

УДК 636.082 : 575.113

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ, АСОЦІЙОВАНИХ З ГОСПОДАРСЬКО КОРИСНИМИ ОЗНАКАМИ (QTL) У РІЗНИХ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

К.В. КОПИЛОВ

Інститут розведення і генетики тварин НААН України

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н, с. Чубинське, вул. Погребняка, 1

e-mail: kopylkir@ukr.net

Проведені дослідження генетичної структури чотирьох порід великої рогатої худоби за шістьма структурними генами. Отримані результати вказують, що розподіл алельних варіантів генів визначається особливостями формування генофонду кожної породи відповідно до її напрямку продуктивності.

Ключові слова: ДНК-технології, QTL, селекція за допомогою маркерів (Marker Assisted Selection – MAS), ДНК-маркери.

Вступ. Насиченість продовольчого ринку якісними продуктами вітчизняного виробництва в достатньому обсязі неможлива без інтенсифікації тваринництва, де однією із складових є ефективна селекція. Генетичний потенціал сільськогосподарських тварин прийнято розглядати з точки зору можливості формування генних комплексів, здатних у певних умовах середовища детермінувати розвиток бажаного фенотипу. Завдяки розвитку генетики кількісних ознак було сформульовано припущення про те, що наявність детальної інформації про тісно зчеплені гени могла б дозволити маркувати молекулярно-генетичними маркерами «основні» гени кількісних ознак і, таким чином, прогнозувати і отримувати генотипи новонароджених тварин із бажаними фенотипічними ознаками.

На рівні порід, стад, споріднених груп генетичні маркери дають можливість розширити і поглибити уявлення селекціонера про особливості племінного матеріалу, з яким він проводить роботу. Тут поліморфні системи дозволяють оцінити різноманітність генофонду популяцій, що селекціонуються, проаналізувати зміни, пов'язані з селекційними факторами, та дають можливість виявляти в ранньому віці видатні генотипи та прогнозувати результати добору і здійснювати спрямований підбір [1-4]. У зв'язку з цим розвиток тваринництва України в даний час потребує впровадження нових методів та підходів, які базуються на безпосередньому аналізі спадкової інформації на рівні генів чи груп зчеплення генів, в основі яких лежить використання поліморфізму ДНК для виявлення специфічних послідовностей ДНК. ДНК-діагностика (генна діагностика) дає можливість, з одного боку управляти генетичною структурою популяції, з іншого – проводити аналіз генотипів тварин на рівні генів, які асоційовані з господарсько корисними ознаками [5]. Такі локуси отримали назву локуси кількісних ознак, QTL (Quantitative Trait Loci's) [6-8].

© К.В. КОПИЛОВ, 2010

Ідентифікація генів та їхніх варіацій, які визначають той або інший розвиток кількісних ознак (QTL), у європейських країнах та США дає можливість отримання прибутків за рахунок скорочення генераційного інтервалу, раннього введення ремонтного поголів'я в процес відтворення та застосування селекції з допомогою маркерів MAS, тобто проводити підбір батьківських пар і добір певних генотипів та отримувати нащадків з відповідним генетичним потенціалом щодо основних показників продуктивності [9–11].

Матеріали і методи

Оцінку поліморфізму генів капа-казеїну (*CSN3*), бета-лактоглобуліну (*BLG*), гормону росту (*GH*), гіпофізарно-специфічний фактор транскрипції (*Pit 1*) проводили за методом ПЛР-ПДРФ. Виділення ДНК проводили з використанням стандартного комерційного набору «ДНК-сорб В» виробництва «Амплісенс» згідно з рекомендаціями виробника. Концентрацію ДНК перевіряли шляхом електрофорезу в 2% агарозному гелі. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл: H_2O – 4,3 мкл, буфер-ПЛР 5-х (15 м Mg-1,0 мол) – 2,0 мкл; dNTP суміш 10-х (2мМ кожного) – 0,8 мкл; два праймери (70 нг кожного) – 0,8 мкл; Taq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,1 мкл; ДНК 50–100 нг – 2,0 мкл.

Для ампліфікації фрагмента гена *κ-Cn* використовували такі праймери: 5' GAAATCCCTACCATCAATACC-3' та 5'-CCATCTACCTAGTTTATGATG-3'. Для ампліфікації фрагмента гена *βLG* використовували праймери: 5'-TGTGCTGGACCCGACTA-CAAAAAG-3'; 5'GCTCCCGGTATATGACCA-CCCTCT-3'. Для ампліфікації фрагмента гена *GH* використовували такі праймери: 5' -GCTGCTCCTGAGGGCCCTTC-3'; 5'-GCGGCGGCACTTCATGACCC-3'. Для

ампліфікації фрагмента гена *PIT-1* використовували праймери: 5'-CAATGAGA-AAGTTGGTGC-3'; 5'-TCTGCATTTCGAGATG-CTC-3'. Для аналізу поліморфізму структурних генів використовували рестриктази, підібрані до кожного гена: *κ-Cn* – Hinf 1, *βLG* – Hae III, *GH* – AluI, *PIT-1* – HinfI. Аналізували особливості генетичної структури чотирьох основних порід великої рогатої худоби, а саме української чорно-рябої молочної (n – 125 гол.), української червоно-рябої молочної (n – 90 гол.), голштинської (n – 53 гол.) та симентальської (n – 92 гол.) порід за поліморфізмом основних генів кількісних ознак.

Результати і обговорення

З метою вивчення особливостей формування генотипів досліджуваних порід проведено порівняльний аналіз за відповідними генами. За геном капа-казеїну *κ-CN* частота генотипу AA у молочних порід складала 0,664, 0,778, 0,793 відповідно для тварин української чорно-рябої молочної, української червоно-рябої молочної та голштинської порід, у сименталів гомозиготні тварини за алелем A зустрічалися з частотою 0,467. Гетерозиготні тварини генотипу AB за частотою розподілялися таким чином: українська чорно-ряба молочна порода – 0,312, українська червоно-ряба молочна – 0,222, голштинська – 0,207, у тварин симентальської породи цей показник був вищий і складав 0,425. У популяціях голштинської і української червоно-рябої молочної порід гомозиготні тварини з генотипом BB не були виявлені, в українській чорно-рябій молочної породі гомозиготні тварини зустрічалися з частотою 0,024, в чотири з половиною рази нижче, ніж у тварин комбінованого напрямку продуктивності симентальської породи, у яких цей показник складав 0,108. За розподілом алелей найбільш подібні за генетичною структурою виявились українська

чорно-ряба молочна, українська червоно-ряба молочна та голштинська породи, у яких частота алеля А складала 0,820, 0,888, 0,896 відповідно. Значно нижчу частоту цього алеля спостерігали у тварин симентальської породи – 0,679. Частота В-алельного варіанта була дуже низькою у тварин української чорно-рябої молочної породи і складала 0,180, української червоно-рябої молочної породи – 0,112 і була подібною до частоти цього алеля у голштинської породи – 0,104, проти 0,320 у сименталів. Подібність за генетичною структурою і низька концентрація В-алельного варіанта пояснюється тим, що у створенні вітчизняних порід використовували бугаїв голштинської породи, популяції яких несуть не більше 20 % цього алеля. При аналізі частоти алеля В у корів і бугаїв спостерігається менша частота цього алеля у бугаїв 20,7 % порівняно з коровами української чорно-рябої молочної породи 33,6 %, української червоно-рябої молочної породи 22,2 %, що пов'язано з більш жорстким відбором бугаїв, і вірогідно, що різні фактори штучного добору спрямовані проти В алеля цього гена.

За геном βLG у досліджених порід було виявлено переважну кількість тварин з генотипом АВ. Так, частота цього генотипу у тварин української чорно-рябої молочної і української червоно-рябої молочної порід була майже однаковою – 0,576 та 0,578 відповідно, і була наближена до частоти цього генотипу у тварин голштинської породи, у яких вона складала 0,566, для сименталів частота гетерозиготних тварин була меншою – 0,489. Частота гомозиготних тварин з генотипом ВВ була однаковою у представників української чорно-рябої молочної і української червоно-рябої молочної порід і складала 0,344, у голштинів – 0,302, а у сименталів – 0,359. Генотип АА за геном бета-лактоглобуліном найчастіше зустрічався у тварин симентальської поро-

ди – 0,152, а в популяціях української чорно-рябої молочної і української червоно-рябої молочної порід був дуже низьким 0,08 і 0,078 відповідно, а у тварин голштинської породи він складав 0,132. Загалом частота алельного варіанта В за цим геном становила у тварин української чорно-рябої молочної 0,632, української червоно-рябої молочної – 0,633, голштинської – 0,585 і симентальської порід – 0,359. З отриманих результатів так само, як і за геном капа-казеїну, ми спостерігаємо за розподілом частот алелей і генотипів за геном бета-лактоглобуліну подібність генетичної структури популяції тварин української чорно-рябої молочної, української червоно-рябої молочної і голштинської порід.

В результаті проведення міжпородного аналізу за геном гормону росту *GH* у популяціях тварин, української червоно-рябої молочної і голштинської порід не були виявлені тварини гомозиготні за алельним варіантом V гена гормону росту, в популяції тварин української чорно-рябої молочної породи їхня частка була незначною – 0,056, а у симентальської породи тварини за цим генотипом складала 0,207. Частота гетерозиготних тварин із генотипом LV була такою: у тварин української чорно-рябої молочної – 0,328, української червоно-рябої молочної – 0,167, голштинської – 0,207 і симентальської порід – 0,391. Однак для тварин молочного напрямку продуктивності виявилась характерною висока частота гомозиготних тварин із генотипом LL порівняно з тваринами симентальської породи, у яких частота цього генотипу складала 0,402, а у тварин української чорно-рябої молочної, української червоно-рябої молочної і голштинської – 0,616, 0,833, 0,793 відповідно. Частота алеля L, асоційованого з надоем і вмістом жиру в молоці, була найнижчою у тварин симентальської породи – 0,402, а

для тварин української чорно-рябої молочної, української червоно-рябої молочної і голштинської порід частота цього алеля виявилась однаково високою і складала 0,780, 0,917 і 0,896 відповідно, що і за цим геном вказує на подібність генетичних структур досліджених порід тварин великої рогатої худоби молочного напрямку продуктивності.

Для тварин симентальської породи за геном *PIT-1* виявилася характерною на відміну від тварин інших порід висока частота гомозиготних тварин з генотипом ВВ, яка складала 0,719, гомозиготні тварини за А алелем не були виявлені, частота гетерозигот АВ була 0,281. Для тварин молочних порід української чорно-рябої молочної, української червоно-рябої молочної, голштинської – розподіл, як за частотою генотипів, так і алельних варіантів був подібний. Частота генотипу АА у тварин української чорно-рябої молочної, української червоно-рябої молочної і голштинської порід складала 0,192, 0,155 та 0,208 відповідно. Частота гетерозиготних тварин АВ була у популяціях української чорно-рябої молочної 0,489, української червоно-рябої молочної – 0,567 і голштинської порід – 0,417. Частота гомозиготних тварин за В алелем розподілялася наступним чином: української чорно-рябої молочної породи – 0,320, української червоно-рябої молочної – 0,278, голштинської – 0,375. Частота алеля А у молочних порід була майже однаковою – 0,436, 0,438, 0,416 у тварин української чорно-рябої молочної, української червоно-рябої молочної і голштинської порід відповідно, що пов'язано, як з напрямком продуктивності, так і історією створення вітчизняних порід. Для тварин симентальської породи частота алеля А була досить низькою і складала 0,141.

За геном лептину *Lep* для тварин української чорно-рябої молочної породи виявилася характерною така частота розподілу генотипів: АА – 0,616, АВ – 0,344, ВВ –

0,04, а для тварин симентальської породи: АА – 0,598, АВ – 0,402, гомозиготних тварин з генотипом ВВ виявлено не було. Частота алеля А у тварин української чорно-рябої молочної породи складала 0,788, а симентальської – 0,799.

За геном *MSTN* не були виявлені тварини симентальської породи з мутацією за цим геном з генотипом АВ (196 та 185 пн) – nt821 (del11), що спричиняє м'язову гіпертрофію у великої рогатої худоби.

В результаті проведення кореляційного аналізу щодо встановлення асоціацій між різними генотипами тварин за дослідженими локусами кількісних ознак і показниками молочної продуктивності були отримані вірогідні кореляції між дослідженими локусами і показниками продуктивності.

Так, за геном капа-казеїну *k-CN* були виявлені відповідні різниці продуктивності тварин в залежності від генотипу за таким показником, як надій: для корів української чорно-рябої молочної породи надій тварини з генотипом АВ>АА на 18,92% ($p < 0,1$), АВ > ВВ на 24,9% ($p < 0,05$); для корів української червоно-рябої молочної породи АА > ВВ на 8%; для тварин симентальської породи ВВ > АА на 4,09%, ВВ > АВ на 14,74% ($p < 0,1$). За геном βLG були отримані такі результати: для корів української чорно-рябої молочної породи за таким показником, як вміст білка в молоці, тварини з генотипом АВ>ВВ на 0,13%, АВ > АА на 1,18% ($p < 0,01$); для корів української червоно-рябої молочної породи надій тварин з генотипом АА > АВ на 8,49% ($p < 0,05$), АА > ВВ на 9,54% ($p < 0,1$), за таким показником, як вміст жиру в молоці тварин з генотипом АВ > АА на 0,156% і АВ > ВВ на 0,083%; для тварин симентальської породи за вмістом жиру в молоці тварини з генотипом ВВ > АВ на 0,04%. За геном гормону росту *GH* за надоем у тварини української чорно-рябої молочної тварини LV>LL на 10,9% ($p < 0,1$), LV > VV на 7,28%, за вмістом жиру в молоці тварин LL>LV на

0,038%, $VV > LL$ на 0,037%, $VV > LV$ на 0,07%; для тварин української червоно-рябої молочної породи за вмістом білка в молоці тварини з генотипом $LL > LV$ на 0,001%, за вмістом жиру в молоці тварини з генотипом $LV > LL$ на 0,099%; за надоєм тварини симентальської породи з генотипом $LL > LV$ на 2,73%, а $LL > VV$ на 10,395, за вмістом жиру в молоці тварини з генотипом $LV > LL$ на 0,226% і $LV > VV$ на 0,236%. За геном PIT-1 за таким параметром, як надій молока, тварини української чорно-рябої молочної породи з генотипом $AA > BB$ на 8,932%, $AA > AB$ на 6,046%; у тварин української червоно-рябої молочної надій виявився вищим у тварин з генотипом $AB > AA$ на 4,83% і $AB > BB$ на 4,27%, вміст білка в молоці у тварин з генотипом $AB > AA$ на 0,021%, а вміст жиру в молоці $AB > AA$ на 0,064% і $AB > BB$ на 0,002%. За геном лептину Lep тварини української чорно-рябої молочної породи за вмістом жиру в молоці мали високу вірогідну різницю $BB > AB$ на 0,059% ($p < 0,01$) і $BB > AA$ на 0,455% ($p < 0,01$), $AB > AA$ на 0,396% ($p < 0,01$); для симентальської породи надій виявився вищим $AB > AA$ на 0,311%, а за вмістом білка в молоці тварини з $AB > BB$ на 0,053%.

На підставі отриманих результатів за досліджуваними генами та враховуючи полігенний характер детермінації формування ознак молочної продуктивності рекомендується комплексний модельний генотип для підвищення надою для тварин української чорно-рябої молочної породи – $k-CN^{AB}$, βLG^{AB} , GH^{LV} , Pit^{AA} , Lep^{AA} ; української червоно-рябої молочної породи – $k-CN^{AA}$, βLG^{AA} , GH^{LL} , Pit^{AB} ; симентальської породи – $k-CN^{BB}$, βLG^{BB} , GH^{LL} , Lep^{AB} ; для підвищення жирномолочності: для тварин української чорно-рябої молочної породи – $k-CN^{AB}$, βLG^{AB} , GH^{VV} , Pit^{AA} , $Lep^{BB/AB}$; української червоно-рябої молочної породи – $k-CN^{AA}$, βLG^{AB} , GH^{LV} , Pit^{1AB} ; симентальської породи – $k-CN^{BB}$, βLG^{BB} , GH^{LV} , Lep^{AA} .

Висновки

Таким чином, отримані результати щодо поліморфізму локусів кількісних ознак (QTL) вказують на те, що за розподілом алельних варіантів генів та генотипів породи молочного напрямку продуктивності вітчизняної селекції подібні за генетичною структурою, що безумовно пояснюється тим, що українська чорно-ряба молочна і червоно-ряба молочна породи створювались шляхом складного відтворювального схрещування з голштинською породою. Розподіл алельних частот генотипів, їхнього успадкування визначається особливостями селекційної роботи, яка проводиться з кожною породою окремо, відповідно до її належності до визначеного напрямку продуктивності і не пов'язаний з використанням близькородинних схрещувань при розведенні тварин та їхньої приналежності до однієї чи декількох ліній. Розподіл алельних варіантів та генотипів тварин за дослідженими молекулярно-генетичними маркерами можна розглядати як додаткові характеристики порід. Отримана інформація при відповідній її оцінці додатково до класичних методів селекційно-плеєнної роботи дає можливість створення популяцій тварин шляхом цілеспрямованого генетичного добору і підбору батьківських пар із відповідним генетичним потенціалом щодо відповідних технологічних вимог до отримуваної сільськогосподарської продукції, зокрема показників молочної продуктивності в молочному скотарстві.

Перелік літератури

1. Буркат В.П. Великомасштабна селекція: проблеми і принципи організації // Тваринництво України. – 1985. – № 3. – С. 24–27.
2. Зубець М.В., Буркат В.П. Наукові основи породотворчого процесу в молочному і м'ясному скотарстві на сучасному етапі // Тваринництво України. – 1996. – № 1. – С. 3–4.

3. Буркат В.П., Ефименко М.Я., Хаврук А.Ф., Подоба Б.Е. Принципы использования генетических маркеров в породообразовательном процессе / Проблемы производства молока и говядины: материалы междунар. конф., 19–20 июня 1996 г. / Акад. аграр. наук Респ. Беларусь, Бел. НИИ животноводства. – Жодино, 1996. – С. 67.
4. Зубець М.В. Перспектива розвитку біотехнологій в УААН / Використання сучасних молекулярно-генетичних і біотехнологічних розробок у генетико-селекційних дослідженнях : зб. матеріалів 2-ої міжнар. конф. – К. : Аграр. наука, 1998. – С. 3–6.
5. Зайд А., Хьюз Х.Г., Порчедду Э., Николас Ф. Словарь терминов по биотехнологии для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства. – Рим, 2008. – С. 395.
6. Daetwyler H., Schenkel F., Sargolzaei M. A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map // J. Dairy Sci. – 2008. – Vol. 91, № 8. – P. 3225–3236.
7. Ashwell M., Heyen D., Sonstegard T. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle // Journal of dairy science. – 2004. – Vol. 87, № 2. – P. 468–475.
8. Lipkin E., Tal-Stein R., Friedmann A. Effect of quantitative trait loci for milk protein percentage on milk protein yield and milk yield in Israeli Holstein dairy cattle // Journal of dairy science. – 2008. – Vol. 91, № 4. – P. 1614–1627.
9. Lipkin E., Bagnato A., Soller M. Expected effects on protein yield of marker-assisted selection at quantitative trait loci affecting milk yield and milk protein percentage // Journal of dairy science. – 2008. – Vol. 91, № 7. – P. 2857–2863.
10. Viitala S., Schulman N., de Koning D.J. Quantitative trait loci affecting milk production traits in Finnish Ayrshire dairy cattle // Journal of dairy science. – 2003. – Vol. 86, № 5. – P. 1828–1836.
11. Bagnato A., Schiavini F., Rossoni A. Quantitative trait loci affecting milk yield and protein percentage in a three-country brown swiss population // Journal of dairy science. – 2008. – Vol. 91, № 2. – P. 767–783.

Представлено В.С. Коноваловим
Надійшла 23.07.2010

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ХОЗЯЙСТВЕННО-
ПОЛЕЗНЫМИ ПРИЗНАКАМИ (QTL) У РАЗНЫХ
ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

К.В. Копилов

Институт разведения и генетики животных НААНУ
Украина, 08321, Киевская обл., Бориспольский
р-н, с. Чубинское, ул. Погребняка, 1
e-mail: kopylkir@ukr.net

Проведены исследования генетической структуры 4-х пород крупного рогатого скота по 6-ти структурным генам. Полученные данные указывают на то, что распределение аллельных вариантов исследованных генов определяется особенностями искусственного отбора, проводимого с каждой породой в соответствии с ее принадлежностью к определенному направлению продуктивности.

Ключевые слова: ДНК-технологии, QTL, маркервспомогательная селекция (Marker Assisted Selection – MAS), ДНК-маркеры.

POLYMORPHISM OF GENES ASSOCIATED
WITH ECONOMICALLY USEFUL TRAITS (QTL)
IN VARIOUS BREEDS OF CATTLE

К.В. Копилов

Institute of animal breeding and genetics of NAAS
of Ukraine
Ukraine, 08321, Kyiv Region, Boryspil District, v.
Chubinsky, Pogrebnyaka, 1
e-mail: kopylkir@ukr.net

Studies on genetic structure of four breeds of cattle by six structural genes were carried out. The obtained results indicate that distribution of gene allelic variants is determined by the peculiarities of gene pool formation for each breed accordingly to its direction of productivity.

Key words: DNA-technology, QTL, Marker Assisted Selection – MAS, DNA markers.