

Оценка ассоциации парных сочетаний полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада *bPit-1*, *bGH*, *bGHR* и *bIGF* с мясной продуктивностью крупного рогатого скота аулиекольской породы казахстанской селекции

И.С. Бейшова, к.с.-х.н., Костанайский ГУ; **Е.В. Белая**, к.б.н., Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; **В.П. Терлецкий**, д.б.н., ФГБНУ Всероссийский НИИ-ГиРЖ; **Б.Б. Траисов**, д.с.-х.н., профессор, НАО Западно-Казахстанский АТУ; **В.И. Косилов**, д.с.-х.н., профессор, ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ

Оценка генетического потенциала продуктивности сельскохозяйственных животных по генетическим маркерам является современным, востребованным и бурно развивающимся направлением в селекции. В настоящее время поиск эффективных генетических маркеров ведётся среди генов-кандидатов для разных признаков у разных пород.

Мы предположили, что фенотипический эффект генетических маркеров может оказаться более выраженным, если в генотипе животного окажутся генетические маркеры, потенцирующие эффект друг друга. Поэтому для исследования мы взяли гены соматотропинового каскада, белковые продукты которых являются ключевыми звенями одной гуморальной цепи, участвующей в процессах роста и развития млекопитающих (*bPit-1*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*) [1]. В таком случае экспрессия

одного гена влияет на экспрессию всех остальных и один полиморфизм может потенцировать действие другого.

Материал и методы исследования. Объектом исследования послужила выборка коров аулиекольской породы (n=284). Образцы биоматериала и информация о продуктивности животных представлена ТОО «Каркын», Республика Казахстан.

Предмет исследования составили полиморфные гены соматотропинового каскада: *bPit-1*, *bGH*, *bGHR* и *bIGF-1*. Оценку мясной продуктивности животных с разными генотипами и их парными сочетаниями проводили по признаку живая масса в возрасте 18 и 24 мес.

Определение генотипов животных осуществлялось методом ПЦР-ПДРФ (полимерная цепная реакция – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов). Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализа каждого полиморфизма приведены в таблице 1. Электрофорез проводили в 2-процентном агарозном геле (SeaKemLEAgarose, Lonza, США).

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов включал обработку амплификата сайт-специфической рестриктазой и последующее

1. Режимы ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов соматотропинового каскада

Полиморфизм	Условия амплификации	Последовательность праймеров	Ссылки
<i>bPit-1</i> -HinI	94°C – 1 мин.; (95°C – 45 сек.; 56°C – 6 сек.; 72°C – 6 сек.) × 35 циклов; 72°C – 1 мин.	HinFI-F: 5'-aaaccatcatcccttctt-3'	[2]
		HinFI-R: 5'-aatgtacaatgtctctgag-3'	
<i>bGH</i> -AluI	95°C – 5 мин.; (95°C – 3 сек.; 64°C – 3 сек.; 72°C – 6 сек.) × 35 циклов; 72°C – 1 мин.	AluI -F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3'	[3]
		AluI-R: 5"-gttcttgagcagcgcgt-3'	
<i>bGHR</i> -SspI	95°C – 5 мин.; (95°C – 3 сек.; 6°C – 3 сек.; 72°C – 3 сек.) × 35 циклов; 72°C – 1 мин.	SspI-F: 5'- aatactgggttagcagtgacaatat-3'	[4]
		SspI-R: 5'- acgtttcaactgggttcatga -3'	
<i>bIGF-1</i> -SnaBI	95°C – 5 мин.; (95°C – 30 сек.; 64°C – 30 сек.; 72°C – 30 сек.) × 35 циклов; 72°C – 10 мин.	SnaBI-F: 5'-attcaaaggctgcctgcccc-3'	[5]
		SnaBI-R: 5'-acacgtatgaaaggaaact-3'	

разделение полученных фрагментов с помощью гель-электрофореза.

Анализ *HinFI* гена *bPit-1* в экзоне 6 проводился по методике, описанной D.E. Moody [2]. Получаемая картина электрофореза приведена на рисунке 1.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bGH* в экзоне 5 проводится по R.S. Pawar [3] (рис. 2).

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена инсулиноподобного фактора роста-1 *bIGF-1* в области Р1 промоторного региона идентифицирован по H.C. Hines [5] (рис. 4).

Генотип животного по всем анализируемым генам документировался и заносился в общую базу данных.

Оценку полиморфизмов генов соматотропинового каскада *bPit-1-HinFI*, *bGH-AluI*, *bGHR-SspI*, и *bIGF-1-SnaBI* в качестве генетических маркеров мясной продуктивности у коров аулиекольской породы проводили по двум направлениям.

Первое отражает традиционный подход, который предполагает определение предпочтительного и альтернативных генотипов путём сравнения между собой показателей продуктивности у соответствующих групп животных.

Второй подход был предложен нашими белорусскими коллегами дополнительно к традиционному подходу и предполагает последующее сравнение показателей продуктивности у групп животных с предпочтительными и нежелательными генотипами относительно общей выборки и оценку значимости наблюдаемых отличий [6]. Такой дополнительный анализ позволяет оценить целесообразность отбора животных по предпочтительному генотипу или элиминацию особей с альтернативным генотипом.

Оценку количественных признаков проводили с помощью методов непараметрической статистики.

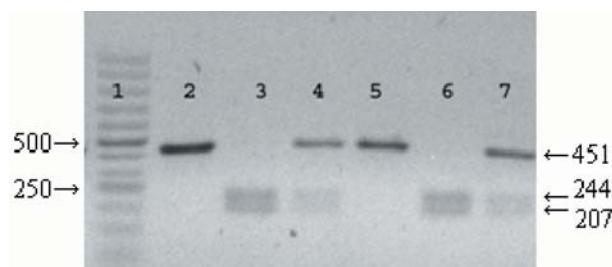


Рис. 1 – Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bPit-1-HinFI*:

дорожка 1 – маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва; дорожка 2 – ПЦР-продукт 451 п.н. фрагмента гена *bPit-1-HinFI*; дорожки 3, 6 – фрагменты рестрикции 244, 207 п.н., соответствующий генотипу *bPit-1-HinFI^{BB}*; дорожки 4, 7 – фрагменты рестрикции 451, 244, 207 п.н., соответствующие генотипу *bPit-1-HinFI^{AB}*; дорожка 5 – фрагмент рестрикции 451 п.н., соответствующий генотипу *bPit-1-HinFI^{AA}*. Положение на геле специфических полос показано стрелками

Статистически оценивая различия между группами с тремя возможными генотипами, применяли метод рангового анализа вариаций для трёх и более независимых групп по Краскелу – Уоллису (Kruskel – Wallis ANOVA). В случаях, когда число животных в группе с редким генотипом было менее шести, такая группа исключалась из статистической обработки и сравнение проводилось с помощью U-критерия Манна – Уитни (Mann – Whitney U-test) для двух независимых групп. Различия во всех случаях рассматривались как статистически достоверные при уровне значимости $P < 0,05$ [7].

Для тех полиморфизмов, у которых различия между предпочтительными и альтернативными генотипами были статистически достоверны, а также для групп с парными сочетаниями генотипов была проведена оценка продуктивности относительно общей выборки путём построения 95-процентного доверительного интервала для медианы анализируемой группы и последующего сопоставления его с медианой общей выборки. Данный метод позволяет оценить различия между группой, являющейся частью выборки, и самой выборкой, данные представлены в виде медианы нижней и верхней границ 95-процентного доверительного интервала. В случае если границы ДИ не перекрываются, делается вывод о том, что анализируемая группа значительно отличается от популяции. Данные анализируются, представляются и обсуждаются в виде Me [ДИ1; ДИ2] (25%; 75%).

Порядковые номера значений выборки, которые являются нижней (L) и верхней (U) границами, определяли по формулам 1 и 2:

$$L = n/2 - (Z_{1-\alpha} \cdot \sqrt{n/2}), \quad (1)$$

$$U = 1 + n/2 + (Z_{1-\alpha} \cdot \sqrt{n/2}), \quad (2)$$

где Z – значение нормального распределения для выбранной вероятности. Для доверительной вероятности 95% $Z = 1,96$ [8];
 n – объём выборки.

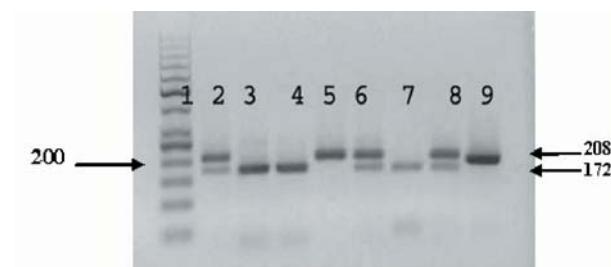


Рис. 2 – Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bGH-AluI*:

дорожка 1 – маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва; дорожки 2, 6 – фрагменты рестрикции 208, 172, 35 п.н., соответствующие генотипу *bGH-AluI^{IV}*; дорожки 3, 4, 7 – фрагмент рестрикции 172 п.н., соответствующий генотипу *bGH-AluI^{IL}*; дорожка 5 – фрагмент рестрикции 208 п.н., соответствующий генотипу *bGH-AluI^{VV}*; дорожка 9 – ПЦР-продукт 208 п.н. фрагмента гена *bGH-AluI*. Фрагмент рестрикции 35 п.н. не визуализируется

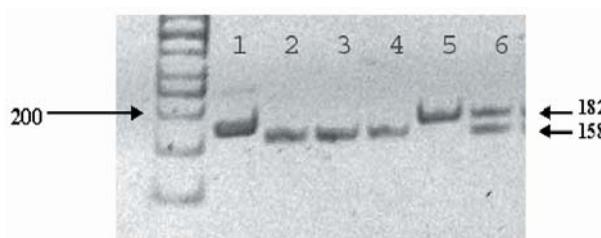


Рис. 3 – Электрофореграмма ДНК-типирования по полиморфизму *bGHR*-SspI:

дорожка 1 – ПЦР-продукт 182 п.н. фрагмента гена *bGHR*-SspI; дорожки 2, 3, 4 – фрагмент рестрикции 158 п.н., соответствующий генотипу *bGHR*-SspI^{FF}; дорожка 5 – фрагмент рестрикции 182 п.н., соответствующий генотипу *bGHR*-SspI^{YY}; дорожка 6 – фрагменты рестрикции 182 и 158 п.н., соответствующие генотипу *bGHR*-SspI^{FY}. Фрагмент 24 п.н. не визуализируется. Использован маркер молекулярных масс O'RangeRuler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва



Рис. 4 – Электрофореграмма ДНК-типирования по полиморфизму *bIGF-1*-SnaBI:

дорожка 1 – маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва; дорожка 2 – ПЦР-продукт 249 п.н. фрагмента гена *bIGF-1*-SnaBI; дорожки 3, 4 – фрагменты рестрикции 249 и 223 п.н., соответствующие генотипу *bIGF-1*-SnaBI^{AB}; дорожки 5, 6 – фрагмент рестрикции 223 п.н., соответствующий генотипу *bIGF-1*-SnaBI^{AA}; дорожка 7 – фрагмент рестрикции 249 п.н., соответствующий генотипу *bIGF-1*-SnaBI^{BB}. Фрагмент 26 п.н. не визуализируется

2. Непараметрические характеристики живой массы в группах коров аулиекольской породы с разными генотипами по полиморфизму *bPit-1*-HinFI (Ме, [ДИ1; ДИ2] (25%; 75%)

Возраст, мес.	Генотип	n	Ме	95-процентный доверительный интервал для медианы		Интерквартильный размах		P*
						25%	75%	
18	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{AA}	29	386	375	411	370	419	0,003
	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{AB}	103	374	368	378	329	393	
	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{BB}	103	368	354	372	329	387	
	Общая выборка	237	373	368	375	329	395	
24	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{AA}	27	447	420	482	403	483	0,002
	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{AB}	100	411	403	423	382	436	
	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{BB}	101	405	395	419	377	437	
	Общая выборка	230	414	405	423	381	453	

Примечание: * – сравнение групп проведено с помощью теста Краскела – Уоллиса (для трёх независимых). Различие между группами значимо при $P < \alpha$; $\alpha = 0,05$

3. Непараметрические характеристики живой массы в группах коров аулиекольской породы с разными генотипами по полиморфизму *bIGF-1*-SnaBI (Ме, [ДИ1; ДИ2] (25%; 75%)

Возраст, мес.	Генотип	n	Ме	95-процентный доверительный интервал для медианы		Интерквартильный размах		P*
						25%	75%	
18	<i>bIGF-1</i> -SnaBI ^{AA}	45	372	358	386	327	402	0,009
	<i>bIGF-1</i> -SnaBI ^{AB}	100	377	372	382	362	395	
	<i>bIGF-1</i> -SnaBI ^{BB}	39	344	326	367	321	380	
	Общая выборка	237	373	368	375	329	395	
24	<i>bIGF-1</i> -SnaBI ^{AA}	45	414	397	447	376	462	0,005
	<i>bIGF-1</i> -SnaBI ^{AB}	100	423	414	429	397	454	
	<i>bIGF-1</i> -SnaBI ^{BB}	39	383	376	411	365	428	
	Общая выборка	230	414	405	423	381	453	

Примечание: * – сравнение групп проведено с помощью теста Краскела – Уоллиса (для трёх независимых). Различие между группами значимо при $P < \alpha$; $\alpha = 0,05$

Результаты обрабатывали с использованием программных возможностей «Microsoft Excel 2010» и «Statistica 6.0» (StatSoft, Inc. 1994–2001). При этом необходимы модули Basic Statistic / tables, Nonparametric Statistics [9].

Результаты исследования. В таблице 2 отражены характеристики живого веса аулиекольских телят с генотипами *bPit-1*-HinFI^{AA}, *bPit-1*-HinFI^{AB} и *bPit-1*-HinFI^{BB} по полиморфизму гена гипофизарного фактора роста-1 в возрасте 18 и 24 мес. Также в

ней отражены результаты статистической оценки значимости наблюдаемых различий между этими группами животных.

Из приведённых в таблице данных видно, что во все возрастные периоды достоверно большим весом характеризовались коровы с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* по сравнению с коровами с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}*. Следовательно, предпочтительным является более редкий генотип *bPit-1-HinFI^{AA}* [10]. Продуктивность животных с предпочтительным генотипом находится в пределах общей выборки, вести отбор на предпочтительный генотип в возрасте 24 мес. нецелесообразно [11].

В таблице 3 представлены результаты оценки ассоциации SnaBI-полиморфизма гена инсулиноподобного фактора роста-1 с массой молодняка в возрасте 18 и 24 мес.

Данные, приведённые в таблице 3, свидетельствуют, что в возрасте 18 и 24 мес. наблюдается статистически значимое различие между группами коров с генотипами *bIGF-1-SnaBI^{AA}*, *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}*. Во всех возрастных категориях предпочтительным является гетерозиготный генотип *bIGF-1-SnaBI^{AB}*, а альтернативным – гомозиготный *bIGF-1-SnaBI^{BB}*.

Нами были составлены 54 возможных парных сочетания полиморфных генов соматотропинового каскада.

По результатам ДНК-типовирования животные с соответствующим парным генотипом (диплотипом) объединены в группы для анализа их продуктивности относительно общей выборки. В анализ парных сочетаний включались генотипы независимо от того, была ли для них отдельно выявлена ассоциация с живой массой.

4. Парные сочетания генотипов, ассоциированные с весом в возрасте 12–24 мес. у коров аулиекольской породы

Структура диплотипа	пжив	Мед	95-процентный доверительный интервал Ме		Интерквантильный размах	
			ДИ 1	ДИ 2	25%	75%
Вес в возрасте 18 мес.						
<i>bGH-AluI^{LL}-bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	21	327	305	358	305	358
<i>bGH-AluI^{LL}-bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	35	352	343	365	329	368
<i>bGH-AluI^{LL}-bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	27	329	313	346	305	364
<i>bGH-AluI^{LV}-bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	23	402	379	427	375	428
<i>bGH-AluI^{LV}-bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	55	386	379	407	378	421
<i>bGH-AluI^{LV}-bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	12	407	382	435	383	431
<i>bPit-1-HinFI^{AB}-bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	36	378	377	382	377	385
<i>bPit-1-HinFI^{AB}-bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	12	378	361	417	367	397
Общая выборка	237	373	368	375	329	395
Вес в возрасте 24 мес.						
<i>bGH-AluI^{LL}-bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	21	376	361	397	361	397
<i>bGH-AluI^{LL}-bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	35	389	383	402	381	404
<i>bGH-AluI^{LL}-bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	27	379	365	383	346	399
<i>bGH-AluI^{LV}-bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	23	462	429	487	423	489
<i>bGH-AluI^{LV}-bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	53	436	429	459	427	477
<i>bGH-AluI^{LV}-bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	11	467	428	513	432	488
<i>bPit-1-HinFI^{AB}-bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	36	428	427	435	423	436
Общая выборка	230	414	405	423	381	453

В таблице 4 приведены непараметрические характеристики диплотипов, которые ассоциированы с повышенной либо пониженной по отношению к общей выборке живой массой в возрасте 6–24 мес. У коров аулиекольской породы выявляются дополнительные генетические маркеры среди парных сочетаний генотипов. Так, в результате анализа живого веса аулиекольских телят 18- и 24-месячного возраста по четырём полиморфизмам генов соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*) статистически значимое отличие одиночного генотипа от общей выборки было установлено только для полиморфизмов *bPit-1-HinFI* и *bIGF-1-SnaBI*. В первом случае генотип *bPit-1-HinFI^{AA}* значимо превышал живой вес общей выборки в возрасте 18 мес.; во втором случае животные с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{BB}* имели значимо меньшую массу по сравнению с общей выборкой.

Необходимо также отметить, что генотип *bIGF-1-SnaBI^{BB}*, отдельно демонстрирующий ассоциацию с пониженным весом у телят, оказывался в структуре диплотипов как с пониженной, так и с повышенной массой, в зависимости от того, каким эффектом обладал соседний генотип в составе пары.

Генотип *bPit-1-HinFI^{AA}*, ассоциированный с повышенной живой массой, в составе достоверно повышающих или понижающих вес диплотипов не выявлен. Это, возможно, связано с низкой частотой встречаемости такого генотипа в популяции.

Выводы.

1. Диплотипы, ассоциированные с повышенной или пониженной продуктивностью, сохраняют свою динамику от возраста к возрасту. В случае с анализом отдельных полиморфизмов характер ассоциации менее устойчив и в разном возрасте может пропадать или даже меняться. Это наблю-

дение позволяет предположить, что оценка фенотипического эффекта по парным сочетаниям не только более результативна, но и более достоверна.

2. Генетические маркеры, представляющие собой диплотипы, зачастую характеризуются более выраженным фенотипическим эффектом, чем отдельные маркирующие генотипы. Так, например, если диапазон живого веса в возрасте 12 мес. для генотипа *IGF-I^{BB}* составляет 325–331 кг, то его парное сочетание с генотипом *bGH-AluI^{LL}* потенцирует этот эффект до 278–306 кг.

3. Генотипы, которые по отдельности не ассоциированы с признаками мясной продуктивности (но даже и гомо- и гетерозиготы по продуктивности не отличаются между собой), в парных сочетаниях могут проявлять повышенный или пониженный, статистически значимый фенотипический эффект по сравнению с общей выборкой. Такие сочетания могут быть применены в качестве генетических маркеров продуктивности в селекционных программах. Примером является *bGH-AluI*-полиморфизм. И наоборот, полиморфизмы, по отдельности демонстрирующие ассоциацию с признаком продуктивности, в парном сочетании по фенотипическому эффекту могут находиться в пределах общей выборки.

4. Анализ парных сочетаний позволяет выявить большее количество генетических маркеров, что позволяет расширить диапазон животных-носителей маркерного генотипа для участия в селекционных программах.

5. При анализе парных сочетаний маркируется больший набор признаков, что позволяет селекционеру-генетику более полно оценить генетический потенциал животного.

Литература

- Белая Е.В., Михайлова М.Е., Батин Н.В. Комбинированные фенотипические эффекты полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bPRL*, *bGH*, *bGHR* и *bIGF-1*) на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. 2012. Т. 13. С. 36–43.
- Moody D.E., Pomp D., Barendse W. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine Pit-1 gene and assignment of Pit-1 to bovine chromosome 1 // Animal Genetics. 1995. V. 26. P. 45–47.
- Pawar R.S., Joshi C.G., Rank D.N. Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle // Indian journal of animal science. 2007. V. 9. P. 884–888.
- Skinkytė R., Zwierzchowski L., Riaubaitė L., Baltrėnaitė L., Micelkienė I. Distribution of allele frequencies important to milk production traits in lithuanian black & white and lithuanian red cattle // veterinarija ir zootechnika. 2005. Т. 31 (53). P. 93–97.
- 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 // Animal Genetics. 1998. V. 29. P. 69.
- Белая Е.В., Михайлова М.Е., Батин Н.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 чёрно-пёстрого голштинизированного крупного рогатого скота // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. 2012. Т. 13. С. 30–35.
- Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: «МедиаСфера», 2002. 312 с.
- Наркевич А.Н., Наркевич А.А., Виноградов К.А. Интервальная оценка медианы и её автоматизация // Врач и информационные технологии. 2013. № 4. С. 40–49.
- Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных: учеб.-метод. пособие. Минск, 2008. 160 с.
- Beishova I. Assessment of Polymorphic Options for Genes *Bpit-1*, *Bgh*, *Bghr* as Genetic Markers for Meat Productivity of Auliekolsk Breed of Cows / Indira Beishova, Alena Belyaya, Gulzhagan Chuzhebaeva, Askar Nametov, Tatyana Poddudinskaya, Nabidulla Kikebayev, Valery Terleetskiy, Yessengali Usenbekov // CURRENT SCIENCE, VOL. 112, NO. 7, 10 APRIL 2017.
- Бейшова И.С. Влияние аллелей полиморфных генов *bPIT-1*, *bGH* и *bGHR* на показатели роста у крупного рогатого скота ауликольской породы / И.С. Бейшова, В.П. Терлецкий, В.И. Тыщенко, Е.В. Белая, Т.В. Поддудинская // Успехи современной науки. 2017. № 4.