

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*, *bIGF-1*)

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

Введение

Маркер-сопутствующая селекция, *marker assisted selection* (MAS), – одна из современных селекционных технологий, сочетающая информацию о взаимосвязях генетического потенциала животных с его фенотипическим проявлением. Редкие полиморфные варианты генов, отвечающие за развитие количественных признаков, ассоциированные с повышенной продуктивностью животных, рассматриваются в качестве генетических маркеров. Центральным регулятором процессов роста и лактации у млекопитающих является гормон роста (соматотропин), а гормоны, передающие гуморальный сигнал на ткани-мишени, регулируют не только внутриклеточный белковый, но и углеводный и липидный метаболические пути. В настоящее время проводится активное исследование полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада для выявления генетических маркеров, ассоциированных с повышенной продуктивностью крупного рогатого скота. Такие работы представляют не только теоретический интерес, связанный с исследованием генетических механизмов формирования количественных признаков у животных, но и практический, связанный с повышением молочной продуктивности в животноводстве [1, 2].

На данный момент в мире выявлен широкий спектр аллельных вариантов для ряда генов соматотропинового каскада. Однако, эти данные фрагментированы и трудно сопоставимы, так как изучение генетической структуры популяций крупного рогатого скота во многих странах проводится на различных породах, а связь

генетических полиморфизмов с продуктивностью анализируется по разным признакам.

Нами выполнено комплексное исследование генетической структуры популяций крупного рогатого скота, разводимого в республике, по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада, белковые продукты которых являются ключевыми звеньями гуморальной цепи. К ним относятся *HinFI*- и *StuI*-полиморфизмы гена гипофизарного фактора-1 (*bPit-1*), запускающего экспрессию гена гормона роста [3, 4], *RsaI*-полиморфизм гена пролактина (*bPrl*), белок 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].

Так как изучаемые полиморфизмы встречаются редко, а частота их отличается у представителей разных пород, то целью данной работы было сравнение генетической структуры белорусских популяций крупного рогатого скота по частотам встречаемости аллельных вариантов исследуемых генов.

Для исследования нами взяты две породы, представляющие наибольший практический интерес для белорусской селекции крупного

рогатого скота молочного направления. Голштинская порода является несомненным лидером среди пород молочного направления. Значение черно-пестрой породы обусловлено тем,

что ее представители адаптированы к условиям климата, содержания, обладают устойчивым иммунитетом к заболеваниям, распространенным на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из проб крови коров черно-пестрой (329 особей) и голштинской пород (118 особей), представленных животноводческими предприятиями Минской области.

Относительные частоты аллелей анализируемых генов ($P_{(A)}$) определяли методом прямого подсчета по формуле:

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

где N_1 – число гомозиготных особей по исследуемому аллелю;

N_2 – число гетерозигот;

n – объем выборки [9].

Статистическую ошибку (S_p) 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 ча-

стот аллельных вариантов исследуемых генов проводили с помощью критерия χ^2 . Число степеней свободы = 1.

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:

$$AA = p^2;$$

$$AB = 2pq;$$

$$BB = q^2 [11].$$

Определение генотипа 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 ПЦР	Последовательности праймеров
<i>bPit-1-HinfI</i> [3]	-94 - 1 мин; -(95° – 45 с; 56° – 60 с; 72° – 60 с) × 35 циклов; -72° – 10 мин	<i>HinfI</i> -F: 5'-aaaccatcatctcccttctt-3'
		<i>HinfI</i> -R: 5'-aatgtacaatgtgccttctgag-3'
<i>bPit-1-StuI</i> [4]	-95° – 5 мин; -(95° – 45 с; 55° – 45 с; 72° – 45 с) × 35 циклов; -72° – 10 мин	<i>StuI</i> -F: 5'-caaatggctcttcttctgtgttacaggg-3'
		<i>StuI</i> -R: 5'-ctttaaactcattggcaaacctttc-3'
<i>bPrl-RsaI</i> [5]	-95° – 5 мин; -(95° – 30 с; 63° – 30 с; 72° – 30 с) × 30 циклов; -72 – 10 мин	<i>RsaI</i> -F: 5'-gccttccagaagtcgttgttttc-3'
		<i>RsaI</i> -R: 5'-cgagtccttatgagcttgattctt-3'

Продолжение таблицы

<i>bGH-AluI</i> [6]	-95° – 5 мин; -(95° – 30 с; 64° – 30 с; 72° – 60 с) × 30 циклов; -72° – 10 мин	<i>AluI</i> -F: 5'-ccgtgtctatgagaagc -3'
		<i>AluI</i> -R: 5'-gttcttgagcagcgcg -3'
<i>bGHR-SspI</i> [7]	-95° – 5 мин; -(95° – 30 с; 60°-30 с; 72° – 30 с) × 30 циклов; -72° – 10 мин	<i>SspI</i> -F: 5'-aatacttgggctagcagtgacaatat-3'
		<i>SspI</i> -R: 5'-acgtttcactgggttgatga-3'
<i>bIGF-I-SnaBI</i> [8]	-95° – 5 мин; -(95° – 30 с; 64°-30 с; 72°-30 с) × 35 циклов; -72° – 10 мин	<i>SnaBI</i> -F: 5'-attacaaagctgcctgcccc-3'
		<i>SnaBI</i> -R: 5'-accttaccgctatgaaaggaact-3'

Схемы ПДРФ-анализа для каждого из полиморфных локусов исследуемых генов представлены в таблице 2.

Таблица 2

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

Поли- морфизм гена	Фер- мент	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 / <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	<i>StuI</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	<i>RsaI</i>	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;
<i>bGH-AluI</i> / экзон 5	<i>AluI</i>	C → G Leu → Val	C / <i>bGH-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 / <i>bGHR-SspI</i> ^F	<i>GHR-SspI</i> ^{FY} : 182; <i>GHR-SspI</i> ^{FF} : 158+ 24; <i>GHR-SspI</i> ^{FY} : 182+158+24
<i>bIGF-I-Sna- BI</i> /экзон 1	<i>SnaBI</i>	T → C	T / <i>bIGF-I-SnaBI</i> ^A	<i>IGF-I-SnaBI</i> ^{BB} : 249; <i>IGF-I-SnaBI</i> ^{AA} : 223+26; <i>IGF-I-SnaBI</i> ^{AB} : 249+223+26

Результаты и обсуждение

Результаты исследования относительных частот аллельных вариантов генов соматотропинового каскада у животных черно-пестрой и голштинской пород представлены в таблице 3.

Таблица 3

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

Название полиморфизма	Аллель	Относительная частота аллеля $\pm$ статистическая ошибка	
		Голштинская порода n=118	Черно-пестрая порода n=329
<i>bPit-1-HinfI</i>	<i>bPit-1-HinfI</i> ^A	0,212 $\pm$ 0,003	0,219 $\pm$ 0,001
	<i>bPit-1-HinfI</i> ^B	0,788 $\pm$ 0,003	0,781 $\pm$ 0,001
<i>bPit-1-StuI</i>	<i>bPit-1-StuI</i> ^A	0,123 $\pm$ 0,003	0,125 $\pm$ 0,001
	<i>bPit-1-StuI</i> ^C	0,877 $\pm$ 0,003	0,875 $\pm$ 0,001
<i>bPrl-RsaI</i>	<i>bPrl-RsaI</i> ^A	0,890 $\pm$ 0,003	0,878 $\pm$ 0,001
	<i>bPrl-RsaI</i> ^B	0,110 $\pm$ 0,003	0,122 $\pm$ 0,001
<i>bGH-AluI</i>	<i>bGH-AluI</i> ^L	0,941 $\pm$ 0,002	0,660 $\pm$ 0,001
	<i>bGH-AluI</i> ^V	0,059 $\pm$ 0,002	0,340 $\pm$ 0,001
<i>bGHR-SspI</i>	<i>bGHR-SspI</i> ^F	0,809 $\pm$ 0,003	0,777 $\pm$ 0,001
	<i>bGHR-SspI</i> ^Y	0,191 $\pm$ 0,003	0,223 $\pm$ 0,001
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	<i>bIGF-1-SnaBI</i> ^A	0,593 $\pm$ 0,004	0,574 $\pm$ 0,001
	<i>bIGF-1-SnaBI</i> ^B	0,407 $\pm$ 0,004	0,426 $\pm$ 0,001

Нами отмечено, что для каждого из исследуемых полиморфизмов аллель, являющийся редким среди животных голштинской породы, также оказывался редким среди животных черно-пестрой породы.

Результаты сравнения распределения частот аллельных вариантов генов соматотропинового каскада в популяциях коров голштинской и черно-пестрой породы представлены в таблице 4.

Таблица 4

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

Название полиморфизма	Аллель	Абсолютная частота аллеля		χ^2	p*
		Голштинская порода n=118	Черно-пестрая порода n=329		
<i>bPit-1-HinfI</i>	<i>bPit-1-HinfI</i> ^A	50	144	0,05	0,82
	<i>bPit-1-HinfI</i> ^B	186	514		
<i>bPit-1-StuI</i>	<i>bPit-1-StuI</i> ^A	29	82	0,00	0,94
	<i>bPit-1-StuI</i> ^C	207	576		
<i>bPrl-RsaI</i>	<i>bPrl-RsaI</i> ^A	210	578	0,22	0,64
	<i>bPrl-RsaI</i> ^B	26	80		
<i>bGH-AluI</i>	<i>bGH-AluI</i> ^L	222	434	70,26	0,00*
	<i>bGH-AluI</i> ^V	14	224		
<i>bGHR-SspI</i>	<i>bGHR-SspI</i> ^F	191	511	1,10	0,29
	<i>bGHR-SspI</i> ^Y	45	147		
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	<i>bIGF-1-SnaBI</i> ^A	140	378	0,25	0,61
	<i>bIGF-1-SnaBI</i> ^B	96	280		

*- Полученные данные статистически значимы при уровне значимости $P < 0,05$.

Как видно из таблицы 5, на межпородном уровне статистически значимые различия распределения частот аллельных вариантов выявляются только по *AluI* – полиморфизму гена гормона роста *bGH*.

Также нами было проанализировано распределение генотипов исследуемых генов сомато-

тропинового каскада в выборках популяций черно-пестрой и голштинской пород.

С помощью критерия χ^2 проведен анализ соответствия распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга. 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	Голштинская порода n=118		Черно-пестрая порода n=329	
		n	χ^2 *	n	χ^2
<i>bPit-1-HinFI</i>	<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	5	0,03	14	0,32
	<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	40		116	
	<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>	73		199	
<i>bPit-1-StuI</i>	<i>bPit-1-StuI^{AA}</i>	1	0,09**	0	5,56**
	<i>bPit-1-StuI^{AC}</i>	27		82	
	<i>bPit-1-StuI^{CC}</i>	90		247	
<i>bPrl-RsaI</i>	<i>bPrl-RsaI^{AA}</i>	93	0,01**	252	0,54**
	<i>bPrl-RsaI^{AB}</i>	24		74	
	<i>bPrl-RsaI^{BB}</i>	1		3	
<i>bGH-AluI</i>	<i>bGH-AluI^{LL}</i>	104	0,03**	179	77,58
	<i>bGH-AluI^{LV}</i>	14		76	
	<i>bGH-AluI^{VV}</i>	0		74	
<i>bGHR- SspI</i>	<i>bGHR-SspI^{FF}</i>	77	0,01**	198	0,02
	<i>bGHR-SspI^{FY}</i>	37		115	
	<i>bGHR-SspI^{YY}</i>	4		16	
<i>bIGF-1- SnaBI</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	44	0,89	116	2,8
	<i>bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	52		146	
	<i>bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	22		67	

*- значения χ^2 для уровня значимости 0,05 составляет 3,84, жирным шрифтом обозначены случаи отклонения от теоретически ожидаемого [18]

**-значения χ^2 были рассчитаны с поправкой Йетса.

Отклонение распределения частот генотипов от теоретически ожидаемого равновесного Харди-Вайнберга наблюдается в популяции черно-пестрых коров по полиморфизмам *bPit-1-StuI* и *bGH-AluI*. По полиморфизму *bGH-AluI* относительная частота редкого аллеля *bGH-AluI^V* в этой популяции значительно превышает таковую в популя-

ции голштинских коров: 0,34 к 0,059 соответственно (табл. 3).

Относительно исследуемой популяции голштинских коров можно отметить, что по всем анализируемым полиморфизмам наблюдаемое распределение частот генотипов соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

Заключение

Нами проанализирована генетическая структура выборок из популяций двух наиболее распространенных на территории Беларуси пород крупного рогатого скота черно-пестрой и голштинской по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада. Изучены *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.

Анализ межпородного сравнения распределения частот полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада показал:

1. Редкий аллель, выявленный в популяции черно-пестрой породы, также является редким

и в популяции голштинской породы по всем исследованным полиморфизмам.

2. Сравнение распределения частот полиморфных вариантов исследуемых генов в популяциях голштинской и черно-пестрой пород выявило статистически значимые различия по *AluI*-полиморфизму гена гормона роста *bGH*, а именно, частота редкого аллеля *bGH-AluI*^V в популяции черно-пестрого скота в 5,7 раза выше, чем в популяции голштинской породы.

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

Список использованных источников

1. Miceikienė, I., Pečiulaitienė, N., Baltrėnaitė, L., Skinkytė, R., Indriulytė, R. Association of cattle genetic markers with performance traits. *BIOLOGIJA*. 2006. Nr. 1. – P. 24–29.
2. Hines, H.C., Ge, W., Zhao, Q., Davis, M.E. Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins. *Anim. Genet.* – 1998. 29(1): 69–74.
3. 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.
4. 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.
5. Khatami, S. R., Lazebny, O. E., Maksimenko, V. F. and Sulimova, G.E. Association of DNA Polymorphisms of the Growth Hormone and Prolactin Genes with Milk Productivity in Yaroslavl and Black-and-White Cattle. *Genetika*. 2005. T 41, № 2.
6. 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.
7. Zhou, G L, Liu, H G, Liu, C, Guo, S L, Zhu, Q and Wu, Y H. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *Journal of Biosciences*. – 2005. – V. 30. – 595 p.
8. 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.
9. Edriss, V., Edriss, V.A. Rahmani, H. R. Pit1 Gene polymorphism of Holstein Cows in Isfahan Province. *Biotechnology*. – 2008. 7 (2): 209–2126.
10. Viorica, C., Vlaic, A., Gaborean U, HINF1 polymorphism of K-casein and PIT1 genes in romaniansimmental cattle. *Lucrari tiintifice Zootehnie i Biotehnologii*, – Vol. 40 (1), (2007), Timisoara.
11. Pawar, R S, Tajane, K R, Joshi, C G, Rank, D N and Bramksht, B P Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle. *Indian Journal of Animal Sciences* 11 (9): 884–888, September 2007.
12. Fontanesy, L. Investigation of allele frequencies of the growth hormone receptor (GHR) F279Y mutation in dairy and dual purpose

cattle breeds / L.Fontanesy // Ital. J. Anim. Sci. – 2007. – Vol 6. – P. 415–420.

13. Mehmannaavaz, Y., Amirinia, C., Association of IGF–1 gene polymorphism with milk production traits and paternal genetic trends in Iranian Holstein bulls. African Journal of microbiology Research vol. 4 (1) – P. 110–114 January, 2010.

14. Renaville, R. Pit–1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein–Friesian bulls./R. Renaville, N. Gengler, E. Vrech, A. Prandi, S. Massart, C. Corradini//J Dairy

Sci. – 1997. – Vol. 80, – № 12. – P. 3431–3438.

15. Lewin, H. A. Close linkage between bovine prolactin and BoLA–DRB3 genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing / H.A. Lewin // Genomics.–1992. – № 13. – P. 44–48.

16. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях./М.: Наука, 1989. 235 с.

17. Рокицкий, П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов // Минск: БГУ. – 1961. – 186 с.

18. Айала Ф., Кайгер Дж., Современная генетика. Т 3., М.: Мир, – 1988. – 335 с.

Дата поступления статьи 16 июня 2011 г.