

## МЕЖПОРОДНЫЙ СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИИ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА С ПРИЗНАКАМИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ У КОРОВ ГОЛШТИНСКОЙ И ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОД

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

### Введение

Современные ДНК-технологии, такие, как маркер-сопутствующая селекция, позволяют ускорить темпы селекции и сократить финансовые затраты при осуществлении классических селекционных мероприятий. Однако отбор животных с предпочтительными генотипами, ассоциированными с признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота, против ожидания, не во всех случаях приносит такой значительный и скорый результат. Многие авторы обращают внимание на необходимость совершенствования способов оценки фенотипических эффектов генетических маркеров [1–3]. Поэтому особый интерес представляет разработка методов оценки ассоциации полиморфных генов-кандидатов с количественными хозяйственно-полезными признаками.

Исследования ассоциации полиморфных генов-кандидатов с признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота в настоящее время сводятся, в основном, к определению предпочтительного аллеля и генотипа путем сравнения между собой показателей продуктивности у животных с разными генотипами [2, 4–5]. Данный подход позволяет выявить генотипы, характеризующиеся повышенным и пониженным уровнем 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 [6, 7]. Это позволило сопоставить и оценить количественно степень проявления

повышающих эффектов для предпочтительных генотипов и понижающих эффектов для нежелательных генотипов. Ранее, в ходе исследований полиморфных генов-кандидатов, принадлежащих к группе соматотропинового каскада, нами было показано, что, во-первых, продуктивность животных с предпочтительным и нежелательным генотипом может находиться в пределах среднего значения по общей выборке. В таком случае селекционный отбор животных с предпочтительным генотипом будет недостаточно эффективен. Во-вторых, были установлены случаи, когда один и тот же генотип у представителей голштинской породы и белорусской черно-пестрой обладал противоположным эффектом на признак белковомолочности [8, 9].

В настоящее время выявлено большое количество потенциальных генов-кандидатов, полиморфные варианты которых ассоциированы с признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота. Целью данного исследования было оценить ассоциацию полиморфных вариантов гена каппа-казеина с признаками удоя за 305 суток и белковомолочности (молочный белок, кг, за 305 суток лактации) с применением ранее разработанного подхода.

Казеин является основным белком молока, представленным в нем в нескольких формах –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и др. Показателем, который в наибольшей степени отличает одну форму казеина от другой, является содержание фосфора. Наибольшее количество фосфора выявлено в  $\alpha$ -казеине (1%) и в 10 раз меньше в  $\gamma$ -казеине (0,1%).

Ген *CSN3*, кодирующий белок каппа-казеин, локализован в шестой хромосоме, имеет размер 13 т.п.о. и состоит из 5 экзонов и 4 интронов [10].

На сегодняшний день описано семь аллелей гена *CSN3*: А, В, С, D, E, F, G, H. Наиболее часто у крупного рогатого скота (КРС) встречаются А и В аллельные варианты каппа-казеина, отличающиеся двумя аминокислотными заменами в 136 и 148 положениях полипептидной цепи, вызванными соответствующими точковыми мутациями в позициях 5309 (С→Т) и 5345 (А→С) [10]. Показано, что аллель В гена каппа-казеина положительно коррелирует с более высоким содержанием общего протеина в молоке, повышенным содержанием каппа-казеина, а также лучшими сыродельными характеристиками молока, что в свою очередь может быть использовано в селекционной практике. Анализ данных показал, что более твердые сыры могут быть изготовлены только из молока коров, имеющих генотип ВВ, также из такого молока получается больший выход сыра, чем из молока коров, имеющих генотипы АА или АВ. В связи с вышеперечисленным, аллель В гена каппа-казеина предложено использовать в качестве генетического маркера молочной продуктивности в селекционной практике КРС [10, 11].

### Материалы и методы

Материалом исследования послужили быкопроизводящие коровы голштинской (n = 109) и белорусской черно-пестрой породы с условной долей наследуемости по голштинской породе до 69,1% (n = 289). Средняя продуктивность по наивысшей лактации составляет  $9219 \pm 1073$  л, что соответствует требованиям Республиканской программы по племенному делу (2011–2015 гг.). 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 (Несвижский филиал РУСП «Минское племенное предприятие»).

Геномную ДНК выделяли из крови коров, используя набор Diatom™ Prep<sup>200</sup> (Лаборатория Изоген, Москва), согласно инструкции фирмы-изготовителя. Определение генотипа осуществлялось методом ПЦР-ПДРФ.

Для генотипирования исследуемых животных по локусу каппа-казеина были использованы праймеры VAR5 и VAR3 [4]:

VAR5 5-ata gcc aaa tat atc cca att cag t-3

VAR3 5-ttt att aat aag tcc atg aat ctt g-3

Режим ПЦР: «горячий старт» 95 °С – 5 мин; 94 °С – 1 мин – денатурация; 58 °С – 1 мин – отжиг праймеров; 72 °С – 1 мин – синтез (35 циклов); элонгация – 5 мин при 72 °С.

Затем аликвоту амплификата 10 мкл обрабатывали 20 ед. рестриктазы *Hind* III в 1х буфере «W» с добавлением BSA (СибЭнзим, Россия) и инкубировали при 37 °С в течении 8 часов. Фрагменты разделяются в 2%-ном агарозном геле и визуализируются в УФ после окрашивания бромистым этидием (рис. 1).

Аллель А не имеет сайта рестрикции, поэтому амплификат после рестрикции остается неизменным (рис. 1). Аллель В имеет сайт рестрикции для рестриктазы *Hind* III, поэтому в результате рестрикции образуются два фрагмента: 377 и 155 п.н. Присутствие в образце трех фрагментов свидетельствует о гетерозиготном генотипе АВ.

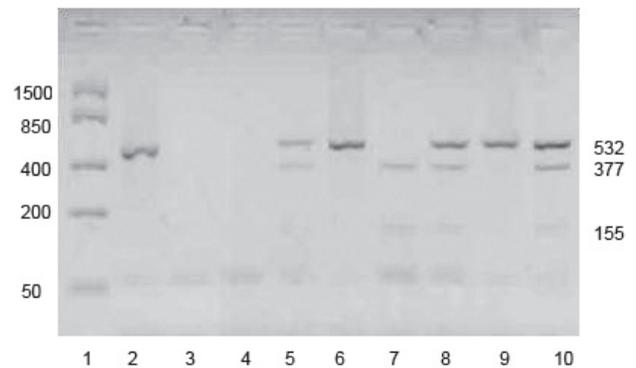


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bCSN-Hind* III

Дорожка 1 – маркер молекулярных масс FastRuler™ Low Range DNA Ladder, dye-to-use, № SM1103 (Fermentas, Литва); дорожка 2 – положительный контрольный образец ПЦР-продукт 532 п.н. фрагмента гена *bCSN-Hind* III; дорожка 3 – отрицательный контрольный образец ПЦР; дорожка 4 – отрицательный контрольный образец рестрикции; дорожки 5, 8, 10 – фрагменты рестрикции 532, 377 и 155 п.н., соответствующие генотипу *bCSN-Hind* III<sup>AB</sup>; дорожки 6, 9 – фрагменты рестрикции 532 п.н., соответствующий генотипу *bCSN-Hind* III<sup>AA</sup>; дорожка 7 – фрагменты рестрикции 377, 155 п.н., соответствующие генотипу *bCSN-Hind* III<sup>BB</sup>.

Электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле (SeaKem LE Agarose, Lonza, США)

## Результаты и обсуждение

Оценка гена каппа-казеина в качестве генетического маркера молочной продуктивности у коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород, проводилась в два этапа.

Первый этап отражает традиционный подход, который предполагает определение предпочтительного и нежелательного генотипа путем сравнения между собой показателей продуктивности у соответствующих групп животных. Традиционно предпочтительным считается генотип, обладатели которого характеризуются наибольшей продуктивностью по исследуемому признаку. Генотипы, обладатели которых характеризуются более низкой продуктивностью по исследуемому признаку, принимаются как нежелательные.

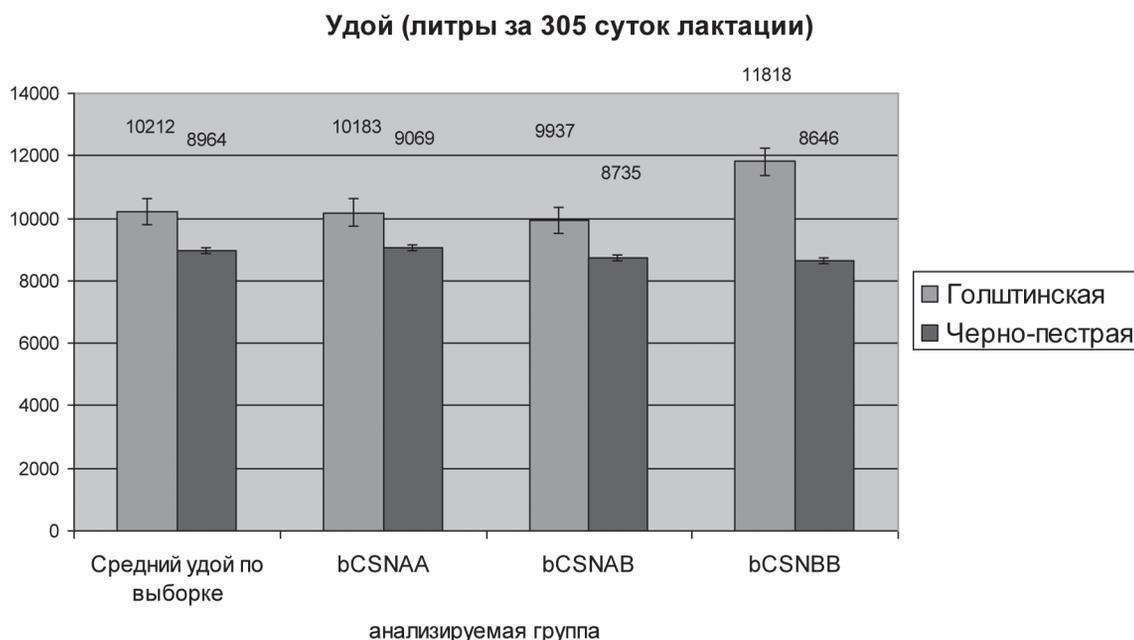
Второй этап, предложенный нами дополнительно к традиционному подходу, включал последующее сравнение показателей продуктивности у групп животных с предпочтительными и нежелательными генотипами относительно общей выборки и оценку значимости наблюдаемых отличий.

Средние значения удоя коров голштинской и черно-пестрой породы отражены на рис. 2.

У голштинских коров по признаку удоя лидирует группа с генотипом  $bCSN3^{BB}$ . Данный генотип является предпочтительным по от-

ношению к генотипу  $bCSN3^{AA}$ . У коров черно-пестрой породы мы отмечаем противоположную тенденцию: несколько повышенный удой наблюдается в группе с генотипом  $bCSN3^{AA}$  и, следовательно, данный генотип является предпочтительным (рис. 2).

Статистическая оценка разницы между группами с разными генотипами, а также сравнение продуктивности животных с определенным генотипом по отношению к общей выборке проводилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Если величина  $t$ -статистики больше, чем  $t$  критическое двухстороннее (и  $p(T \leq t)$  двухстороннее меньше заданного уровня значимости  $\alpha$ ), то можно считать, что сравниваемые группы значимо отличаются по среднему значению признака. Результаты статистического анализа разницы показателей удоя у анализируемых групп приведены в табл. 1. Из которой следует, что на предприятии СПК АК «Снов» голштинские коровы с генотипом  $bCSN3^{BB}$  значимо отличаются и от животных с генотипом  $bCSN3^{AA}$ , и  $bCSN3^{AB}$ . Это значит, что удой в группе с генотипом  $bCSN3^{BB}$  статистически значимо превышает среднее значение выборки. Таким образом, у голштинских коров на предприятии СПК АК «Снов» генотип  $bCSN3^{BB}$  ассоциирован с повышенным удоем и может применяться как генетический маркер.



**Рис. 2.** Удой за 305 суток лактации у голштинских и черно-пестрых коров с разными генотипами по гену каппа-казеина ( $m \pm m_Q$ )

Из данных, приведенных в табл. 1, так же следует, что удой у черно-пестрых коров с генотипом *bCSN3<sup>AA</sup>* значимо отличается и от животных с генотипом *bCSN3<sup>AB</sup>*. Это позволяет рассматривать генотип *bCSN3<sup>AA</sup>* как предпочтительный у черно-пестрых коров по признаку удоя. Однако по отношению к среднему показателю выборки выявляемое

различие значимым не является. Следовательно, проведение отбора животных по данному генотипу в селекционных целях будет нецелесообразным.

Средние значения продуктивности молочного белка у коров голштинской, а также черно-пестрой породы отражены на рис. 3.

Таблица 1

**Статистическая оценка различия средних показателей удоя в группах с разными генотипами между собой и по отношению к общей выборке среди коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород**

Статистические показатели	Группы сравнения					
	AA-AB	AA-BB*	AB-BB*	AA-выборка	AB-выборка	BB-выборка*
Голштинская порода						
<i>t</i> -статистика	1,15	-2,74	-2,60	-0,14	1,05	-2,55
<i>p</i> ( <i>T</i> ≤ <i>t</i> ) двухстороннее	0,25	0,01	0,01	0,89	0,30	0,01
<i>t</i> критическое двухстороннее	1,98	1,99	2,04	1,97	1,98	1,98
Белорусская черно-пестрая порода						
<i>t</i> -статистика	2,13	0,67	0,16	-0,81	1,35	0,52
<i>p</i> ( <i>T</i> ≤ <i>t</i> ) двухстороннее	0,03	0,51	0,88	0,42	0,18	0,61
<i>t</i> критическое двухстороннее	1,98	1,98	2,01	1,97	1,97	1,97

\* – различие средних показателей в этих группах статистически значимо.

Отличие между группами статистически значимо, если *t*-статистика ≥ *t* критическое двухстороннее (и *p*(*T* ≤ *t*) ≤ α; α = 0,05)



**Рис. 3.** Продуктивность молочного белка за 305 суток лактации у голштинских и черно-пестрых коров с разными генотипами по гену каппа-казеина (*m* ± *m<sub>Q</sub>*)

Из рис. 3 видно, что у голштинских коров по признаку белковомолочности лидирует группа с генотипом  $bCSN3^{BB}$ . Данный генотип является предпочтительным по отношению к генотипу  $bCSN3^{AA}$ . У коров черно-пестрой породы группа с генотипом  $bCSN3^{BB}$  характеризуется несколько боль-

шим уровнем белковомолочности, однако эта разница находится в пределах статистической ошибки.

Результаты статистической оценки разницы между группами с разными генотипами и по отношению к общей выборке приведены в табл. 2.

Таблица 2

**Статистическая оценка различия средних показателей белковомолочности в группах с разными генотипами между собой и по отношению к общей выборке среди коров голштинской и белорусской черно-пестрой породы**

Статистические показатели	Группы сравнения					
	AA-AB	AA-BB*	AB-BB*	AA-выборка	AB-выборка	BB-выборка*
Голштинская порода						
$t$ -статистика	0,48	-2,52	-2,31	-0,29	0,30	-2,61
$p(T \leq t)$ двухстороннее	0,63	0,01	0,03	0,77	0,77	0,01
$t$ критическое двухстороннее	1,98	1,99	2,04	1,97	1,98	1,98
Белорусская черно-пестрая порода						
$t$ -статистика	0,62	0,23	0,04	0,28	-0,44	-0,17
$p(T \leq t)$ двухстороннее	0,54	0,82	0,96	0,78	0,66	0,86
$t$ критическое двухстороннее	1,97	1,98	2,01	1,97	1,97	1,97

\* – различие средних показателей в этих группах статистически значимо

Отличие между группами статистически значимо, если  $t$ -статистика  $\geq t$  критическое двухстороннее (и  $p(T \leq t) \leq a$ ;  $a = 0,05$ )

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что на предприятии СПК АК «Снов» голштинские коровы с предпочтительным генотипом  $bCSN3^{BB}$  значимо отличаются от общей выборки. Что делает целесообразным отбор коров с таким генотипом при осуществлении селекционных мероприятий для увеличения продуктивности молочного белка в популяции.

### Заключение

По результатам межпородного сравнительного анализа продуктивности голштинских и черно-пестрых коров нами было установлено следующее:

1. Фенотипический эффект полиморфного гена каппа-казеина у коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород является противоположным. Генотип  $bCSN3^{BB}$  является предпочтительным у коров голштинской породы по признаку удоя, в то время как у коров черно-пестрой породы предпочтителен генотип  $bCSN3^{AA}$ .

2. У голштинских коров генотип  $bCSN3^{BB}$  ассоциирован с повышенным удоем статистически значимо, что позволяет рекомендовать его в качестве генетического маркера для селекционных программ.

3 В отношении признака продуктивности общего молочного белка у коров голштинской и черно-пестрой пород прослеживается та же тенденция к противоположному фенотипическому эффекту генотипов. В частности генотип  $bCSN3^{BB}$  является предпочтительным у голштинских коров и альтернативным у черно-пестрых. Ассоциация генотипа  $bCSN3^{BB}$  с повышенной белковомолочностью является значимой, что позволяет рекомендовать его для селекционных программ в качестве генетического маркера повышенной белковомолочности у голштинских коров.

### Список использованных источников

1. Implementation of marker-assisted selection: practical lessons from dairy cattle / D. Boichard [et al.] // 8th World Congress on Genetics

- Applied to Livestock Production, August 13–18, 2006. – Belo Horizonte M. G. Brasil, 2006. – Vol. 34. – P. 186.
2. Testing marker assisted selection in a real breeding program / A.J. Chamberlain [et al.] // 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13–18, 2006. – Belo Horizonte M. G. Brasil. – 2006. – Vol. 34. – P. 184.
3. Can the same genetic markers be used in multiple breeds? / M.E. Goddard [et al.] // 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13–18, 2006. – Belo Horizonte M. G. Brasil. – 2006. – Vol. 34. – P. 191.
4. Increasing milk production in cattle using DNA marker assisted selection (Pit-1) / A. Vlastic [et al.] // Buletinul USAMV-CN. – 2003. – Vol. 59. – P. 188–191.
5. *Pit1* gene Hinf I RFLP and growth traits in double-musled Belgian Blue cattle / R. Renaville [et al.] // J. Anim. Sci. – 1997a. – Vol. 75. – № 1. – P. 146–148.
6. Белая, Е.В. 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 / Е.В. Белая, М.Е. Михайлова, Н.В. Батин // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – 2012. – Т. 13. – С. 30–35.
7. Михайлова, М.Е. 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.
8. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада *bGHR* и *bIGF-1* на признаки молочной продуктивности у коров голштинской породы / Е.В. Белая [и др.] // Материалы Международной научно-практической конференции «Генетика и биотехнология на рубеже тысячелетий» (к 45-летию основания Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси). – Минск 25–29 октября 2010 г. / редколл А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2010. – С. 94.
9. Генотипирование полиморфных вариантов гена гормона роста, ассоциированного с молочной продуктивностью и ДНК-диагностика мутации VLAD в белорусской популяции КРС / Е.В. Белая [и др.] // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Укр.т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; ред. кол. І.Р. Бариляк [та інш.]. – К.: Логос, 2008. – Т. 4. – С. 133–138.
10. Сулимова, Г.Е. Анализ полиморфизма ДНК кластерных генов у крупного рогатого скота: гены казеинов и гены главного комплекса гистосовместимости (*BoLA*) / Г.Е. Сулимова [и др.] // Цитология и генетика. – 1992. – Т. 26. – С. 18–26.
11. Михайлова, М.Е. ДНК-технологии в животноводстве / М.Е. Михайлова // Наука и инновации. – 2007. – № 1(47). – С. 32–36.

Дата поступления статьи 13 августа 2015 г.