

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ СОМАТОТРОПИНОВОГО КАСКАДА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КОРОВ КАЗАХСКОЙ БЕЛОГОЛОВОЙ ПОРОДЫ

Бейшова Индира Салтановна, канд. с.-х. наук, доцент кафедры биологии и химии, зав. отделом молекулярно-генетических исследований испытательной лаборатории производства продуктов питания, Костанайский государственный университет имени А. Байтурсынова.

110000, Республика Казахстан, г. Костанай, ул. Маяковского, 99/1.

E-mail: indira_bei@mail.ru

Ключевые слова: гены, полиморфизм, маркер, каскад, продуктивность, порода, соматотропный, мясная.

Цель исследований – установление ассоциации генотипов полиморфизмов bPit-1-Hinfl, bGH-Alul и bGHR-Sspl с мясной продуктивностью казахского белоголового скота, перспективных в использовании в качестве генетических маркеров хозяйственно-полезных признаков крупного рогатого скота. Материалом исследований послужила кровь сельскохозяйственных животных. Образцы крови и бонитировочные данные были предоставлены ТОО «Жанабек» и ТОО «Караман-К», Костанайская область. Генотипы животных определяли методом ПЦР-ПДРФ. Статистическая обработка результатов генотипирования и данных зоотехнического учета проводилась с помощью программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel. Оценку генотипов с мясной продуктивностью проводили по показателю живой массы. Анализировались индексы, характеризующие телосложение животных. Результаты исследований показали, что генотип bPit-1-HinF^{IAA} гена гипофизарного фактора транскрипции-1 положительно ассоциирован с признаком растянутости в возрасте 24 месяца. Так, показатель индекса растянутости у коров с генотипом bPit-1-HinF^{IAA} составляет 132,768 (126,667; 137,500), в то время, как данный показатель у коров с генотипами bPit-1-HinF^{IAB} и bPit-1-HinF^{IBB} составляет 127,966 (120,833; 137,705) и 119,643 (117,544; 124,074). Полиморфизм bIGF-1-SnaBI ассоциирован с признаком живой массы в возрасте 12, 18, 24 месяца (наибольшее значение генотип bIGF-1-SnaBI^{AB} и bIGF-1-SnaBI^{AA}, наименьшее – генотип bIGF-1-SnaBI^{BB}). Таким образом, генотип bPit-1-HinF^{IAA} можно рекомендовать в качестве генетического маркера повышенной мясной продуктивности крупного рогатого скота казахской белоголовой породы. Генотип bIGF-1-SnaBI^{BB} является маркером пониженной мясной продуктивности крупного рогатого скота. Работа с полиморфизмом bIGF-1-SnaBI как с генетическим маркером должна строиться не на отбор по предпочтительному генотипу, а на элиминацию негативного генотипа bIGF-1-SnaBI^{BB}.

Оценка животных по генетическим маркерам является более эффективной, если включены 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 [1].

Большой интерес для повышения мясной продуктивности крупного рогатого скота представляют гены соматотропинового каскада, белковые продукты которых являются ключевыми звеньями одной гуморальной цепи, участвующей как в процессе лактации, так и в процессах роста и развития млекопитающих (bPit-1, bGH, bGHR, bIGF-1) [2, 3]. Следовательно, изучение полиморфизмов этих генов является перспективным с точки зрения поиска маркеров, ассоциированных с признаками и молочной, и мясной продуктивности у крупного рогатого скота [4, 5]. Характеристика соматотропинового каскада. 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 [6]. Эти белки составляют своеобразную ось («axis») или систему, которая запускает и контролирует совокупность метаболических процессов, ведущих к росту и связанных с клеточной дифференцировкой [2].

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 [6]. В целом, в системе гормона роста выделяют две ветви – «основную» и «боковую» или «дополнительную», а также три специальных регуляторных звена, обусловленных действием: соматолиберина (гипоталамический релизинг-фактор гормона роста или соматотропин, GHRH); соматостатина (SST, SRIF); 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 влечет 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 [7].

Цель исследований – установление ассоциации генотипов полиморфизмов *bPit-1-Hinfl*, *bGH-AluI* и *bGHR-Sspl* с мясной продуктивностью казахского белоголового скота, перспективных в использовании в качестве генетических маркеров хозяйственно-полезных признаков крупного рогатого скота.

Задачи исследований:

- провести генотипирование крупного рогатого скота по генам соматотропного каскада;
- изучить влияние генотипов исследуемых генов на показатели мясной продуктивности коров.

Материалы и методы исследований. Объект исследования – выборки коров казахской белоголовой породы. Предмет исследования – полиморфные гены соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bGH*, *bGHR* и *bIGF-1*). Материал исследования – образцы ДНК, выделенной из крови коров казахской белоголовой породы.

Определение генотипов животных осуществлялось методом ПЦР-ПДРФ. Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализа каждого полиморфизма приведены в таблице 1.

Таблица 1

Индивидуальные характеристики условий ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов соматотропинового каскада

Полиморфизм	Условия амплификации	Последовательности праймеров
<i>bPit-1-Hinfl</i>	95° – 5 мин; (95°С – 45 с; 55,3°С – 45 с; 72°С – 45 с) x x 34 цикла; 72°С – 10 мин; 12°С – 10 мин	Hinfl-F: 5'-aaaccatcatctcccttctt-3' Hinfl-R: 5'-aatgtacaatgtcttctgag-3'
<i>bGH-AluI</i>	95°С – 5 мин; (95°С – 30 с; 64°С – 30 с; 72°С – 60 с) x x 35 циклов; 72°С – 10 мин	AluI-F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3' AluI-R: 5'-gttcttgagcagcgcg-3'
<i>bGHR-Sspl</i>	95°С – 3 мин; (95°С – 30 с; 62°С – 30 с; 72°С – 30 с) x x 30 циклов; 72°С – 10 мин; 12°С – 5 мин	Sspl-F: 5'-aatatgtagcagtgacaatat-3' Sspl-R: 5'-acgttcactgggtgatga-3'
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	95°С – 3 мин; (95°С – 30 с; 64°С – 30 с; 72°С – 30 с) x x 35 циклов; 72°С – 10 мин; 12°С – 5 мин	SnaBI-F: 5'-attcaaagctgcctgcccc-3' SnaBI-R: 5'-acacgtatgaaaggaact-3'

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

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bPit-1* в экзоне 6 проводился с помощью рестриктазы *Hinfl*. Полиморфизм обусловлен А→G нуклеотидной заменой, не приводящей к изменению аминокислотной последовательности. Сайт узнавания для рестриктазы *Hinfl* является последовательность G↓ANTC. Разрезаемый в ходе ферментации фрагмент содержит нуклеотид А, соответствующий аллелю *bPit-1-Hinfl^B* [8]. В случае присутствия G-нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bPit-1-Hinfl^A*.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bGH* в экзоне 5 проводился с помощью рестриктазы *AluI*. Полиморфизм обусловлен 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* распознает Т→А транзицию в экзоне 8. Данная замена вызывает подстановку полярного, хотя и незаряженного, остатка тирозина вместо нейтрального фенилаланина в положении 279 белка. Сайтом узнавания для рестриктазы является последовательность AAT↓ATT. 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*.

Полиморфизм нуклеотидной последовательности гена инсулиноподобного фактора роста-1 *bIGF-1* в области P1 промоторного региона идентифицирован как Т→С трансверсия. Эта замена распознается рестриктазой *SnaBI*. Разрезаемый ферментом амплификат содержит нуклеотид Т, соответствующий аллелю *bIGF-1-SnaBI^A*. В случае присутствия С-нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bIGF-1-SnaBI^B* [9].

Определение предпочтительного и нежелательного аллелей проводилась путем сравнения показателей живой массы у телок с разными генотипами при рождении, а также в возрасте 3, 6, 9, 12, 18 и 24 месяца. Также в возрастах 12, 18 и 24 месяца 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 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 $P < 0,05$.

Так как характер распределения анализируемых признаков в исследованных группах не имел приближенно нормального распределения, и число выявленных животных с редкими генотипами в некоторых случаях было меньше 20, то в дальнейшем вся обработка и интерпретация данных, а также предоставление результатов проводилась методами непараметрической статистики. Данные представлены в виде Me (25%; 75%), где Me – медиана (срединное значение) признака; 25% и 75% – интерквартильный размах признака, характеризующий разброс распределения признака.

Результаты исследований. Из данных, полученных в результате изучения характеристик продуктивности казахской белоголовой породы с разными генотипами полиморфизма *bPit-1-HinFI* (Me (25%; 75%)) можно отметить, что как в основной, так и в контрольной группах нет 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 месяцев и в возрасте 9, и 18 месяцев группа животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* характеризуется более высоким показателем живого веса по сравнению с группами с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}*. Однако, низкая частота встречаемости данного генотипа в выборке казахской белоголовой породы не позволяет оценить достоверность наблюдения.

По 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 наблюдается статистически значимое превышение показателя растянутости в возрасте 24 месяца 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}* составляет 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}* составляет 127,966 (120,833; 137,705) и 119,643 (117,544; 124,074) соответственно. То есть

генотипом с наименьшим значением индекса растянутости является гомозигота *bPit-1-HinF^{BB}*.

Таким образом по признаку растянутости в возрасте 24 месяца генотип *bPit-1-HinF^{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 месяцев группа коров с генотипом *bGH-AluI^{LL}* превышает по живому весу группу коров с генотипом *bGH-AluI^{LV}*. В возрасте 24 месяца этот показатель различается у групп статистически значимо, что делает возможным рассматривать генотип *bGH-AluI^{LL}* как предпочтительный, а генотип *bGH-AluI^{LV}*, как альтернативный. Группа коров с генотипом *bGH-AluI^{VV}* составляла всего 5 животных, поэтому не была включена в обработку.

В контрольной группе наблюдается противоположная тенденция, однако небольшое число наблюдений не позволяет 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-Sspl* казахской белоголовой породы (Me, (25%; 75%)) показал, что в основной группе в пределах полиморфизма *bGHR-Sspl* между животными с генотипами *bGHR-Sspl^{FF}*, *bGHR-Sspl^{FY}* и *bGHR-Sspl^{YY}* достоверных различий в показателях живого веса не наблюдается. Такая же картина отмечается и в контрольной группе. В виде тенденции можно отметить, что гомозиготы по редкому аллелю *bGHR-Sspl^{YY}* характеризуются сниженным весом по сравнению с гомозиготами по более распространенному аллелю *bGHR-Sspl^{FF}*.

Такая же тенденция прослеживается в контрольной группе. Однако, число животных в группах не позволяет провести оценку достоверности наблюдаемых различий.

По результатам характеристик продуктивности основной и контрольной групп по индексам телосложения можно добавить, что животные основной группы с генотипом *bGHR-Sspl^{YY}* характеризуются сниженным индексом костистости в возрасте 24 месяца, а также сниженным индексом растянутости и массивности в возрасте 18 и 24 месяца. Так же для этой группы животных наблюдается снижение индекса шилозадости в возрасте 12, 18 и 24 месяца по сравнению с коровами с генотипом *bGHR-Sspl^{FF}* и *bGHR-Sspl^{FY}*.

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

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 демонстрируются статистически значимые различия по признаку живой массы в возрасте 12, 18 и 24 месяца 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 месяца.

По оценке индексов телосложения, можно отметить, что в основной группе животные с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{AA}* характеризуются более низкими значениями индексов растянутости и массивности в возрасте 18 и 24 месяца, что свидетельствует в пользу более низкой мясной продуктивности при одинаковой живой массе с другими группами. В то же время, эти животные характеризуются более низким индексом шилозадости, что в свою очередь является преимуществом для реализации репродуктивной функции у коров.

В контрольной группе четких тенденций не прослеживается, что объясняется маленьким количеством животных.

Заключение. Таким образом для коров казахской белоголовой породы установлено

следующее:

- полиморфизм *bPit-1-HinFI* ассоциирован с признаком растянутости в возрасте 24 месяца (наибольшее значение признака – генотип *bPit-1-HinFI^{AA}*);

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

- генотипы с наибольшим значением признака рассматриваются как предпочтительные, потенциальные генетические маркеры, и для оценки целесообразности включения их в селекционные программы данные 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 отеле. Предпочтительным в селекционных мероприятиях считается генотип с наименьшим значением признака.

Библиографический список

1. Белая, Е. 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 / Е. В. Белая, М. Е. Михайлова, Н. В. Батин // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. – 2012. – Т. 13. – С. 36-43.

2. Михайлова, М. Е. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада *bGH*, *bGHR* и *bIGF-1* на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы / М. Е. Михайлова, Е. В. Белая // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2011. – Т. 55, № 2. – С. 63-69.

3. Тюлькин, С. В. Полиморфизм гена гипофизарного фактора транскрипции у быков-производителей Республики Татарстан / С. В. Тюлькин, И. И. Хатыпов, А. В. Муратова [и др.] // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2015. – № 222 (2). – С. 218-220.

4. Hammami, H. Environmental sensitivity for milk yield in Luxembourg and Tunisian Holsteins by herd management level / H. Hammami, B. Rekik, C. Bastin [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2009. – Vol. 92. – №9. – P. 4604-4612.

5. Szewczuk, M. Association of insulin-like growth factor I gene polymorphisms (*IGF1/TasI* and *IGF1/SnaBI*) with the growth and subsequent milk yield of Polish Holstein-Friesian heifers / M. Szewczuk, M. Bajurna, S. Zych, W. Kruszyński // Czech Journal of Animal Science. – 2013. – Vol.58. – P. 401-411.

6. Phillips, J. A. III Inherited defects in growth hormone synthesis and action. 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

7. Ruprechter, G. Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotrophic axis genes / G. Ruprechter, M. Carriquiry, J. M. Ramos [et al.] // Acta Veterinaria Scandinavica. – 2011. – Vol. 53. – P. 35-44.

8. Lemay, D. G. The bovine lactation genome: insights into the evolution of mammalian milk / D. G. Lemay, D. J. Lynn, W. F. Martin // Genome Biology. – 2009. – Vol. 10. – № 4.

9. Keady, S. M. Effect of sire breed and genetic merit for carcass weight on the transcriptional regulation of the somatotrophic axis in longissimus dorsi of crossbred steers / S. M. Keady, D. A. Kenny, M. G. Keane, S. M. Waters // Journal of Animal Science. – 2011. – Vol. 89. – P. 4007-4016.