

УДК 577.21:636.23.082.2

Е. В. БЕЛАЯ, М. Е. МИХАЙЛОВА

**ОЦЕНКА АССОЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ГЕНОВ
СОМАТОТРОПИНОВОГО КАСКАДА
С УРОВНЕМ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

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

(Поступила в редакцию 06.03.2014)

Введение. Исследования ассоциации полиморфных генов-кандидатов с признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота в настоящее время широко проводятся за рубежом в рамках различных селекционных программ. Оценка их ассоциации с количественными признаками сводится в основном к определению предпочтительного аллеля и генотипа путем сравнения показателей продуктивности у животных с разными генотипами между собой [1–3]. Данный подход позволяет выявить генотипы, характеризующиеся повышенным и пониженным уровнями продуктивности по исследуемому признаку, однако он не отражает степень их превосходства в показателях продуктивности по отношению ко всему исследуемому поголовью. Поэтому мы предложили общепринятый сравнительный анализ генотипов между собой дополнить оценкой фенотипического эффекта предпочтительного и нежелательного генотипов по отношению к уровню продуктивности общей выборки. Мы предположили, что это позволит сопоставить и оценить количественно степень проявления повышающих эффектов для предпочтительных генотипов и понижающих эффектов для нежелательных генотипов.

В своей работе мы исследовали полиморфные гены-кандидаты, принадлежащие к группе соматотропинового каскада. У крупного рогатого скота выявлен широкий набор их аллелей, представляющих интерес для MAS-селекции в качестве генетических маркеров молочной продуктивности.

Известно, что гормон роста (GH – соматотропин) наряду с гормоном пролактином (PRL) является регулятором не только роста, но и лактации у млекопитающих. Синтез соматотропина и реализация его физиологических эффектов представляет собой цепь последовательных взаимодействий белок – рецептор (соматотропиновый каскад). Ключевыми звеньями этой цепи являются: гипофизарный фактор транскрипции-1 (bPit-1), запускающий экспрессию генов соматотропина и пролактина, пролактин и гормон роста, регулирующие лактацию, рецептор гормона роста (bGHR), передающий гуморальный сигнал соматотропина к клеткам-мишеням и инсулиноподобный фактор роста-1 (bIGF-1), запускающий внутриклеточные ответы на воздействие соматотропина [1 – 6]. В качестве потенциальных генетических маркеров молочной продуктивности в наше исследование были включены однонуклеотидные замены, локализованные в ключевых генах соматотропинового каскада: *bPit-1-HinFI*, *bPit-1StuI*, *bPRL-RsaI*, *bGH-AluI*, *bGHR-SspI* и *bIGF-1-SnaBI*.

Цель работы – установить предпочтительные и нежелательные генотипы полиморфных генов-кандидатов по признакам молочной продуктивности у коров голштинской и белорусской черно-пестрой породы, оценить характер их фенотипического эффекта относительно продуктивности общих выборок животных этих пород.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования послужили быкопроизводящие коровы голштинской и белорусской черно-пестрой пород с условной долей наследуемости по голштинской породе до 69,1 %, 2000–2001 г. рождения. Средняя продуктивность по наивысшей лактации составляет 9219 ± 1073 л, жирность молока – $3,87 \pm 0,04$ %, что соответствует требованиям Республиканской программы по племенному делу (2011–2015). Предмет исследования – полиморфные гены соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bPRL*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*). Материал исследования – образцы ДНК, выделенной из крови животных голштинской ($n = 109$), а также белорусской черно-пестрой пород ($n = 296$). Проанализированы показатели молочной продуктивности (удой, жирномолочность и белковомолочность в пересчете на 305 сут. лактации). В качестве источника информации использованы племенные карты исследуемых животных с данными об их молочной продуктивности на основании систематического анализа состава молока, проводимого в лаборатории предприятия, предоставляющего образцы.

Геномную ДНК выделяли из крови коров, используя набор Diatom™ Prep²⁰⁰ (Лаборатория Изоген, Москва), согласно инструкции фирмы изготовителя. Определение генотипа осуществлялось методом ПЦР ПДРФ. 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> -HinI [2]	94 ⁰ –1 мин; (95 ⁰ –45 с; 56 ⁰ –60 с; 72 ⁰ –60 с) × 35; 72 ⁰ –10 мин	HinFI -F: 5'-aaaccatcatctccctctctt-3'
		HinFI -R: 5'-aatgtacaatgtgcctctctgag-3'
<i>bPit-1</i> -StuI [3]	95 ⁰ –5 мин; (95 ⁰ –45 с; 55 ⁰ –45 с; 72 ⁰ –45 с) × 35; 72 ⁰ –10 мин	StuI-F: 5'caaatggctcttttctgtgtgttacaggg-3'
		StuI-R: 5'-ctttaaactcatggcaaacctttc-3'
<i>bPrl</i> -RsaI [4]	95 ⁰ –5 мин; (95 ⁰ –30 с; 63 ⁰ –30 с; 72 ⁰ –30 с) × 30; 72 ⁰ –10 мин	RsaI-F: 5'-gccttcagaagtcgtttgttttc-3'
		RsaI-R: 5'-cgagtccttatgagcttgattctt-3'
<i>bGH</i> -AluI [5]	95 ⁰ –5 мин; (95 ⁰ –30 с; 64 ⁰ –30 с; 72 ⁰ –60 с) × 30; 72 ⁰ –10 мин	AluI -F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3'
		AluI-R: 5'-gttcttgagcagcgct-3'
<i>bGHR</i> -SspI [6]	95 ⁰ –5 мин; (95 ⁰ –30 с; 60 ⁰ –30 с; 72 ⁰ –30 с) × 30; 72 ⁰ –10 мин	SspI-F: 5-aatactgggctagcagtgacaatat-3'
		SspI-R: 5'-acgttctactgggttgatga-3'
<i>bIGF-1</i> -SnaBI [7]	95 ⁰ –5 мин; (95 ⁰ –30 с; 64 ⁰ –30 с; 72 ⁰ –30 с) × 35; 72 ⁰ –10 мин	SnaBI-F: 5'-attacaagctgcctgcccc-3'
		SnaBI-R: 5'-accttaccgctatgaaaggaact-3'

Характеристика анализируемых аллелей и схемы рестрикционного анализа амплификатов исследуемых генов представлены в табл. 2.

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием стандартного пакета программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 1994–2001). При проведении статистического анализа для количественных данных первоначально определяли характер распределения (Shapiro-Wilk', W-test). Так как в большинстве групп количественные признаки не имели приближенно нормального распределения, а число животных с редкими генотипами в некоторых случаях было меньше 20, то оценку количественных признаков проводили с помощью методов непараметрической статистики, более подробно описанных ниже [8].

Результаты и их обсуждение. Предпочтительный и нежелательные генотипы для каждого полиморфизма определялись путем сравнения показателей продуктивности в группах животных с разными генотипами между собой. Статистическая оценка наблюдаемых различий проводилась методом рангового анализа вариаций для трех и более независимых групп по Краскелу–Уоллису (Kruskal–Wallis ANOVA). В случаях, когда в одной из групп число животных было меньше шести, либо были выявлены животные только с двумя генотипами (из трех возможных), сравнение проводилось с помощью U-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test) для двух независимых групп (табл. 3) [8]. Для полиморфизмов, у которых группы животных с разными генотипами достоверно различаются между собой по конкретному признаку, генотип, характеризующийся наиболее высоким уровнем продуктивности, является предпочтительным, а два других – нежелательными при отборе животных в ходе селекционного процесса.

Т а б л и ц а 2. Схемы рестрикционного анализа продуктов ПЦР и характеристика выявляемых аллелей

Полиморфизм гена	Рестриктаза	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;
<i>bGH-AluI</i> Экзон 5	AluI	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	SspI	T* → A (Phe → Val)	T/ <i>bGHR-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	SnaBI	T* → C	T/ <i>bIGF-1-SnaBI</i> ^A	<i>IGF-1-SnaBI</i> ^{BB} : 249; <i>IGF-1-SnaBI</i> ^{AA} : 223 + 26; <i>IGF-1-SnaBI</i> ^{AB} : 249 + 223 + 26

* Нуклеотид, распознаваемый рестриктазой.

Т а б л и ц а 3. Значения тестовых статистик *P* для оценки различия групп коров с предпочтительными и нежелательными генотипами полиморфных генов соматотропинового каскада

SNP	Значения тестовых статистик, <i>P</i>					
	Голштинская порода			Белорусская черно-пестрая порода		
	удой	жирномолочность	желковомолочность	удой	жирно-молочность	желковомолочность
<i>bPit-1-HinFI</i>	0,342*	0,819*	0,532*	0,317	0,057	0,042
<i>bPit-1-StuI</i>	0,578*	0,83*	0,911*	0,349*	0,155*	0,154*
<i>bPRL-RsaI</i>	0,763*	0,847*	0,899*	0,935*	0,761*	0,671*
<i>bGH-AluI</i>	0,387*	0,632*	0,254*	0,715	0,035	0,496
<i>bGHR-SspI</i>	0,040*	0,677*	0,376*	0,630	0,801	0,212
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	0,044	0,499	0,036	0,041	0,011	0,031

П р и м е ч а н и е. Статистически значимые отличия ($P < 0,05$) выделены жирным шрифтом.

* Сравнение проведено с помощью U-критерия Манна-Уитни.

В табл. 3 приведены значения тестовых статистик *P*, полученные в ходе сравнительного анализа молочной продуктивности в группах животных с тремя разными генотипами (либо двумя генотипами, если третий не выявлен, либо число животных не подлежит статистической обработке). Каждая строка таблицы отражает результаты исследования отдельного полиморфизма, столбцы соответствуют исследованному признаку у представителей отдельной породы (голштинской и белорусской черно-пестрой).

Как видно из табл. 3, у коров голштинской породы из восемнадцати исследованных вариантов (по три признака для каждого из шести полиморфизмов) установлены три случая статистически значимого различия продуктивности между группами животных с разными генотипами: для полиморфизма *bGHR-SspI* (удой) и *bIGF-1-SnaBI* (удой и белковомолочность).

У коров белорусской черно-пестрой породы таких случаев выявлено пять: для полиморфизма *bPit-1-HinFI* (белковомолочность), *bGH-AluI* (жирномолочность) и *bIGF-1-SnaBI* (удой, жирномолочность и белковомолочность).

Вторым этапом исследования являлась оценка ассоциации генотипа (предпочтительного или нежелательного) с признаком путем сравнения продуктивности этой группы животных по отношению к общей выборке.

Значимость наблюдаемых различий проверялась методом построения 95%-ного доверительного интервала (ДИ) для медианы. Этот метод позволяет оценить значимость отличий между группой, являющейся частью общей выборки, и общей выборкой в случае отклонения от нормального распределения [8]. Генотип (предпочтительный или нежелательный), который отличался от выборки статистически значимо, принимался как ассоциированный с исследуемым признаком. Данные представлены в виде M_e (25 %; 75 %), где M_e – медиана признака, 25 %; 75 % – интерквартильный размах.

Ассоциация с признаком предпочтительных генотипов установлена только в группе коров белорусской черно-пестрой породы: генотип *bGH-AluI^{VV}* ассоциирован с повышенной жирномолочностью, а генотип *bIGF-1-SnaBI^{BB}* – с повышенной жирномолочностью и удоем. В качестве примера на рис. 1 приведены графики, отражающие жирномолочность коров белорусской черно-пестрой породы с предпочтительными и нежелательными генотипами по полиморфизму *bGH-AluI*.

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что медиана общей выборки находится ниже пределов 95%-ного ДИ группы с генотипом *bGH-AluI^{VV}*. Следовательно, группа с генотипом *bGH-AluI^{VV}* характеризуется повышенным уровнем жирномолочности по отношению к общей выборке, и наблюдаемое отличие является значимым. Следовательно, генотип *bGH-AluI^{VV}* целесообразно рассматривать как генетический маркер повышенной жирномолочности у крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы.

Ассоциация нежелательного генотипа с признаком белковомолочности установлена у коров белорусской черно-пестрой породы для генотипа *bPit-1-HinFI^{AA}*. В качестве примера на рис. 2 приведен график, отражающий уровень белковомолочности у коров белорусской черно-пестрой породы с разными генотипами по полиморфизму *bPit-1-HinFI*.

Как видно из рис. 2, предпочтительным генотипом в этом случае является генотип *bPit-1-HinFI^{BB}*, а нежелательными – *bPit-1-HinFI^{AA}* и *bPit-1-HinFI^{AB}*. Медиана белковомолочности выборки располагается за пределами 95%-ного ДИ группы с нежелательным генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}*. Это свидетельствует о том, что из трех групп с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* по уровню белковомолочности значимо от общей выборки отличается группа с нежелательным генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}*. Следовательно, этот генотип *bPit-1-HinFI^{AA}* ассоциирован с признаком и может использоваться как генетический маркер пониженной белковомолочности у коров белорусской черно-пестрой породы [9].

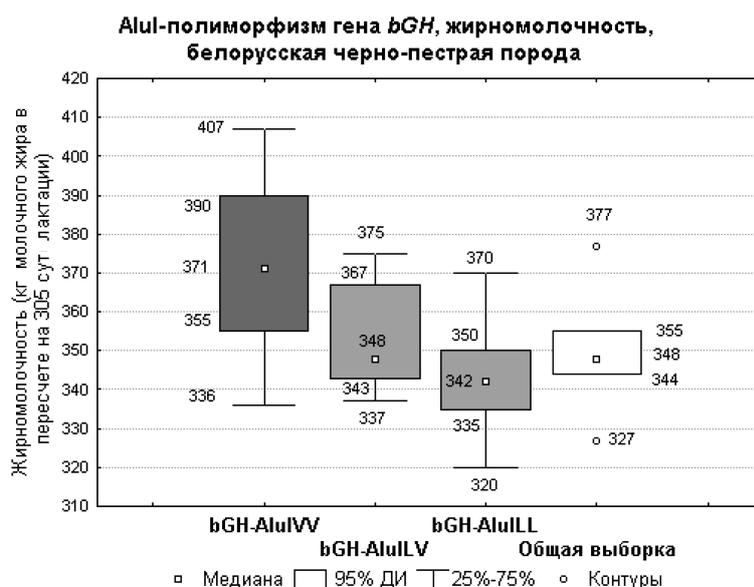


Рис. 1. Ассоциация предпочтительного генотипа *bGH-AluI^{VV}* с признаком жирномолочности у коров белорусской черно-пестрой породы

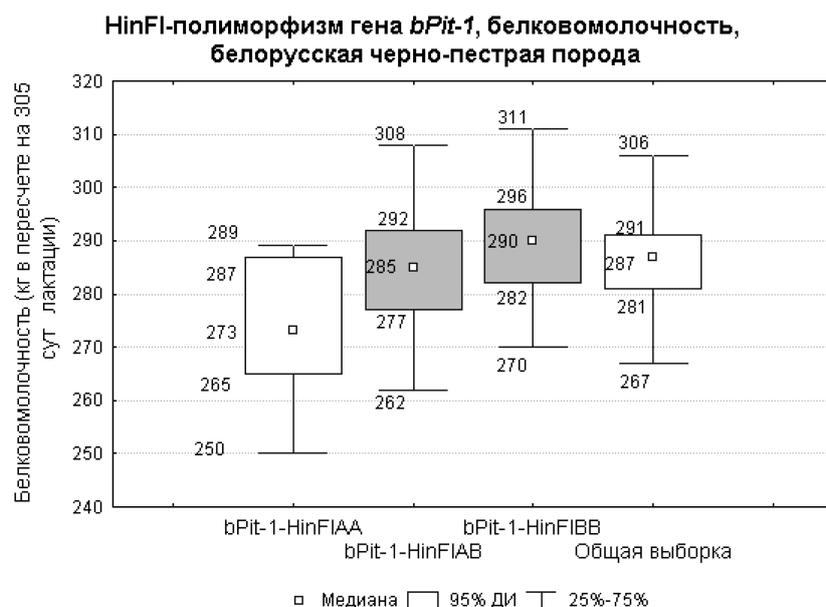
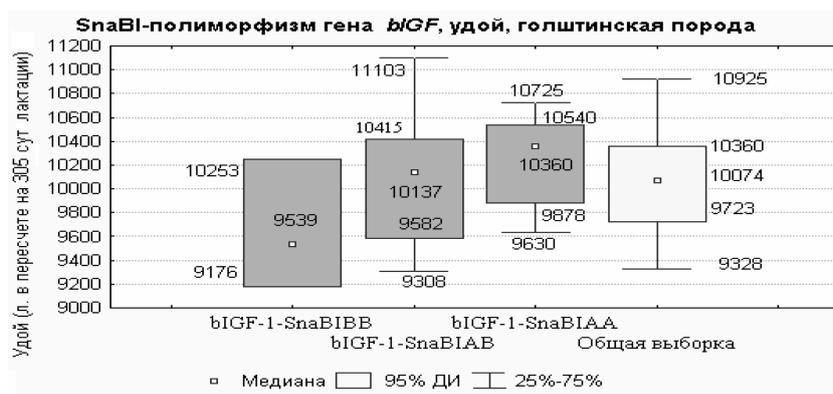
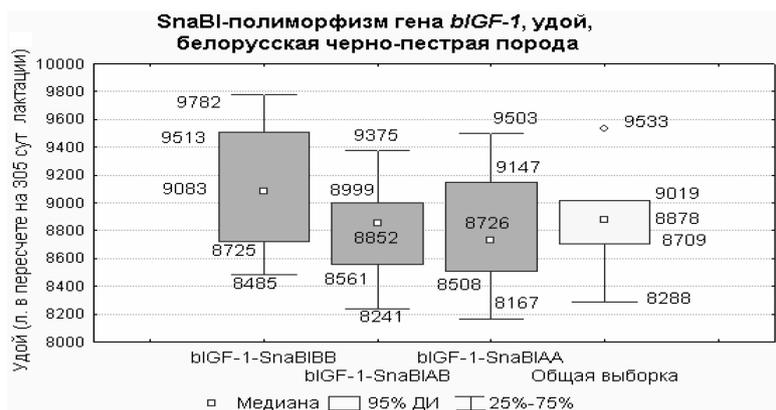


Рис. 2. Ассоциация нежелательного генотипа *bPit-1-HinFI^{AA}* с признаком белковомолочности у коров белорусской черно-пестрой породы



а



б

Рис. 3. Фенотипический эффект предпочтительного и нежелательного генотипов полиморфизма *bIGF-1-SnaBI* на признак удоя у коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород: а – голштинская порода (для генотипа *bIGF-1-SnaBI^{BB}* совпали границы 95%-ного ДИ и интерквартильного размаха); б – белорусская черно-пестрая порода

Нейтральный фенотипический эффект по отношению к общей выборке установлен у коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород для генотипов *bIGF-1-SnaBI^{AA}*, *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}* по признаку удоя. Нейтральными являются также фенотипические эффекты предпочтительного генотипа *bGHR-SspI^{YY}* и нежелательных генотипов *bGHR-SspI^{FY}* и *bGHR-SspI^{FF}* на признак удоя коров голштинской породы. В таком случае продуктивность групп с предпочтительным и нежелательным генотипом находится в пределах значения общей выборки. В качестве примера на рис. 3 приведены характеристики удоя у коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород по полиморфизму *bIGF-1-SnaBI*.

На рис. 3 видно, что на обоих графиках медианы общих выборок локализованы в пределах 95%-ных ДИ групп с предпочтительными и нежелательными генотипами. Это значит, что удои в группах с генотипами *bIGF-1-SnaBI^{AA}*, *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}* находится в пределах срединных значений обеих выборок, т. е. ассоциация с признаком не является статистически значимой. Следовательно, эти генотипы не могут быть генетическими маркерами повышенной либо пониженной молочной продуктивности.

Заключение. В результате исследования полиморфных генов соматотропинового каскада предпочтительные и нежелательные генотипы у коров голштинской породы выявлены в трех случаях: по признаку удоя для полиморфизмов *bGHR-SspI* (предпочтительным является генотип *bGHR-SspI^{FY}*) и *bIGF-1-SnaBI* (предпочтительным является генотип *bIGF-1-SnaBI^{AA}*), а также по признаку белково-молочности для полиморфизма *bIGF-1-SnaBI* (предпочтительным является генотип *bIGF-1-SnaBI^{AA}*). У коров белорусской черно-пестрой породы предпочтительные и нежелательные генотипы установлены в пяти случаях. Один по признаку удоя – для полиморфизма *bIGF-1-SnaBI* (предпочтительным является генотип *bIGF-1-SnaBI^{BB}*), два по признаку жирномолочности: для полиморфизма *bGH-AluI* (предпочтительным является генотип *bGH-AluI^{VV}*) и *bIGF-1-SnaBI* (предпочтительным является генотип *bIGF-1-SnaBI^{BB}*) и два случая по признаку белково-молочности: по полиморфизму *bPit-1-HinFI* предпочтительным является генотип *bPit-1-HinFI^{BB}*, по полиморфизму *bIGF-1-SnaBI* предпочтительным является генотип *bIGF-1-SnaBI^{BB}*.

В ходе анализа фенотипических эффектов предпочтительных и нежелательных генотипов относительно продуктивности общей выборки установлено, что с признаком значимо может быть ассоциирован как предпочтительный, так и нежелательный генотип. Также продуктивность предпочтительного и нежелательного генотипов может быть в пределах значения общей выборки. В таком случае фенотипический эффект полиморфизма является нейтральным.

Генотипы, ассоциированные с повышенным или пониженным уровнем молочной продуктивности, рекомендованы в качестве генетических маркеров для маркер-сопутствующей селекции. Проведение отбора животных по предпочтительному генотипу (как и по нежелательному) в случае нейтрального фенотипического эффекта, на наш взгляд, является нецелесообразным.

Литература

1. Vlaic A., Edriss V. A., Rahmani H. R. et al. // Buletinul USAMV CN. 2003. Vol. 59. P. 188–191.
2. Renaville R., Hecht C., Geldermann H. et al. // J. Dairy Sci. 1997. Vol. 80, № 12. P. 3431–3438.
3. Huang W., Wang Y., Price S. E. et al. // Animal Genetics. 2008. Vol. 39. P. 554–557.
4. Ghasemi N. Maj A., Zwierzchowski L. et al. // International Journal of Genetics and Molecular Biology. 2009. Vol. 1, № 3. P. 48–51.
5. Pawar R. S., Ge W., Davis M. E. et al. // Indian Journal of Animal Sciences. 2007. Vol. 11, № 9. P. 884–888.
6. Fontanesy L., Lagziel E., Lipkin M. et al. // Ital. J. Anim. Sci. 2007. Vol. 6. P. 415–420.
7. Siadkowska E., Boichard D. et al. // Anim. Sci. Papers Reports. 2006. Vol. 24. P. 225–237.
8. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., 2002.
9. Белая Е. В., М. Е. Михайлова, Н. В. Батин // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. 2012. Т. 13. С. 30–35.

E. V. BELAYA, M. E. MIKHAILOVA

**EVALUATION OF POLYMORPHIC GENE ASSOCIATION OF SOMATOTROPIN CASCADE
WITH CATTLE PRODUCTIVITY**

Summary

As potential genetic markers of milk productivity traits in cattle of Holstein and Black-and-white breeds were studied six single nucleotide replacements, situated in key gene of somatotropin cascade: *bPit-1*-HinfI, *bPit-1*StuI, *bPRL*- RsaI, *bGH*-AluI, *bGHR*-SspI and *bIGF-1*-SnaBI. Was shown that in time of evaluation of polymorphism association with a sign, it is expedient to carry out the evaluation of phenotypic effect of preferable and undesirable genotypes in relation to the level of general selection productivity.