

Анализ предпочтительных и альтернативных генотипов коров казахской белоголовой породы

И.С. Бейшова, к.с.-х.н., Костанайский ГУ

Эффективность мясного скотоводства во многом обусловлена использованием животных, характеризующихся высокими продуктивными и племенными качествами [1–6]. Оценка животных по генетическим маркерам является более эффективной, если включает гены одного физиологического пути, так как в таком случае экспрессия одного гена влияет на экспрессию всех остальных. Следовательно, при анализе комплексного влияния полиморфизмов на исследуемые признаки обнаруживаются парные сочетания с потенцирующим действием [7].

Для повышения мясной продуктивности крупного рогатого скота представляют интерес гены соматотропинового каскада, белковые продукты которых являются ключевыми звеньями одной гуморальной цепи. Они участвуют как в процессе лактации, так и в процессах роста и развития млекопитающих (*bPit-1*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*) [8]. Изучение полиморфизмов этих генов является перспективным с точки зрения поиска маркеров, ассоциированных с признаками и молочной, и мясной продуктивности у крупного рогатого скота.

Известно, что гормон роста и целый ряд других белков (прямо или косвенно необходимых для его

функционирования) обеспечивают разнообразные молекулярные и клеточные эффекты, приводящие в конечном счёте к развитию и росту организма. Эти белки составляют своеобразную ось (*axis*) или систему, которая запускает и контролирует совокупность метаболических процессов, ведущих к росту и связанных с клеточной дифференцировкой.

Функционирование системы гормона роста представляется в виде целого ряда последовательных молекулярных процессов, в которых принимают участие десятки других белков/пептидов. Компоненты этой системы участвуют в запуске секреции гормона роста, его транспорте в кровотоке, в передаче гормонального сигнала в клетке-мишени (внутриклеточный сигналинг) и, наконец, в целенаправленных изменениях генной экспрессии в клетках-мишенях [9]. В целом в системе гормона роста выделяют две ветви — основную и боковую, или дополнительную, а также три специальных регуляторных звена, обусловленных действием: (1) соматолиберина (гипоталамический релизинг-фактор гормона роста или соматокрин, *GHRH*); (2) соматостатина (*SST*, *SRIF*); (3) грелина (*ghrelin*, *GHRL*). Каждое из этих регуляторных звеньев представляет собой целую цепь молекулярных событий, влияющих на секрецию гормона роста. Центральной фигурой в системе

ГР/ИФР, естественно, считают сам гормон роста, который продуцируют высокодифференцированные соматотрофные клетки гипофиза. Синтез ГР обеспечивает ген *bGH*. Регуляция синтеза гормона роста представляет собой многоуровневый каскад взаимодействий белок – рецептор, тесно связанных между собой. Нарушение и тем более выпадение любого звена влечёт за собой изменения в работе соматотропиновой оси, которые могут привести как к различиям в фенотипических проявлениях количественных признаков продуктивности у сельскохозяйственных животных, так и к заболеваниям, развивающимся на разных этапах онтогенеза.

Материал и методы исследования. Объектом исследования послужили выборки коров казахской белоголовой породы, предметом исследования – полиморфные гены соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bGH*, *bGHR*). Материалом для исследования были образцы ДНК, выделенной из крови коров казахской белоголовой породы.

Генотипы животных определяли методом ПЦР-ПДРФ. Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализа каждого полиморфизма приведены в таблице.

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов включал обработку амплификата сайт-специфической рестриктазой и последующее разделение полученных фрагментов с помощью гель-электрофореза. Использовали маркер молекулярных масс *O'RangeRuler™ 50 bpDNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific, Литва). Электрофорез проводили в 2-процентном агарозном геле (*SeaKem LE Agarose*, Lonza, США).

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bPit-1* в экзоне 6 проводился с помощью рестриктазы *HinfI*. Полиморфизм обусловлен А→G нуклеотидной заменой, не приводящей к изменению аминокислотной последовательности. Сайтом узнавания для рестриктазы *HinfI* является последовательность G↓ANTC. Разрезаемый в ходе ферментации фрагмент содержит нуклеотид А, соответствующий аллелю *bPit-1-HinfI^B* [10]. В случае присутствия G нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bPit-1-HinfI^A*.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bGH* в экзоне 5 проводился с помощью рестриктазы *AluI*. Полиморфизм обу-

словлен транзицией С→G, приводящей к замене аминокислоты лейцин на валин в последовательности аминокислот белка. Сайтом узнавания для рестриктазы *AluI* является последовательность AG↓CT. Распознаваемый ферментом аллель содержит нуклеотид С и обозначен как *bGH-AluI^L*. В случае присутствия G нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bGH-AluI^V*.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bGHR* в экзоне 8 проводился с помощью рестриктазы *SspI*. Рестриктаза *SspI* распознаёт Т→А транзицию в экзоне 8. Данная замена вызывает подстановку полярного, хотя и незаряженного остатка тирозина вместо нейтрального фенилаланина в положении 279-го белка. Сайтом узнавания для рестриктазы является последовательность ААТ↓АТТ. Разрезаемый ферментом амплификат содержит нуклеотид Т, соответствующий аллелю *bGHR-SspI^F*. В случае присутствия А-нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bGHR-SspI^Y*.

Определение предпочтительного и нежелательного аллелей проводилось путём сравнения показателей живой массы у тёлочек с разными генотипами при рождении, а также в возрасте 3, 6, 9, 12, 18 и 24 мес. Также в возрасте 12, 18 и 24 мес. была исследована ассоциация генотипов с индексами телосложения, которые характеризуют мясную продуктивность животных (сбитость, костистость, растянутость и массивность), и репродуктивную функцию животных (шилозадость).

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием стандартного пакета программ *Statistica 6.0* (*StatSoft, Inc. 1994–2001*), при этом были использованы модули *Basic Statistic / tables, Nonparametric Statistics*. Сравнение выборок по распределению частот аллелей исследуемых генов, а также оценку соответствия фактического распределения генотипов теоретически ожидаемому по закону Харди – Вайнберга проводили с помощью критерия χ^2 . Различия во всех случаях рассматривались как статистически достоверные при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты исследования. Из данных, полученных в результате изучения характеристик продуктивности в основной группе коров с разными генотипами полиморфизма *bPit-1-HinfI* казахской

Индивидуальные характеристики условий ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов соматотропинового каскада

Полиморфизм	Условия амплификации	Последовательность праймеров
<i>bPit-1-HinfI</i>	95° – 5 мин.; (95°С – 45 сек.; 55,3°С – 45 сек.; 72°С – 45 сек.) × 34 цикла; 72°С – 10 мин.; 12°С – 10 мин.	HinfI-F: 5'-aaaccatcatctcccttctt-3'
		HinfI-R: 5'-aatgtacaatgtctctgag-3'
<i>bGH-AluI</i>	95°С – 5 мин.; (95°С – 30 сек.; 64°С – 30 сек.; 72°С – 60 сек.) × 35 циклов; 72°С – 10 мин.	AluI –F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3'
		AluI-R: 5"-gtcttgagcagcgct-3'
<i>bGHR-SspI</i>	95°С – 3 мин.; (95°С – 30 сек.; 62°С – 30 сек.; 72°С – 30 сек.) × 30 циклов; 72°С – 10 мин.; 12°С – 5 мин.	SspI-F: 5'-aatatgtagcagtgacaatat-3'
		SspI-R: 5'-acgtttcactgggttgatga-3'

белоголовой породы (Me (25; 75%)), можно отметить, что как в основной, так и в контрольной группах не установлено достоверных различий между генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}*.

В качестве тенденции можно отметить, что начиная с возраста 6 мес. и в возрасте 9, 12 и 18 мес. группа животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* характеризовалась более высоким показателем живой массы по отношению к группам с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}*. Однако низкая частота встречаемости данного генотипа в выборке казахской белоголовой породы не позволила оценить достоверность наблюдения.

По приведённым в таблице данным сравнительного анализа групп с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* по индексам телосложения можно отметить, что в основной группе наблюдалось статистически значимое превышение показателя растянутости в возрасте 24 мес. у коров с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* по сравнению с животными с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}*.

Так, индекс растянутости у коров с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* составлял 132,768 (126,667; 137,500), в то время как данный показатель у коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* был равен 127,966 (120,833; 137,705) и 119,643 (117,544; 124,074) соответственно. Т.е. генотипом с наименьшим значением индекса растянутости является гомозигота *bPit-1-HinFI^{BB}*.

Таким образом, по признаку растянутости в возрасте 24 мес. генотип *bPit-1-HinFI^{AA}* можно рассматривать как потенциальный генетический маркер.

По результатам оценки ассоциации генотипа с мясной продуктивностью по полиморфизму *bGH-AluI* можно отметить, что в основной группе животных начиная с возраста 9 мес. группа коров с генотипом *bGH-AluI^{LL}* превышала по живому весу группу коров с генотипом *bGH-AluI^{LV}*. В возрасте 24 мес. этот показатель различался у групп статистически значимо, что делает возможным рассматривать генотип *bGH-AluI^{LL}* как предпочтительный, а генотип *bGH-AluI^{LV}* как альтернативный.

В контрольной группе наблюдалась противоположная тенденция, однако небольшое число наблюдений не позволило сделать однозначных выводов.

По результатам анализа индексов телосложения у групп коров с генотипами *bGH-AluI^{LL}*, *bGH-AluI^{LV}* и *bGH-AluI^{VV}* можно отметить, что в основной группе прослеживается тенденция к снижению индекса шилозадости и повышению индекса массивности у коров с генотипом *bGH-AluI^{LL}* по сравнению с коровами с генотипом *bGH-AluI^{LV}*. Это характеризует данную группу как более мясную с улучшенной репродуктивной функцией.

Эти данные консолидированы с контрольной группой. Однако результаты статистической обработки не подтверждают значимости сделанных наблюдений.

Анализ данных характеристик продуктивности в основной и контрольной группах коров с разными генотипами полиморфизма *bGHR-SspI* казахской белоголовой породы (Me, (25; 75%)) показал, что в основной группе в пределах полиморфизма *bGHR-SspI* между животными с генотипами *bGHR-SspI^{FF}*, *bGHR-SspI^{FY}* и *bGHR-SspI^{YY}* достоверных различий в показателях живого веса не наблюдалось. Такая же картина отмечалась и в контрольной группе.

В виде тенденции можно отметить, что гомозиготы по редкому аллелю *bGHR-SspI^{YY}* характеризуются сниженным весом по сравнению с гомозиготами по более распространённому аллелю *bGHR-SspI^{FF}*. Подобная тенденция прослеживалась в контрольной группе. Однако число животных в группах не позволило провести оценку достоверности наблюдаемых различий.

По результатам характеристик продуктивности животных основной и контрольной групп по индексам телосложения можно добавить к вышесказанному, что особи основной группы с генотипом *bGHR-SspI^{YY}* характеризовались сниженным индексом костистости в возрасте 24 мес., а также сниженным индексом растянутости и массивности в возрасте 18 и 24 мес. Также в этой группе животных наблюдалось снижение индекса шилозадости в возрасте 12, 18 и 24 мес. по сравнению с коровами с генотипом *bGHR-SspI^{FF}* и *bGHR-SspI^{YY}*.

В контрольной группе у животных с генотипом *bGHR-SspI^{YY}* индекс шилозадости также был снижен по сравнению с коровами с генотипом *bGHR-SspI^{FF}* и *bGHR-SspI^{YY}*.

По результатам оценки мясной продуктивности в группах коров с генотипами *bIGF-1-SnaBI^{AA}*, *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}* по полиморфизму *SnaBI* гена инсулиноподобного фактора роста 1 демонстрировались статистически значимые различия по признаку живой массы в возрасте 12, 18 и 24 мес. между животными с генотипами *bIGF-1-SnaBI^{AA}*, *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}*. Предпочтительными генотипами по полиморфизму *bIGF-1-SnaBI* являются генотипы *bIGF-1-SnaBI^{AA}* и *bIGF-1-SnaBI^{AB}*. Генотип *bIGF-1-SnaBI^{BB}* у коров казахской белоголовой породы является альтернативным и характеризуется сниженной живой массой коров в возрасте 12, 18 и 24 мес.

По оценке индексов телосложения можно отметить, что в основной группе животные с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{AA}* характеризовались более низкими значениями индексов растянутости и массивности в возрасте 18 и 24 мес., что свидетельствует в пользу более низкой мясной продуктивности при одинаковой живой массе с другими группами. В то же время эти животные характеризовались

более низким индексом шилозадости, что в свою очередь является преимуществом для реализации репродуктивной функции у коров.

В контрольной группе чётких тенденций не прослеживалось, что объясняется маленьким количеством животных.

Выводы. Для коров казахской белоголовой породы установлено следующее:

– полиморфизм *bPit-1-HinFI* ассоциирован с признаком растянутость в возрасте 24 мес. (наибольшее значение признака – генотип *bPit-1-HinFI^{BB}*);

– полиморфизм *bIGF-1-SnaBI* ассоциирован с признаком живая масса в возрасте 12, 18, 24 мес. (наибольшее значение генотип *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}*, наименьшее – генотип *bIGF-1-SnaBI^{AA}*);

– генотипы с наибольшим значением признака рассматриваются как предпочтительные, потенциальные генетические маркеры и для оценки целесообразности включения их в селекционные программы данные этих групп животных сравнивали с продуктивностью общей выборки, чтобы установить характер и степень ассоциации генотипа с признаком; исключение составляет признак шилозадости. В этом случае повышение индекса сопровождается осложнениями при первом отёле и предпочтительным в селекционных мероприятиях считается генотип с наименьшим значением признака.

Литература

1. Мироненко С.И., Косилов В.И., Жукова О.А. Особенности воспроизводительной функции тёлочек и первотёлок на Южном Урале // Вестник мясного скотоводства. 2009. Т. 2. № 62. С. 48–56.
2. Косилов В.И., Губашев Н.М., Насамбаев Е.Г. Повышение мясных качеств казахского белоголового скота путём скрещивания // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2007. № 1 (13). С. 91–93.
3. Бозымов К.К. Приоритетное развитие специализированного мясного скотоводства – путь к увеличению производства высококачественной говядины / К.К. Бозымов, Р.К. Абжанов, А.Б. Ахметалиева, В.И. Косилов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2012. № 3 (35). С. 129–131.
4. Шевхужев А., Воюцкий А. Мясная продуктивность бычков калмыцкой и симментальской пород в условиях комплекса // Молочное и мясное скотоводство. 2009. № 8. С. 13–14.
5. Тюлебаев С.Д. Мясные качества бычков разных генотипов в условиях Южного Урала // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. № 2 (30). С. 106–108.
6. Джуламанов К.М. Весовой рост бычков герфордской породы разных типов телосложения // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2012. № 3 (35). С. 121–123.
7. 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: 2012. Т. 13. С. 36–43.
8. Михайлова М.Е., Белая Е.В. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада *bGH*, *bGHR* и *bIGF-1* на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2011. Т. 55. № 2. С. 63–69.
9. Phillips J.A. III Inherited defects in growth hormone synthesis and action. In: The metabolic and molecular basis of inherited disease / ed. by C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. 7-th Edition // McGraw-Hill Health Professions Division. 1995. Vol. 2. P. 3023–3044.
10. Lemay D.G., Lynn D.J., Martin W.F. The bovine lactation genome: insights into the evolution of mammalian milk // Genome Biology. 2009. Vol. 10. issue 4.