонуклеотидными заменами, расположенными в транслируемых областях.

Цель работы – изучение взаимосвязи аллельных вариантов генов соматотропинового каскада (*bPit-1* и *bPrl*) с признаками молочной продуктивности у коров голштинской породы для применения изученных полиморфизмов в качестве генетических маркеров молочной продуктивности крупного рогатого скота.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования послужила белорусская популяция голштинского скота, так как эта порода является несомненным лидером среди пород молочного направления и активно применяется селекционерами для повышения молочной продуктивности крупного рогатого скота в Республике Беларусь. Материал для исследования – образцы ДНК, выделенные из проб крови коров голштинской породы, предоставленные СПК АК «Снов». Источником информации о молочной продуктивности (удой, жирномолочность, белковомолочность) послужили племенные карты исследуемых животных.

Статистическая оценка проведена с использованием стандартного пакета программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Ink. 1994–2001). При проведении статистического анализа для количественных данных первоначально определяли характер распределения (Shapiro-Wilk`W test). В случае, если в одной из групп распределение было отличным от нормального, количественные признаки оценивали с использованием методов непараметрической статистики для независимых переменных. Данные представлены в виде M_e (25%; 75%), где M_e – медиана признака,

25 %; 75 % – интерквантильный размах признака. Оценка связи генотипа с показателями молочной продуктивности проводилась с помощью непараметрического метода корреляционного анализа «Ранговая корреляция по Кендалу (τ)». Проверялась нулевая статистическая гипотеза об отсутствии связи признаков, т. е. коэффициент корреляции равен нулю [4]. Полученные данные во всех случаях рассматривались как статистически значимые при $P < 0,05$.

Определение генотипа осуществлялось методом ПЦР ПДФ (полимеразная цепная реакция-полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализа каждого полиморфизма приведены в табл 1.

Т а б л и ц а 1. Индивидуальные характеристики условий ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов *bPit-1* и *bPrl*

| Полиморфизм | Условия ПЦР | Последовательности праймеров |
|-------------------------|--|---|
| <i>bPit-1-HinfI</i> [1] | 94° -1 мин; (95° - 45 с; 56° - 60 с; 72° - 60 с) · 35; 72° - 10 мин | <i>HinfI</i> -F: 5'-aaaccatcatctcccttctt-3' <i>HinfI</i> -R: 5'-aatgtacaatgtgccttctgag-3' |
| <i>bPit-1-StuI</i> [2] | 95° - 5 мин; (95° - 45 с; 55° - 45 с; 72° - 45 с) · 35; 72° - 10 мин | <i>StuI</i> -F: 5'caaatggctcttcttctgtgttacaggg-3' <i>StuI</i> -R: 5'-ctttaaactcattggcaaaccttttc-3' |
| <i>bPrl-RsaI</i> [3] | 95° - 5 мин; (95° - 30 с; 63° - 30 с; 72° - 30 с) · 30; 72° - 10 мин | <i>RsaI</i> -F: 5'-gcctccagaagtcgtttgttttc-3' <i>RsaI</i> -R: 5'-cgagtccttatgagcttgattctt-3' |

Схемы ПДФ-анализа для каждого из исследуемых полиморфизмов генов *bPit-1* и *bPrl* представлены в табл 2.

Т а б л и ц а 2. Схемы ПДФ-анализа продуктов амплификации исследуемых полиморфных участков генов *bPit-1* и *bPrl*

| Полиморфизм гена | Фермент | Замена нуклеотида / замена аминокислоты | Распознаваемый нуклеотид / аллель | Генотипы и соответствующие длины рестрикционных фрагментов |
|----------------------------------|---------|---|--------------------------------------|--|
| <i>bPit-1-HinfI</i> , Экзон 6 | HinfI | A→G | A / <i>bPit-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 | Stu I | C→A /Pro→His | C / <i>bPit-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 | RsaI | A→G | A / <i>bPrl-RsaI</i> ^B | <i>Prl-RsaI</i> ^{AA} : 156; <i>Prl-RsaI</i> ^{BB} : 82+74; <i>Prl-RsaI</i> ^{AB} : 156+82+74 |

Результаты и их обсуждение. В результате ДНК-типирования коров голштинской породы по *HinfI*-полиморфизму гена гипофизарного фактора роста-1 были выявлены животные с генотипами *bPit-1-HinfI*^{AA}, *bPit-1-HinfI*^{AB} и *bPit-1-HinfI*^{BB} (наиболее распространен). Данные по исследованию взаимосвязи генотипа по полиморфизму *bPit-1-HinfI* с признаками молочной продуктивности представлены в табл 3.

Т а б л и ц а 3. Анализ взаимосвязи генотипа по полиморфизму *bPit-1-HinfI* с признаками молочной продуктивности у коров голштинской породы М_с (25%; 75%)

| Генотип | <i>bPit-1-HinfI</i> ^{AA} | <i>bPit-1-HinfI</i> ^{AB} | <i>bPit-1-HinfI</i> ^{BB} | Корреляционный анализ по Кендалу | |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------|
| Выборка, n | 5 | 40 | 73 | R | P* |
| Удой, кг | 9463 (9118; 10408) | 10004 (9318; 10895) | 10258 (9525; 11226) | 0,11 | 0,07 |
| Жирномолочность, кг | 361 (356; 363) | 363 (336; 390) | 374 (345; 406) | 0,13 | 0,03 |
| Белковомолочность, кг | 296 (296; 311) | 311 (281; 333) | 316 (297; 339) | 0,13 | 0,03 |

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

Нами выявлено, что аллель *bPit-1-HinfI*^B у коров голштинской породы положительно ассоциирован со всеми тремя исследуемыми параметрами продуктивности: удой, жирномолочность и белковомолочность. В группе животных с генотипом *bPit-1-HinfI*^{BB} по всем трем исследуе-

мым признакам наблюдается наибольшее срединное значение показателя, в то время как для группы животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* отмечено наименьшее значение медианы. Статистически значимая положительная корреляция генотипа *bPit-1-HinFI^{BB}* отмечена по признакам белкомолочности и жирномолочности. Ранее, в работе R. Renaville et al. показано, что аллель *bPit-1-HinFI^A* ассоциирован с повышенной продуктивностью молока и более высоким содержанием молочного белка у животных голштино-фризской породы [1]. L. Zwierzchowski et al. в своем исследовании подтвердили положительную ассоциацию *bPit-1-HinFI^A* аллеля с продуктивностью молока и содержанием молочного жира при исследовании польского чернопестрого скота [5]. Так как данный полиморфизм не сопровождается аминокислотной заменой в структуре белкового продукта, можно предположить, что он не является непосредственной причиной отмеченных фенотипических эффектов на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота. Вероятно, на молочную продуктивность влияет другой функциональный локус, который у представителей разных пород может быть расположен ближе или дальше от локуса *bPit-1-HinFI* [6]. В таком случае привлечение данного полиморфизма в качестве генетического маркера признаков молочной продуктивности потребует дополнительных исследований по каждой породе, участвующей в селекционных программах.

Данные по исследованию взаимосвязи генотипа по полиморфизму *bPit-1-StuI* с признаками молочной продуктивности у коров голштинской породы представлены в табл. 4. В результате исследования *StuI*-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста-1 были выявлены животные с генотипами *bPit-1-StuI^{AA}*, *bPit-1-StuI^{AC}* и *bPit-1-StuI^{CC}* (наиболее распространен).

Т а б л и ц а 4. Анализ взаимосвязи генотипа по полиморфизму *bPit-1-StuI* с признаками молочной продуктивности у коров голштинской породы М_c (25 %; 75 %)

| Генотип | <i>bPit-1-StuI^{CC}</i> | <i>bPit-1-StuI^{AC}</i> | <i>bPit-1-StuI^{AA**}</i> | Корреляционный анализ по Кендалу | |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------|
| | | | | R | P* |
| Выборка, n | 90 | 27 | 1 | | |
| Удой, кг | 10193 (9480; 10985) | 10217 (9159; 11343) | 9176 | 0,02 | 0,78 |
| Жирномолочность, кг | 367 (344; 395) | 363 (338; 403) | 380 | - 0,00 | 0,88 |
| Белкомолочность, кг | 312 (293; 334) | 319 (283; 349) | 271 | 0,03 | 0,57 |

* Данные рассматривались как статистически значимые при $P < 0,05$.

** Генотип не был включен в корреляционный анализ.

Получены данные о том, что животные с генотипом *bPit-1-StuI^{AC}* характеризуются более высокими показателями удоя и белкомолочности. Коровы с генотипом *bPit-1-StuI^{CC}* обладали более высоким уровнем жирномолочности. По данным W. Huang et al., изучавших этот полиморфизм на популяции северно-американских коров голштинской породы, отмечено, что носители редкого генотипа *bPit-1-StuI^{AA}* характеризуются как более продолжительным периодом лактации, так и более высокими показателями общей молочной продуктивности [2]. Несмотря на то что выявленные нами тенденции не подтверждаются результатами корреляционного анализа, данный полиморфизм требует дальнейшего изучения, так как он сопряжен с изменением аминокислотной последовательности белка.

Результаты исследования влияния *RsaI*-полиморфных вариантов гена пролактина *bPrl* на признаки молочной продуктивности представлены в табл 5.

Т а б л и ц а 5. Анализ взаимосвязи генотипа по полиморфизму *bPrl-RsaI* с признаками молочной продуктивности у коров голштинской породы М_e (25 %; 75 %)

| Генотип | <i>bPrl-RsaI^{BB**}</i> | <i>bPrl-RsaI^{AB}</i> | <i>bPrl-RsaI^{AA}</i> | Корреляционный анализ по Кендалу | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------|
| | | | | R | P* |
| Выборка, n | 1 | 24 | 93 | | |
| Удой, кг | 10533 | 10072 (9310; 11202) | 10216 (9347; 11063) | 0,01 | 0,80 |
| Жирномолочность, кг | 370 | 363 (351; 391) | 367 (339; 397) | 0,01 | 0,79 |
| Белкомолочность, кг | 306 | 311 (293; 337) | 314 (292; 335) | 0,00 | 0,96 |

* Данные рассматривались как статистически значимые при $P < 0,05$.

** Генотип не был включен в корреляционный анализ.

В результате ДНК-типирования исследуемых коров по RsaI-полиморфизму гена пролактина были выявлены животные с генотипами *bPrl-RsaI^{BB}*, *bPrl-RsaI^{AB}* и *bPrl-RsaI^{AA}* (наиболее распространен). Редкий генотип *bPrl-RsaI^{BB}* обнаружен у одного животного. Поэтому в ходе корреляционного анализа исследовались только животные с генотипами *bPrl-RsaI^{AB}* и *bPrl-RsaI^{AA}*. Нами отмечено, что по всем трем исследуемым признакам молочной продуктивности (удой, жирномолочность и белковомолочность) более высокие показатели характерны для коров с генотипом *bPrl-RsaI^{AA}* (табл. 5). По данным P. Brum et al., у коров черно-пестрой породы польской селекции аллель *bPrl-RsaI^A* ассоциирован с более высокой молочной продуктивностью [3]. По данным других авторов для черно-пестрой породы была выявлена ассоциация аллеля *Prl-RsaI^B* с высоким показателем процентного содержания молочного жира. У красно-пестрой породы аллель *Prl-RsaI^B* был ассоциирован с более высокой общей продуктивностью молока, жира и молочного протеина [7]. В данном случае, как и в случае HinFI-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста (*bPit-1*), однонуклеотидная замена не сопровождается изменением аминокислотной последовательности белка. В этом случае также отмечаются противоречия фенотипических эффектов RsaI-полиморфизма гена пролактина у представителей разных пород. Эти факты позволяют предположить, что сам по себе RsaI-полиморфизм гена пролактина, так же как и в случае HinFI-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста (*bPit-1*), является всего лишь генетическим маркером, связанным с другими, недостаточно изученными факторами. Поэтому необходимо проведение предварительного анализа ассоциации RsaI-полиморфизма в каждой конкретной популяции крупного рогатого скота перед применением его в селекционных программах.

Заключение. Исследовано влияние полиморфных вариантов гена *bPit-1* гипофизарного фактора роста-1 (HinFI- и StuI-полиморфизм) и гена *bPrl* пролактина (RsaI-полиморфизм) на признаки молочной продуктивности (удой, жирномолочность и белковомолочность) у коров голштинской породы. По результатам исследования HinFI-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста *bPit-1* в качестве предпочтительного по влиянию на такие признаки молочной продуктивности, как удой, жирномолочность и белковомолочность можно отметить аллель *bPit-1-HinFI^B*. Статистически значимая положительная корреляция генотипа *bPit-1-HinFI^{BB}* отмечена по признакам белковомолочности и жирномолочности. По результатам нашего исследования взаимосвязи полиморфизма *bPit-1-StuI* с молочной продуктивностью предпочтительным является редкий аллель *bPit-1-StuI^A*. Животные с генотипом *bPit-1-StuI^{AC}* характеризуются более высокими показателями удоя и белковомолочности. При изучении влияния на признаки молочной продуктивности полиморфизма *bPrl-RsaI* отмечено, что по всем трем исследуемым признакам (удой, жирномолочность и белковомолочность) более высокие срединные значения показателей характерны для коров с генотипом *bPrl-RsaI^{AA}*, что позволяет определить в качестве предпочтительного аллель *bPrl-RsaI^A*.

Наибольший практический интерес в маркер-сопутствующей селекции представляют собой полиморфизмы, аллельные варианты которых одинаково положительно или одинаково отрицательно ассоциированы со всеми тремя исследуемыми признаками молочной продуктивности: общим удоем, жирномолочностью и белковомолочностью. По результатам нашего исследования, в качестве таких универсальных маркеров, рекомендуемых для раннего типирования признаков молочной продуктивности коров голштинской породы, разводимых на территории Республики Беларусь, можно рассматривать HinFI-полиморфизм гена гипофизарного фактора роста *bPit-1* и RsaI-полиморфизм гена пролактина *bPrl*.

Литература

1. Renaville R., Gengler N., Vrech A. // J Dairy Sci. 1997. Vol. 80, N 12. P. 3431–3438.
2. Huang W., Maltecca C., Khatib H. // Animal Genetics. 2008. Vol. 39. P. 554–557.
3. Brum P., Kaminski S., Wojcik E. // J. Appl. Genet 2005, Vol. 45, N 2. P.179–185.
4. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., 2002.

5. Zwierzchowski L., Krzyzewski J., Strzalkowska N. et al. // Anim. Sci. Pap. Rep. 2002. Vol. 20. P. 213–227.
6. Edriss V., Edriss V., Rahmani R. // Biotechnology. 2008. Vol. 7, N 2. P. 209–212.
7. Alipanah M., Kalashnikova L. A., Rodionov G. V. // Archivos Zootec. 2008. Vol. 57, N 218. P. 131–138.

M. E. MIKHAILOVA, Ye. V. BELAYA

DNA-TYPING OF MILK PRODUCTIVITY TRAITS IN HOLSTEIN CATTLE FOR POLYMORPHIC GENE VARIANTS OF SOMATOTROPIN CASCADE *bPit-1* AND *bPrl*

Summary

Polymorphisms of pituitary growth factor gene *bPit-1*: *bPit-1-HinFI*, *bPit-1-StuI* and those of prolactin gene *bPrl-RsaI* were tested in 118 Statistically significant positive correlation of the genotype *bPit-1-HinFI^{BB}*, to the protein and fat content in milk was revealed. The data were obtained that animals with the genotype *bPit-1-StuI^{AC}* are characterized by high values of milk yield and protein content. It was observed that as to three tested traits of milk productivity, higher values were characteristic of cows with the genotype *bPrl-RsaI^{AA}*.