

М.Е. Михайлова<sup>1</sup>, Е.В. Белая<sup>1</sup>, Н.В. Казаровец<sup>2</sup>, Н.М. Волчок<sup>1</sup>, Н.А. Камыш<sup>1</sup>

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

<sup>1</sup>ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Республика Беларусь, 220020, г. Минск, ул. Академическая, 27

<sup>2</sup>УО «Белорусский государственный аграрный технический университет»

### Введение

Достижения науки и разработка новых методов молекулярно-генетического анализа предоставили практическую возможность использования ДНК-маркеров в селекции племенных животных, что предполагает возможность определения их генетического потенциала. Генотипирование животных с помощью ДНК-маркеров позволяет найти корреляции между аллельными вариантами генов и хозяйственно-полезными признаками и целенаправленно вести селекцию на выявление и закрепление в популяции ценных аллелей [1-3].

Применение ДНК-маркеров для ускорения решения селекционных задач получило на-

звание «селекция с помощью маркеров или маркер-сопутствующая селекция (MAS – marker assisted selection)». ДНК – маркеры – это аллельные варианты генов, напрямую или косвенно связанные с продуктивными и адаптационными признаками животных, с устойчивостью или восприимчивостью к заболеваниям. Выявление предпочтительных с точки зрения селекции вариантов таких генов позволяет дополнительно к традиционному отбору животных, например, по содержанию жира в молоке, уровню удоя, проводить оценку особей по генотипу.

### Материалы и методы исследования

Для анализа в качестве биологических образцов использовалась кровь или сперма исследуемых животных. ДНК выделяли из крови животного фенольно-хлороформовым методом и в дальнейшем анализировали с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестриктивным анализом ампликонов по полиморфизму длин рестриктных фрагментов (ПДРФ) [1]. Выделение ДНК из спермы осуществлялось методом солевой экстракции с некоторыми нашими модификациями [3]. Примерное количество выделенной ДНК составляет 2-3 мкг. Полимеразная цепная реакция проводилась в амплификаторе «Biometra T-cycler».

Для амплификации фрагмента гена гормона роста *GH* использовали следующие праймеры [4]:

G-GH S: 5' ttc ggc ctc tct gtc tct ccc t-3';

G-GH R: 5'-agg cgg egg cac ttc atg ac-3'.

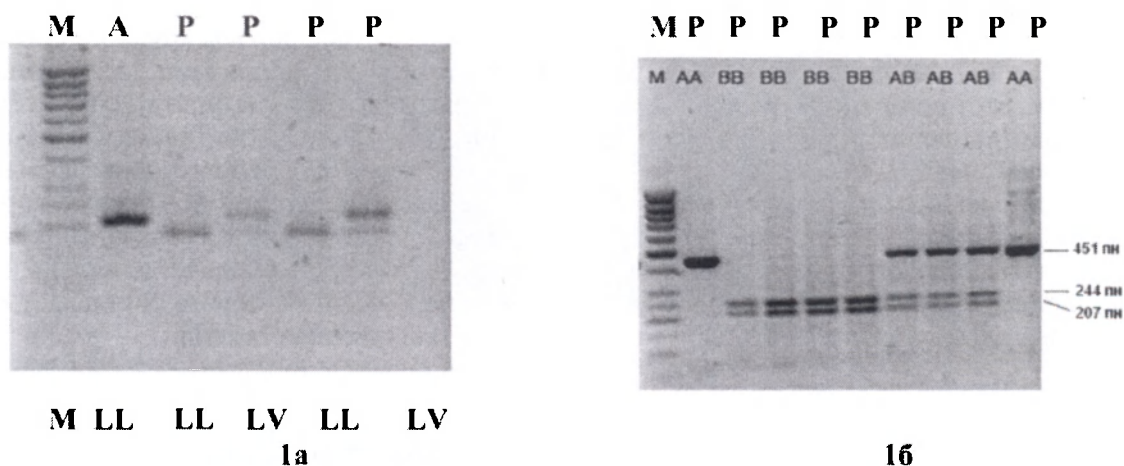
Длина амплифицированного фрагмента составляет 208 пн. Рестрикция проводилась с использованием рестриктазы *AluI*. Продукты рестрикции разделяли в 2 % агарозном геле. Результаты генотипирования представлены на электрофореграмме (Рис. 1а).

Для ДНК-типирования полиморфных вариантов гена *Pit-1* использовали праймеры следующего состава [5]:

Pit-1 S: 5'-aaa cca tea tct ccc ttc tt-3';

Pit-1 R: 5'-aat gta caa tgt gcc ttc tga g-3'.

Рестрикция проводилась с помощью рестриктазы *HinfI*. Результаты генотипирования представлены на рисунке 1б. Наличие на электрофореграмме двух полос размером 244 и 207 пн. соответствует генотипу ВВ-*Pit-1*; трех полос размером 451, 244 и 207 пн. – генотипу АВ-*Pit-1* и одной полосы размером 451 пн. – генотипу АА-*Pit-1* (Рис.1б).



**Рис. 1.** Электрофореграммы ДНК-типирования крупного рогатого скота  
**1а.** Электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции гена гормона роста (GH) в 2% агарозном геле. Условные обозначения: маркер 50 br DNA Lader (Fermentas); А–продукты амплификации, Р–продукты рестрикции, VV-, LV-, LL – генотипы.  
**1б.** Электрофореграмма продуктов рестрикции гена Pit-1. Условные обозначения: маркер 50 br DNA Lader (Fermentas); Р–продукты рестрикции, AA, AB и BB – генотипы.

Выявление ассоциации аллельных вариантов генов *GH* и *Pit-1* с молочной продуктивностью, а именно, общим удоем молока за 305 суток, содержанием жира и белка в молоке (%),

проводилось на основании данных племенных карт. Достоверность полученных результатов была проверена с помощью статистических методов оценки достоверности.

### Результаты и обсуждение

#### 1. Полиморфизм гена гормона роста (*GH*) и его связь с молочной продуктивностью крупного рогатого скота

В работах многих исследователей выполнен анализ распределения аллельных вариантов ряда структурных генов, полиморфизм которых часто оказывается связанным с основными показателями молочной продуктивности крупного рогатого скота [3, 6, 7]. Выявлены аллельные варианты гена гормона роста *GH*, ассоциированные с высоким удоем и повышенной жирностью молока [6, 8, 9].

Ген гормона роста привлекает внимание исследователей как потенциальный маркер молочной продуктивности. Соматотропин или гормон роста – один из главных регуляторов развития млекопитающих. Гормон роста синтезируется в передней доле гипофиза и регулирует интенсивность метаболизма белков, участвующих в формировании мышечных тканей. Гормон стимулирует транспорт аминокислот в мышечные клетки, кроме того, усиливает син-

тез белков, участвующих в инициации и поддержании лактации у млекопитающих [4,9].

Ген гормона роста *GH* расположен на участке хромосомы 19q26-qter, состоит из пяти экзонов, включающих около 1800 пар оснований. Продуктом экспрессии этого гена является один из представителей семейства белковых гормонов – гормон роста, который представляет собой одиночный полипептид, состоящий из 190-191 аминокислот. Гормон соматотропин необходим для постнатального развития и нормализации углеводного, липидного, азотного и минерального обменов. [4, 5].

В гене *GH* идентифицировано несколько различных мутаций [9]. Выявлена ассоциация полиморфных вариантов гена соматотропина с показателями продуктивности (живая масса, молочная продуктивность, содержание жира в молоке). Наиболее изучена взаимосвязь мутации в пятом экзоне с продуктивностью крупного рогатого скота [10]. Эта мутация представляет собой C→G трансверсию в нуклеотидной по-

следовательности 2141, в результате которой происходит замена аминокислоты лейцин (*L*) на валин (*V*) в 127 позиции полипептида. Таким образом, этот одиночный нуклеотидный полиморфизм приводит к образованию двух аллелей: *L-GH* и *V-GH*. По данным ряда исследователей *L*-аллель гена гормона роста является предпочтительным для популяции, так как обнаружена положительная корреляция с количественными признаками продуктивности крупного рогатого скота [4, 10, 11].

Нами проведен анализ генетической структуры черно-пестрой породы крупного рогатого скота по частоте встречаемости генотипов и аллелей гена гормона роста (*GH*). Установлено, что среди исследованных быков-производителей Гомельского, Витебского и Минского племпредприятий, а также коров основного селекционного стада Минского племпредприятия преобладает *L*-аллель, частота встречаемости которого составляет 83-84 % соответственно (Табл.1).

Таблица 1

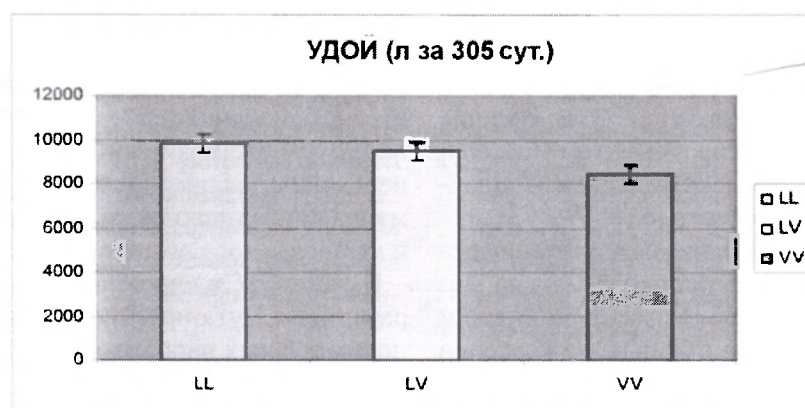
**Генетическая структура популяции быков-производителей и быкопроизводящих коров черно-пестрой породы по гену *GH***

Кол-во особей (n)	Ген гормона роста <i>GH</i>				
	Частота встречаемости генотипов, %			Частота встречаемости аллелей	
	<i>LL</i>	<i>LV</i>	<i>VV</i>	<i>L</i>	<i>V</i>
422♂	72,25	24,08	3,67	0,84±0,017	0,16±0,017
42♀	66,66	33,34	0	0,83±0,057	0,17±0,057

Изучено влияние полиморфизма локуса *GH* на голштинской, голштино-фризской и черно-пестрой породах крупного рогатого скота [10-12]. Проанализирована связь полиморфизма гена *GH* с основными показателями молочной продуктивности. Доказано, что животные с гомозиготным генотипом *LL-GH*, а также гетерозиготные особи *LV-GH* – имеют более высокие показатели молочной продуктивности по срав-

нению с обладателями гомозиготных генотипов (*VV-GH*) [9,10,11,12]. Выявлена связь полиморфизма гена *GH* с удоем и содержанием жира в молоке. По этим показателям генотипы *LL<sup>GH</sup>* превосходили генотипы *VV<sup>GH</sup>* [9-12].

Мы исследовали такие показатели молочной продуктивности, как общий удой молока за 305 суток и процентное содержание жира и белка в молоке (Рис. 2, 3, 4).



**Рис. 2.** Влияние различных аллельных вариантов гена гормона роста *GH* на общий удой (л) за 305 суток лактации.



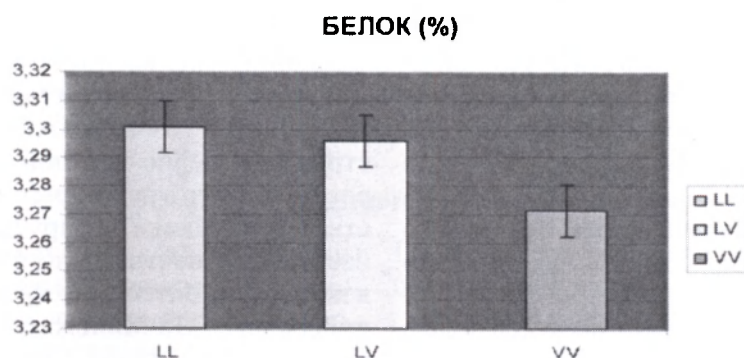


Рис. 3. Влияние различных аллельных вариантов гена гормона роста *GH* на содержание белка в молоке

Достоверно установлено, что у коров с *LL* гомозиготным генотипом по гену *GH* общий удой молока выше на 8,1 % ( $P < 0,05$ ) (Рис. 2). Содержание белка и жира в молоке выше ( $< 3,3$  % и  $< 4,06$  % соответственно), чем у особей с генотипом *VV-GH* ( $P < 0,05$ ) (Рис. 3, 4).

Таким образом, полученные результаты научных исследований позволяют утверждать, что в изученной популяции крупного рогатого скота выявлено положительное влияние *L*-аллеля гена *GH* на общий удой, содержание белка и жира в молоке.

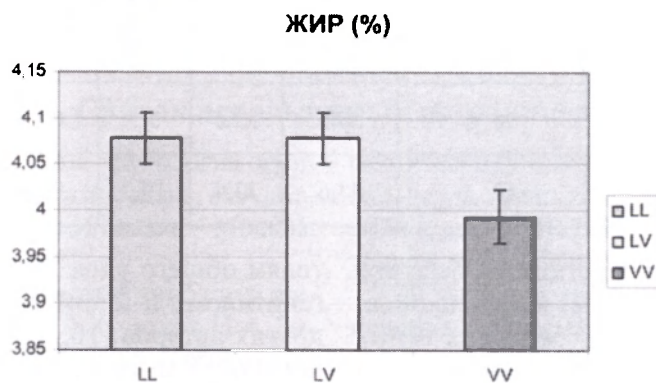


Рис. 4. Влияние различных аллельных вариантов гена гормона роста *GH* на содержание жира в молоке (%).

## 2. Полиморфные варианты гена гипофизарно-спенифического фактора транскрипции (*pit-1*), ассоциированные с молочной продуктивностью крупного рогатого скота

Интенсивность экспрессии гена гормона роста, в свою очередь, находится под контролем клеток гипоталамуса, выделяющих стимулирующий белок – рилизинг-фактор. Гипофизарно-специфический фактор транскрипции *Pit1*, являющийся регуляторным геном, осуществляет контроль транскрипции генов пролактина, тиротропина и гормона роста, а также играет важную роль в пролиферации и дифференциации клеток гипофиза, секретирующих эти гормоны. Ингибирование синтеза *Pit1* приводит к заметному снижению экспрес-

сии генов пролактина и гормона роста и значительному снижению пролиферации клеточных линий, продуцирующих эти гормоны. Поэтому полиморфизм гена *Pit1* изучается как маркер молочной продуктивности крупного рогатого скота [11, 12]. Очевидно, мутации гена *Pit1*, сопровождаемые нарушением структуры его продукта, могут оказывать существенное влияние на экспрессию контролируемых им генов и, таким образом, изменять фенотипическое проявление признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота.

Цель нашего исследования заключалась в изучении *Hinf1*-полиморфизма в шестом экзоне гена *Pit1* у представителей черно-пестрой породы крупного рогатого скота, разводимых в республике.

Проведен анализ генетической структуры популяций крупного рогатого скота в Госплемпредприятиях Минской и Витебской областей по гену гипофизарно-специфического фактора транскрипции *Pit1*. Выявлено, что частота предпочтительного генотипа *AA-Pit1* в исследуемых образцах животных Витебского племпредприятия составляет 11 %, а Минского – почти в два раза меньше – 5,6 %. Это согласуется с данными польских исследователей, которые показали связь аллельных вариантов

гена *Pit1* с молочной продуктивностью [10].

Наиболее ценным генотипом, ассоциированным с повышенным удоем молока, является генотип *AA-Pit-1*. Анализ генетической структуры черно-пестрой породы крупного рогатого скота в некоторых племенных хозяйствах Республики Беларусь существует, что частота предпочтительного генотипа *AA-Pit1* в популяции Витебского племпредприятия составляет 11 %, а Минского – почти в два раза меньше – 5,5 % (Табл. 2).

Таблица 2

**Генетическая структура популяций быков-производителей и быкопроизводящих коров белорусской черно-пестрой породы по локусу *Pit-1***

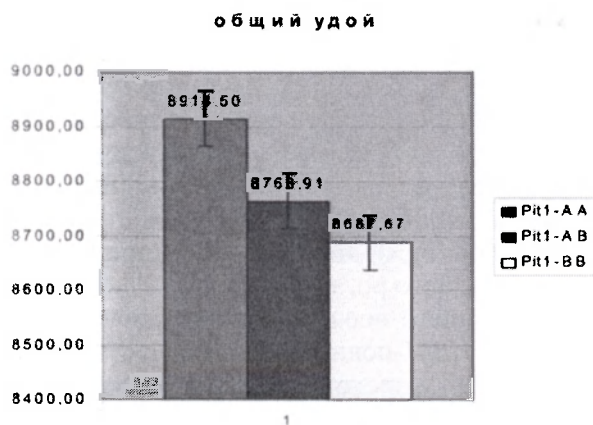
Принадлежность	Количество особей (n)	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллелей	
		<i>BB</i>	<i>AB</i>	<i>AA</i>	<i>B</i>	<i>A</i>
РСУП «Витебск племпредприятие»	118	45,8	43,2	11,0	0,67±0,043	0,33±0,043
РСУП «Минск племпредприятие»	90	58,9	35,6	5,5	0,77±0,044	0,23±0,044
РУСП «Племенной завод Красная звезда»	42	47,6	33,4	19,0	0,64±0,074	0,36±0,074

Самая высокая частота генотипа *AA* была выявлена в популяции КРС РУСП «Племенной завод Красная звезда», которая составляет 19 %.

Наибольший уровень продуктивности по такому показателю, как общий удой, имеют животные с генотипом *Pit-1<sup>AA</sup>*, по сравнению с гомозиготными особями *BB-Pit-1* генотипом.

Из полученных данных очевидно, что наибольший уровень продуктивности по показателю

общего удоя характерен для особей с генотипом *Pit-1<sup>AA</sup>*, что согласуется с данными других авторов [10, 11, 12]. Особи с генотипом *Pit-1<sup>BB</sup>* имеют наименьшие показатели по удою. В частности, нами показано, что особи с генотипом *Pit-1<sup>AA</sup>* дают в среднем на 2,6 % больше молока за 305 суток лактации по сравнению с особями, обладающими генотипом *Pit-1<sup>BB</sup>* ( $P < 0,05$ ) (Рис. 5).



**Рис.5.** Влияние различных аллельных вариантов гена рилизинг-фактора *Pit-1* на общий удой (л) за 305 суток лактации.

Нашими исследованиями не было выявлено статистически достоверных различий между обладателями *Pit-1<sup>AA</sup>* и *Pit-1<sup>BB</sup>* генотипов по содержанию белка и жира в молоке.

Исследования по влиянию полиморфизма генов гормона роста и гипофизарно-специфического фактора транскрипции на молочную продуктивность крупного рогатого скота будет продолжено.

### Заключение

Проведен анализ генетической структуры черно-пестрой породы крупного рогатого скота по частоте встречаемости предпочтительных генотипов основных генов соматотропного каскада:

гена гормона роста (*GH*);

гена гипофизарно-специфического фактора транскрипции (*Pit1*).

Показано, что среди исследованных быков-производителей Витебского и Минского племпредприятий, а также коров основного селекционного стада Минского племпредприятия преобладает L-аллель гена гормона роста (*GH*). Установлено положительное влияние

L-аллеля гена *GH* на общий удой, содержание белка и жира в молоке.

Изучена связь молочной продуктивности КРС с полиморфными аллельными вариантами гена *Pit 1* у крупного рогатого скота. Выявлено положительное влияние AA-генотипа гена *Pit1* на общий удой молока.

Таким образом, связь полиморфизма генов гормона роста и гипофизарно-специфического фактора транскрипции с хозяйственно-ценными признаками служит основанием использовать *GH* и *Pit-1* в маркер-сопутствующей селекции, направленной на повышение молочной продуктивности крупного рогатого скота.

### Список используемых источников

1. Калашникова, Л.А. ДНК-технология оценки сельскохозяйственных животных / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко. – Москва: ВНИИплем, 1999. – 148 с.
2. Эрнст, Л.К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Л.К. Эрнст, Н.А. Зиновьева – Москва: РАСХН, 2008. – 508 с.
3. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н.А. Зиновьева [и др.]; под общей редакцией Л.К. Эрнста. – Москва: ВИЖ, 2002. – 112 с.
4. Jianbo, Y. Flan Hayes and Urs Kuhnlein Sequence Variations in the Bovine Growth Hormone Gene Characterized by Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis and Their Association with Milk Production Traits in Holsteins / Y. Jianbo [et al.] // Genetics. – 2004. – Vol. 144. – P. 1809–1816.
5. Woollard, J. Rapid communication: HinfI polymorphism at the bovine Pit locus. / J. Woollard [et al.] // J. Anim. Sci.– 1994. Vol. – 72. – P. 3267.
6. Сулимова, Г.Е., Мониторинг генетической структуры пород и популяций крупного рогатого скота России по локусам хозяйственно-полезных признаков / Г.Е. Сулимова, С.О. Туркова, С.Р. Хатами // Молекулярная генетика, геномика и биотехнология: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 24–26 ноября 2004 г.: в 1 ч. / ИГЦ НАНБ; редкол.: Н.А. Картель [и др.]. – Минск, 2004. – С. 98–100.
7. Калашникова, Л.А. Селекция XXI века: использование ДНК-технологий / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко; под ред. Калашниковой Л.А. [и др.]. – Московская область: Лесные поляны, ВНИИплем. 2001. – 34 с.
8. Михайлова, М.Е. Использование ДНК-технологий для генетического маркирования хозяйственно-ценных признаков и идентификации скрытых носителей иммунодефицита крупного рогатого скота / М.Е. Михайлова, Е.В. Белая, С.Г. Голенченко, Н.М. Волчок, Н.А. Камыш // Современные методы генетики и селекции в животноводстве: материалы междунар. науч. конф., Санкт-Петербург, 26–28 июня 2007 г. / С.-Пт. ВНИИГРЖ; редкол.: П.Н. Прохоренко [и др.]. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 267–273.
9. Lucy, M.C. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production / M.C. Lucy [et al.] // Domestic Animal Endocrinology. – 1993. – Vol. 10. – P. 325–333.
10. Zvierzchowski, L. An association of growth hormone, κ-casein, p-lactoglobulin, leptin and



Pit-I loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle / L. Zvierchowski // Animal Science Papers and Reports.– 2001. – Vol. 19.– P. 65–78.

11. Pawar, R. S. Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle / R. S. Pawar [et al.] // Indian Jour-

nal of Animal Sciences.– 2007– Vol.11, № 9.– P. 884–888.

12. Renaville, R. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls / R. Renaville [et al.] // J. Dairy Sci. –1997. Vol. 80, № 12.– P. 3431–3437.

*Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.*