

ОЦЕНКА ИНДИВИДУАЛЬНОГО ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ГИПОФИЗАРНОГО ФАКТОРА РОСТА-1 (*bPIT-1*) И ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА-1 (*bIGF-1*) НА ПРИЗНАКИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ У ЧЕРНО-ПЕСТРОГО ГОЛШТИНИЗИРОВАННОГО КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
²ГУО «Институт подготовки научных кадров НАН Беларуси»
Республика Беларусь, г. Минск, ул. Кнорина, 1

Введение

Одним из новейших селекционных направлений является маркер-сопутствующая селекция, marker assisted selection (MAS), сочетающая информацию о полиморфных вариантах генов, отвечающих за развитие количественных признаков, с данными об их фенотипическом проявлении. Преимуществом такого подхода является возможность быстрого выявления и отбора на ранних этапах постнатального развития сельскохозяйственных животных, обладающих повышенным генетическим потенциалом продуктивности, для получения дополнительной продукции при одновременном сокращении временных и материальных затрат.

Поиск высокоинформативных генетических маркеров в настоящее время ведется среди полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада, белковые продукты которых участвуют в регуляции экспрессии гена соматотропина

и опосредовании его лактотропных эффектов. К настоящему времени выявлено большое количество однонуклеотидных замен в структуре этих генов, которые могли бы быть использованы в маркер-сопутствующей селекции в качестве генетических маркеров молочной продуктивности КРС. Поэтому актуальность приобретают исследования, направленные на выявление ассоциации таких полиморфизмов с количественными признаками продуктивности сельскохозяйственных животных и в частности крупного рогатого скота.

Нами исследованы *HinFI*-полиморфизм гена гипофизарного фактора-1 (*bPit-1*), инициирующего экспрессию гена гормона роста и *SnaBI*-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*), запускающего внутриклеточные метаболические ответы на воздействие соматотропина [1, 2, 3].

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили 329 образцов ДНК, выделенных из крови коров черно-пестрой голштинизированной породы, предоставленных животноводческими предприятиями Минской области. Источником информации о молочной продуктивности послужили племенные карты исследуемых

животных. 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 табл.1.

Таблица 1

Индивидуальные характеристики условий ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов соматотропинового каскада

Полиморфизм	Условия амплификации	Последовательности праймеров
<i>bPit-1</i> -HinfI [4]	94 °C – 1 мин; (95 °C – 45 сек; 56 °C – 60 сек; 72 °C – 60 сек) x 35; 72 °C – 10 мин	HinfI-F: 5'aaaccatcatctcccttctt-3'
		HinfI-R: 5'-aatgtacaatgtcttctgag-3'
<i>bIGF-1</i> -SnaBI [5]	95 °C – 5 мин; (95 °C – 30 сек; 64 °C – 30 сек; 72 °C – 30 сек) x 35; 72 °C – 10 мин	SnaBI-F: 5'-attcaagctgcctgccccc-3'
		SnaBI-R: 5'-acacgtatgaagggaact-3'

Таблица 2

Характеристика SSR-маркеров

Полиморфизм гена	Рестриктаза	Замена нуклеотида /замена аминокислоты	Распознаваемый нуклеотид / аллель	Генотипы и соответствующие длины рестрикционных фрагментов
<i>bPit-1</i> - HinfI Экзон 6	HinfI	A→G	A / <i>bPit-1</i> -HinfI ^B	<i>Pit-1</i> - HinfI ^{AA} : 451; <i>Pit-1</i> - HinfI ^{BB} : 244+207; <i>Pit-1</i> -HinfI ^{AB} : 451+244+207
<i>bIGF-1</i> -SnaBI Экзон 1	SnaBI	T→C	T / <i>bIGF1</i> SnaBI ^A	<i>IGF-1</i> SnaBI ^{BB} : 249; <i>IGF-1</i> SnaBI ^{AA} : 223+26; <i>IGF-1</i> SnaBI ^{AB} : 249+223+26

Результаты и обсуждение

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

Исследование индивидуальных фенотипических эффектов полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада осуществлялось в несколько этапов. На первом этапе нами выявлялись предпочтительные аллели и генотипы по каждому полиморфному варианту исследуемых генов. Под **предпочтительным аллелем** мы понимаем тот аллель, носители которого характеризуются более высокими показателями продуктивности по данному признаку по сравнению с носителями другого аллеля из этой пары. Аллель, входящий в структуру гомозиготных генотипов, характеризующихся пониженным уровнем продуктивности по данному признаку, обозначается как **альтернативный аллель**. Под **предпочтительным генотипом** мы понимаем тот генотип из трех возможных, обладатели которого характеризуются самым высоким уровнем продуктивности

по данному признаку. Выявление предпочтительного и альтернативного аллелей и генотипов проводилось путем сравнения непараметрических показателей продуктивности в группах с соответствующими генотипами между собой. Статистическая значимость наблюдаемых тенденций оценивалась с помощью теста Фишера. Данный метод позволяет оценивать различия между двумя и более группами, принадлежащими к одной генеральной совокупности, и применим на малых выборках ($n \leq 20$) [6].

Затем нами проводилась оценка характера и степени проявления индивидуального фенотипического эффекта исследуемых полиморфных вариантов генов по отношению к показателям продуктивности общей выборки. **Оценка характера индивидуального фенотипического эффекта генотипа** на признак (повышающий/понижающий эффект) осуществлялась путем сравнения непараметрических характеристик генотипов с показателями общей выборки. Статистическая обработка дан-

ных осуществлялась методом интервального оценивания, путем определения 95% доверительного интервала для медианы [6]. Данный метод позволяет оценить значимость отличий между непараметрическими характеристиками группы с определенным генотипом, являющейся частью общей выборки, и непараметрическими характеристиками общей выборки.

Оценка степени проявления индивидуальных фенотипических эффектов полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада проводилась путем подсчета средних значений продуктивности по каждому признаку для каждого генотипа. Затем для каждого генотипа была проведена оценка превышения его индивидуального фенотипического эффекта по отношению к общей выборке (в %) и отбор ин-

дивидуальных генотипов-лидеров по данному признаку. Оценка статистической значимости отличий непараметрических характеристик группы с определенным генотипом от общей выборки осуществлялась методом интервального оценивания [6]. Те генотипы, обладатели которых характеризуются повышенными / пониженными показателями молочной продуктивности по сравнению с общей выборкой, обозначены как *индивидуально повышающие/понижающие генотипы* по определенному признаку.

Данные о продуктивности особей с различными генотипами по полиморфизму *bPit-1-HinFI* у коров черно-пестрой голштинизированной породы представлены в табл. 3.

Таблица 3

Показатели молочной продуктивности у коров черно-пестрой голштинизированной породы по полиморфизму *HinFI* гена *bPit-1* Me (25%; 75%)

Генотип	n	Непараметрические характеристики	Удой, л	Жирномолочность, кг	Белковомолочность, кг
<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	14	Me (25%; 75%)	8475 (8309; 8955) *	332 (320; 346)*	273 (265; 283)*
		ДИ -95%; +95%	8279; 8859	317; 348	250; 283
<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	107	Me (25%; 75%)	8751 (8299; 9536)	348 (325; 380)	285 (262; 308)
		ДИ -95%; +95%	8485; 9233	339; 356	277; 292
<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>	175	Me (25%; 75%)	8890 (8258; 9589)	350 (329; 378)	290 (270; 311)
		ДИ -95%; +95%	8728; 9081	344; 363	283; 296
Общая выборка	296	Me (25%; 75%)	8878 (8288; 9533)	348 (327; 377)	287 (267; 308)

* – генотипы, обладающие статистически значимым понижающим эффектом на признаки молочной продуктивности (при $p < 0,05$).

По данным, представленным в табл. 3, можно отметить, что наиболее распространенный аллель *bPit-1-HinFI^B* является предпочтительным по трем исследуемым признакам. Особи с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* характеризуются более высокими показателями удоя, жирномолочности и белковомолочности по сравнению с особями с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}*. Превышение значений медиан у группы с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}*, по сравнению с группой с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}*, составляет 415 л молока, 18 кг молочного жира и 17 кг молочного белка по признакам удоя, жирномолочности и белковомолочности соответственно. Гетерозиготы

bPit-1-HinFI^{AB}, в данном случае, занимают промежуточное положение.

Результаты оценки достоверности различий групп животных с разными генотипами по полиморфизму *bPit-1-HinFI* между собой по показателям молочной продуктивности приведены в табл. 4.

По результатам применения теста Фишера при сравнении разных генотипов по полиморфизму *bPit-1-HinFI* между собой статистически значимые отличия выявляются в паре генотипов *bPit-1-HinFI^{AA}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* по уровню удоя, жирномолочности и белковомолочности.

Таблица 4

Значения p статистики по результатам применения теста Фишера у групп животных с разными генотипами по полиморфизму гена *bPit-1-HinFI*

Сравниваемые пары генотипов		Удой, л	Жирномолочность, кг	Белковомолочность, кг
<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>	0,03*	0,07**	0,06**
<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	0,34	0,12	0,34
<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>	0,96	0,85	0,77

* – различие между генотипами статистически значимо при $p < 0,05$;

** – различие между генотипами статистически значимо при $p < 0,1$.

Анализ характера фенотипического эффекта полиморфных вариантов гена *bPit-1* на признаки удоя, жирномолочности и белковомолочности показал, что превышение значения медианы у группы животных с предпочтительным генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* по отношению к общей выборке составляет всего лишь 12 л по удою, 2 кг по жирномолочности и 3 кг по белковомолочности. В то время как понижающий эффект генотипа *bPit-1-HinFI^{AA}* по отношению к общей выборке составляет 403 л, 16 и 14 кг соответственно. Оценка статистической значимости отличий непараметрических характеристик групп с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* от общей выборки путем интервального оценивания выявила достоверные отличия от выборки по трем признакам у группы коров с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* (см. табл. 3). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что для применения данного полиморфизма гена *bPit-1* в качестве генетического маркера повышенной молочной продуктивности черно-пестрого голштинизированного крупного рогатого скота в селекционных программах более целесообразно учитывать понижающий эффект генотипа *bPit-1-HinFI^{AA}*, чем повышающее влияние предпочтительного генотипа *bPit-1-HinFI^{BB}*.

По данным Zwierchowski et al., полученным при исследовании польского черно-пестрого голштинизированного скота, отмечается наличие положительной ассоциации *bPit-1-HinFI^A* аллеля с ежедневной продуктивностью молока, а также более высоким содержанием молочного жира [7]. Таким образом, имеются расхождения в наблюдаемых эффектах генотипа в разных популяциях одной породы. По нашему мнению, полученные нами данные свидетельствуют в пользу идеи Mukesh et al. о

том, что различный характер фенотипического эффекта одинаковых полиморфных аллелей у представителей разных популяций черно-пестрой голштинизированной породы отличается по физиологическому эффекту из-за присутствия фоновых геномных влияний, которые сформированы под воздействием искусственного отбора [8]. В пользу такого мнения выступает также тот факт, что черно-пестрая порода, разводимая на территории Беларуси, была значительно голштинизирована в селекционных целях и условная доля породности для анализируемых в нашей работе животных составляет в среднем 30,16% черно-пестрой породы к 69,84% голштинской.

Данные о продуктивности особей с различными генотипами по *SnaBI*-полиморфным вариантам гена *bIGF-1* у коров черно-пестрой голштинизированной породы представлены в табл. 5.

Анализ ассоциации *SnaBI*-полиморфизма гена инсулиноподобного фактора роста-1 с молочной продуктивностью черно-пестрых голштинизированных коров показал, что более редкий аллель *bIGF-1-SnaBI^B* является предпочтительным по трем исследуемым признакам молочной продуктивности. Так превышение значений медиан по этим признакам у коров с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{BB}*, по отношению к коровам с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{AA}*, составляет 357 л молока, 16 кг молочного жира и 11 кг молочного белка по признакам удоя, жирномолочности и белковомолочности соответственно. Значения медианы и интерквартильного размаха признаков удоя, жирномолочности и белковомолочности у особей с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{AA}* практически одинаковы с гетерозиготами *bIGF-1-SnaBI^{AB}*. Это позволяет обозначить аллель *bIGF-1-SnaBI^B* как предпо-

читительный аллель, а генотип *bIGF-1-SnaBI^{BB}* как предпочтительный генотип по всем трем признакам молочной продуктивности.

Результаты оценки достоверности различий

групп животных с разными генотипами по полиморфизму *bIGF-1-SnaBI* по показателям молочной продуктивности между собой приведены в табл. 6.

Таблица 5

Показатели молочной продуктивности у коров черно-пестрой голштинизированной породы по полиморфизму SnaBI гена *bIGF* Me (25%; 75%)

Генотип	n	Непараметрические характеристики	Удой, л	Жирномолочность, кг	Белковомолочность, кг
<i>bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	59	Me (25%; 75%)	9083 (8485; 9782)*	364 (339; 396)*	295 (273; 312)*
		ДИ -95%; +95%	8883; 9513	349; 373	289; 303
<i>bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	133	Me (25%; 75%)	8852 (8241; 9375)	345 (324; 375)	285 (267; 308)
		ДИ -95%; +95%	8561; 8999	338; 351	278; 295
<i>bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	104	(Me 25%; 75%)	8726 (8167; 9503)	348 (320; 374)	284 (261; 306)
		ДИ -95%; +95%	8527; 9147	337; 363	275; 291
Общая выборка	296	Me (25%; 75%)	8878 (8288; 9533)	348 (327; 377)	287 (267; 308)

* – генотипы, обладающие статистически значимым понижающим эффектом на признаки молочной продуктивности (при $p < 0,05$)

Таблица 6

Значения χ^2 статистики по результатам применения теста Фишера у групп животных с разными генотипами по полиморфизму гена *bIGF-1-SnaBI*

Сравниваемые пары генотипов		Удой, л	Жирномолочность, кг	Белковомолочность, кг
<i>bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	0,02*	0,01*	0,02*
<i>bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	0,03*	0,01*	0,06**
<i>bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	0,67	0,70	0,58

* – различие между генотипами статистически значимо при $p < 0,05$;

** – различие между генотипами статистически значимо при $p < 0,1$.

По данным, приведенным в табл. 6, можно отметить, что в случае SnaBI-полиморфизма гена *bIGF-1* предпочтительный генотип *bIGF-1-SnaBI^{BB}* по всем трем признакам молочной продуктивности статистически значимо ($\alpha = 0,05$) отличается от альтернативного генотипа *bIGF-1-SnaBI^{AA}*, а также от гетерозиготного генотипа *bIGF-1-SnaBI^{AB}* ($\alpha = 0,05$, кроме признака белковомолочности, где $\alpha = 0,1$).

Результаты оценки характера фенотипического эффекта SnaBI-полиморфизма гена *bIGF-1* на признаки удоя, жирномолочности и белковомолочности позволяют охарактеризовать его как повышающий по всем трем признакам. Разница в показателях продуктивности животных с предпочтительным гено-

типом *bIGF-1-SnaBI^{BB}* и общей выборкой составляет 205 л молока, 16 кг молочного жира и 8 кг молочного белка в пересчете на 305 суток лактации по признакам удоя, жирномолочности и белковомолочности соответственно. По данным интервального оценивания по признакам удоя, жирномолочности и белковомолочности, отличия группы животных с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{BB}* от общей выборки являются статистически значимыми.

Данные, касающиеся ассоциации SnaBI-полиморфизма гена *bIGF-1* с признаками молочной продуктивности у голштинизированного черно-пестрого скота, получены нами впервые и позволяют рекомендовать генотип *bIGF-1-SnaBI^{BB}* в качестве универсального

ДНК-маркера повышенной молочной продуктивности по признакам удоя, жирномолочно-

сти и белковомолочности у представителей этой породы.

Заключение

Таким образом, по результатам нашего исследования следует отметить, что предпочтительный генотип не всегда характеризуется повышенным уровнем молочной продуктивности по сравнению с уровнем продуктивности по общей выборке. В таком случае, по нашему мнению, ДНК-типирование и отбор животных по таким генотипам являются недостаточно эффективными. Более того, в некоторых случаях понижающий эффект альтернативного генотипа по отношению к общей выборке выражен сильнее, чем повышающий эффект предпочтительного генотипа, как в случае полиморфизма *HinfI* гена *bPit-1*. Поэтому, на наш взгляд, при оценке перспективности применения полиморфных

вариантов потенциальных генов-кандидатов в качестве генетических маркеров повышенной продуктивности целесообразно проводить оценку характера фенотипического эффекта полиморфизма путем сравнения показателей продуктивности животных с соответствующими генотипами по данному признаку, как между собой, так и по отношению к показателям продуктивности общей выборки. Это позволяет не только установить предпочтительный генотип, но также качественно определить характер (повышающий/понижающий/нейтральный) и количественно оценить степень проявления фенотипического эффекта полиморфных вариантов гена на исследуемый признак.

Список используемых источников

1. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action / H. Werner [et al.] // *Vitamins and Hormones*. – 1994. – Vol. 48. – P. 51–58.
2. *SnaBI*-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста (*bIGF-1*) / Е.В. Белая, М.Е. Михайлова // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2009. – Т. 9. – С. 153–159.
3. Влияние *HinfI*-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста *bPit-1* на признаки молочной продуктивности крупного рогатого скота голштинской и черно-пестрой пород / М.Е. Михайлова, Е.В. Белая // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2010. – Т. 11. – С. 120–126.
4. *Pit1* gene *Hinf I* RFLP and growth traits in double-muscled Belgian Blue cattle / R. Renaville [et al.] // *J. Anim. Sci.* – 1997. – Vol. 75. – №1. – P. 146–148.
5. Effect of polymorphism in *IGF-1* gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle / E. Siadkowska [et al.] // *Animal Science Papers and Reports*. – 2006. – Vol. 24. – №3. – P. 225–237.
6. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002 – 312 с.
7. Effect of polymorphisms of growth hormone (GH), *Pit-1*, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black-and-White cows / L. Zwierzchowski [et al.] // *Anim. Sci. Pap. Rep.* – 2002. – Vol. 20. – P. 213–227.
8. Analysis of bovine pituitary specific transcription factor-*Hinf I* gene polymorphism in Indian zebuine cattle / M. Mukesh [et al.] // *Livestock Science*. – 2008. – Vol. 113. – P. 81–86.

Дата поступления статьи 18 ноября 2011 г.