

Оценка аллельного и генотипического разнообразия крупного рогатого скота Якутии по генам молочности

Н.И. Павлова*, Н.П. Филиппова*, Х.А. Куртанов**, Л.П. Корякина*

*Якутская государственная сельскохозяйственная академия, г. Якутск

**Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, г. Якутск

В изученных популяциях крупного рогатого скота Якутии выявлено два аллеля гена каппа-казеина – A и B и три генотипа – AA, AB и BB. Частота встречаемости аллеля A была выше по сравнению с аллелем B и варьировала в зависимости от породы от 0,50 до 0,73. Среди исследованных пород животных с генотипом AA больше всего выявлено в симментальской австрийской селекции (55%) и холмогорской (50%). Желательный для производства сыра генотип BB имели 25% коров калмыцкой породы и 10% – симментальской австрийской селекции. По гену бета-лактоглобулину установлено, что частота аллеля B преобладает у коров холмогорской (0,60), симментальской местной селекции (0,65) и особенно у коров калмыцкой породы (0,83). У коров симментальской породы австрийской селекции по гену бета-лактоглобулину преимущественно встречались животные с генотипом AB (55%) и AA (30%). В калмыцкой породе преобладали животные с генотипом BB (67%) и не обнаружено коров с генотипом AA. В отношении гена пролактина было установлено, что у всех исследованных пород крупного рогатого скота частота аллеля A (0,79...0,98) преобладает над частотой аллеля B (0,02...0,21). В изученной выборке коров холмогорской породы выявлено 10 различных сочетаний генотипов CSN/LGB/PRL. Чаще встречаются животные с генотипом CSNAB/LGBBB/PRLAA (26,7%). Предварительные исследования молочной продуктивности показали, что животные с генотипом CSNAB/LGBBB/PRLAA имели наибольшие удои (3578 кг), а животные с генотипом CSNAA/LGBAB/PRLAA – наименьшие (2170 кг). Больше количество молочного жира отмечалось у коров с генотипом CSNAB/LGBBB/PRLAA (123,8 кг).

Ключевые слова: ген, каппа-казеин, бета-лактоглобулин, пролактин, аллель, генотипы, полиморфизм, крупный рогатый скот, молочная продуктивность.

Evaluation of Allelic and Genotypic Diversity of Cattle of Yakutia on Milk Productivity Gene

N.I. Pavlova*, N.P. Filippova*, Kh.A. Kurtanov**, L.P. Koryakina*

*Yakut State Agricultural Academy, Yakutsk

**Yakut Scientific Center of Complex Medical Problems, Yakutsk

In the studied populations of cattle of Yakutia we revealed two alleles of kappa-casein genes – A and B, and three genotypes – AA, AB and BB. Frequency of the A allele was higher in comparison with the B allele and varied depending on the breed from 0.50 to 0.73. Among the studied breeds cattle with genotype AA found mostly in Austrian Simmental breeding (55%) and Kholmogory (50%). Required for the production of cheese genotype BB 25% of Kalmyk breed cows had and 10% of the Austrian Simmental breed. According to the beta-lactoglobulin gene, the frequency of allele B is prevalent in Kholmogory cows (0.60), Simmental local selection (0.65), and especially in cows Kalmyk breed (0.83). Cows of Simmental Austrian selection have gene of beta-lactoglobulin predominantly with genotype AB (55%) and AA (30 %). The Kalmyk breed prevailed with BB genotype (67 %) and not found the cows with genotype AA. In respect of prolactin gene it has been found that all investigated cattle breeds, the frequency of allele A (0.79 ... 0.98) dominates the fre-

ПАВЛОВА Надежда Ивановна – аспирант, prof@sakha.ru; ФИЛИППОВА Наталья Павловна – к.б.н., доцент; КУРТАНОВ Харитон Алексеевич – к.м.н., зав. лаб.; КОРЯКИНА Лена Прокопьевна – к.в.н., доцент.

quency of allele B (0.02 ... 0.21). In the studied group of Kholmogory breed cows we revealed 10 different combinations of genotypes CSN/LGB/PRL. More frequent there are cows with genotype $CSN^{AB}/LGB^{BB}/PRL^{AA}$ (26.7%). Preliminary studies of milk production showed that animals with genotype $CSN^{AB}/LGB^{BB}/PRL^{AA}$ had the highest milk yield (3578 kg), and the animals with genotype $CSN^{AA}/LGB^{AB}/PRL^{AA}$ – the lowest (2170 kg). More milk fatness was observed for cows with genotype $CSN^{AB}/LGB^{BB}/PRL^{AA}$ (123.8 kg).

Key words: gene, kappa-casein, beta-lactoglobulin, prolactin, allele, genotype, polymorphism, cattle, milk production.

Введение

Для наращивания производства мяса и молока в республику завозится крупный рогатый скот из других регионов России и из-за рубежа, однако проблема насыщения рынка продуктами отечественного производства не решена. Одной из причин является то, что привозной скот не полностью адаптирован к местным условиям и требует больших экономических вложений для реализации своего генетического потенциала [1]. Поэтому очень важно дальнейшее проведение и усовершенствование селекционно-племенной работы с местными породами крупного рогатого скота с целью повышения их продуктивности, что может быть достигнуто при эффективной системе племенной оценки животных с помощью ДНК-технологии, которая позволяет значительно ускорить решение задач современной селекции.

Установленный для крупного рогатого скота спектр генов-кандидатов на связь с признаками молочной продуктивности включает в себя гены основных белков молока (лактальбуминов и казеинов), гены гормонов, стимулирующих их экспрессию, а также гены, продукты которых регулируют обмен протеинов и липидов в организме [2]. Среди них особое место занимают гены каппа-казеина, бета-лактоглобулина и пролактина. Учитывая связь генов с признаками молочной продуктивности, возникла необходимость оценки аллельного и генотипического разнообразия крупного рогатого скота, разводимого в Республике Саха (Якутия) по данным генам. В связи с этим мы изучили частоты генов каппа-казеина, бета-лактоглобулина и пролактина у завозного скота симментальской породы австрийской селекции, калмыцкой породы, а так же местной симментальской и холмогорской пород крупного рогатого скота.

Материал и методы

Экспериментальные исследования проводились на базе лаборатории генетики и селекции животных ФГБОУ ВО «Якутская государственная сельскохозяйственная академия». Материалом для исследований послужила цельная венозная кровь коров симментальской породы СХПК «Наяхы» и «Усть-Алдан» Усть-Алданского района; холмогорской породы ООО

«Кладовая Олекмы» Олекминского района и КФХ «Дайынына» Намского района; симментальской породы австрийской селекции и калмыцкой породы ООО «Агрофирма Немюгю» Хангаласского района. Сбор крови для выделения ДНК брали из яремной вены в объеме 6 мл в вакуумные пробирки с сухим ЭДТА КЗ. Геномную ДНК выделяли общепринятым стандартным фенол-хлороформным методом [3].

С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследовано всего 156 голов коров четырех пород, в т.ч. симментальской местной селекции – 86, холмогорской местной селекции – 38, симментальской австрийской селекции – 20 и калмыцкой породы скота – 12 голов.

Метод генотипирования с помощью ПЦР и последующего анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) основан на том, что изменения нуклеотидной последовательности в аллельных вариантах гена приводят к появлению или исчезновению сайтов рестрикции эндонуклеаз. Для проведения ПЦР использовали специфичные праймеры (ЗАО «Синтол», г. Москва, Россия):

CSN3: F: 5'-ATAGCCAAATATATCCCAAT-TCAGT-3',

R: 5'-TTTATTAATAAGTCCATGAATCTTG-3' [D.Denicourt, 1990];

bLGB: F: 5'- GTCCTTGTGCTGGACAC-CGACTACA -3',

R: 5'- CAGGACACCGGCTCCCGGTATATGA-3' [J.F. Medrano, 1990];

PRL: F: 5'-CGAGTCCTTATGAGCTTGAT-TCTT-3',

R: 5'-GCCTTCCAGAAGTCGTTTGTTC -3' [Mitra et al, 1995].

Для визуализации фрагментов ДНК пробы вносили в лунки 2,5 % агарозного геля с содержанием этидия бромид (0,5 мкг/мл) и проводили горизонтальный электрофорез в 1×TBE буфере.

Визуализацию и идентификацию генотипов определяли по количественным и качественным признакам ПЦР ПДРФ в УФ- трансиллюминаторе.

Для получения основных показателей внутрипопуляционной изменчивости использовали надстройку для MSExcel – GenAlEx (PeakallandSmouse, 2012) [4].

Результаты и обсуждение

В ходе анализа аллелофонда исследованных местных популяций крупного рогатого скота были получены данные, характеризующие полиморфизм каждого из генов (табл. 1–3).

Результаты ПЦР-анализа исследованных животных по локусу гена каппа-казеина представлены в табл. 1.

В изученных популяциях крупного рогатого скота выявлено два аллеля гена каппа-казеина – А и В и три генотипа – АА, АВ и ВВ (рис. 1).

Частота встречаемости аллеля А была выше по сравнению с аллелем В и варьировала в зависимости от породы от 0,50 до 0,73. Среди исследованных пород животных с генотипом АА,

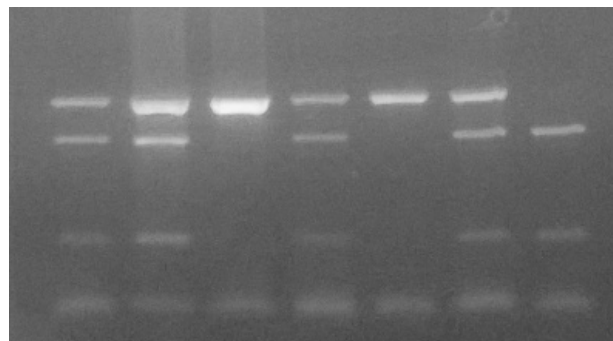


Рис. 1. Электрофореограмма результатов ПЦР-ПДРФ анализа гена каппа-казеина 1,2,4,6: АВ; 3: АА; 7:ВВ

Т а б л и ц а 1

Частота встречаемости генотипов и аллелей гена каппа-казеина у коров

Порода	Кол-во голов	Распре- деление *	AA		AB		BB		Частота аллелей, ед.		χ^2
			n	%	n	%	n	%	A	B	
Холмогорская	38	Н	19	50	16	42	3	8	0,71	0,29	0,022
		О	19,2	50,5	15,6	41,0	3,2	8,5			
Симментальская местной селекции	86	Н	35	41	44	51	7	8	0,66	0,34	1,77
		О	37,5	43,6	38,6	44,9	9,9	11,5			
Симментальская австрийской селекции	20	Н	11	55	7	35	2	10	0,73	0,27	0,29
		О	10,6	53,0	7,9	39,5	1,5	7,5			
Калмыцкая	12	Н	3	25	6	50	3	25	0,50	0,50	0,0
		О	3,0	25	6,0	50	3,0	25			

* Н – наблюдаемое и О – ожидаемое распределение генотипов.

Т а б л и ц а 2

Частота встречаемости генотипов и аллелей гена бета-лактоглобулина у коров

Порода	Кол-во голов	Распре- деление *	AA		AB		BB		Частота аллелей, ед.		χ^2
			n	%	n	%	n	%	A	B	
Холмогорская	38	Н	7	18	16	42	15	40	0,40	0,60	0,52
		О	6,1	16	18,2	47,9	13,7	36,1			
Симментальская местной селекции	86	Н	11	13	38	44	37	43	0,35	0,65	0,06
		О	10,5	12,2	39,1	45,5	36,4	42,3			
Симментальская австрийской селекции	20	Н	6	30	11	55	3	15	0,58	0,42	0,34
		О	6,7	33,5	9,7	48,5	3,6	18,0			
Калмыцкая	12	Н	-	-	4	33	8	67	0,17	0,83	0,40
		О	0.35	2.9	3.4	28.3	8.75	68.8			

* Н – наблюдаемое и О – ожидаемое распределение генотипов.

Т а б л и ц а 3

Частота встречаемости генотипов и аллелей гена пролактина у коров

Порода	Кол-во голов	Распределение *	AA		AB		BB		Частота аллелей, ед.		χ^2
			n	%	n	%	n	%	A	B	
Холмогорская	38	H	27	71	10	26	1	3	0,84	0,16	0,005
		O	26,8	70,5	10,2	26,8	1,0	2,7			
Симментальская местной селекции	86	H	56	65	28	33	2	2	0,82	0,18	0,56
		O	57,8	67,2	25,4	29,5	2,8	3,3			
Симментальская австрийской селекции	20	H	19	95	1	5	-	-	0,98	0,02	0,28
		O	19,2	96,0	0,78	3,9	0,22	0,10			
Калмыцкая	12	H	7	58	5	52	-	-	0,79	0,21	0,81
		O	7,5	62,5	3,98	33,2	0,52	4,3			

* H – наблюдаемое O – ожидаемое распределение генотипов.

согласно данным [5], являющимся менее желательным при производстве сыра, больше всего выявлено у коров симментальской породы австрийской селекции (55%) и холмогорской породы (50%). Частота аллеля A в этих популяциях составила 0,73 и 0,71 соответственно. Гетерозиготных животных по данному гену было больше у коров симментальской породы местной селекции (51%) и калмыцкой породы (50%). Желательный для производства сыра генотип BB имели 25% коров калмыцкой породы и 10% – симментальской австрийской селекции.

Расчет соответствия фактического распределения генотипов по локусу каппа-казеина теоретически ожидаемому с использованием формулы Харди–Вайнберга выявил, что во всех изученных породах сохраняется генное равновесие.

С помощью методов ПЦР-ПДРФ анализа ДНК у коров исследованных пород были обнаружены два аллеля бета-лактоглобулина – A и B (рис. 2).

Согласно данным Н.В. Федотовой, благоприятным по содержанию белка и жира в молоке

считается аллель B, а по удою – аллель A [6]. У исследованных пород по гену бета-лактоглобулину установлено, что частота аллеля B преобладает с достоверностью $p < 0,001$ у коров холмогорской породы (0,60) и симментальской породы местной селекции (0,65) и особенно у коров калмыцкой породы (0,83) (табл. 2).

У коров симментальской породы австрийской селекции по гену бета-лактоглобулину преимущественно встречались животные с генотипом AB (55%) и AA (30%). У коров калмыцкой породы преобладают животные с генотипом BB (67%) и не встречались с генотипом AA.

Расчет соответствия фактического распределения генотипов по локусу бета-лактоглобулина теоретически ожидаемому выявил, что во всех изученных породах сохраняется генное равновесие.

В изученных популяциях крупного рогатого скота выявлено два аллеля гена пролактина – A и B и три генотипа – AA, AB и BB (рис. 3).

В отношении гена пролактина было установлено, что частота аллеля A (0,79...0,98) досто-

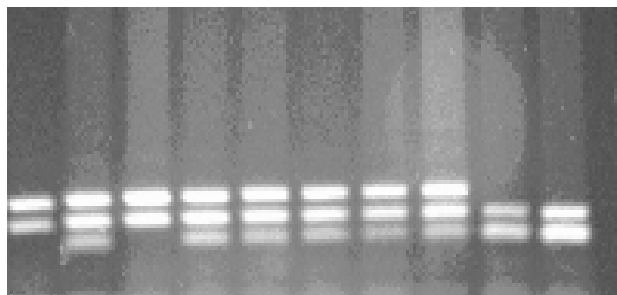


Рис. 2. Электрофореограмма результатов ПЦР-ПДРФ анализа гена бета-лактоглобулина 1,3: AA; 2, 4-8; 9; 10: BB

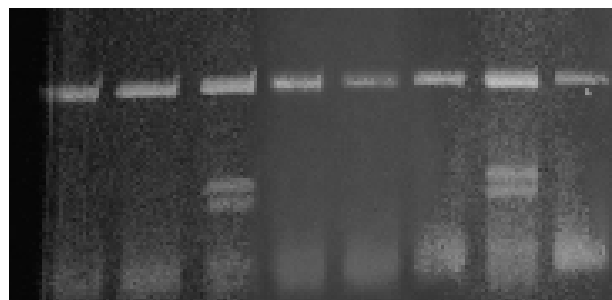


Рис. 3. Электрофореограмма результатов ПЦР-ПДРФ анализа гена пролактина 1,2,4,5,6,8: AA; 3,7: AB

верно ($p < 0,001$) преобладает над частотой аллеля В (0,02...0,21) у всех исследованных пород крупного рогатого скота (табл. 3).

Существуют межпородные различия по частоте встречаемости животных с генотипом АА. Так, у коров калмыцкой породы и симментальской породы австрийской селекции животных с генотипом АА не обнаружено. Калмыцкая порода отличается наибольшей частотой аллеля А (0,21) и наибольшей встречаемостью гетерозигот (52%).

В изученной выборке коров холмогорской породы выявлено 10 различных сочетаний генотипов $CSN/LGB/PRL$. Чаще встречаются животные с генотипом $CSN^{AB}/LGB^{BB}/PRL^{AA}$ (26,7%). Предварительные исследования молочной продуктивности показали, что животные с генотипом $CSN^{AB}/LGB^{BB}/PRL^{AA}$ имели наибольшие удои (3578 кг), а животные с генотипом $CSN^{AA}/LGB^{AB}/PRL^{AA}$ – наименьшие (2170 кг). Больше количество молочного жира отмечалось у коров с генотипом $CSN^{AB}/LGB^{BB}/PRL^{AA}$ (123,8 кг).

Расчет соответствия фактического распределения генотипов по локусу пролактина теорети-

чески ожидаемому выявил, что во всех изученных породах сохраняется генное равновесие.

При рассмотрении обобщающих показателей генетической структуры пород крупного рогатого скота Якутии получены результаты, показанные в табл. 4.

Наибольшей полиморфностью по трем генам характеризуется симментальская порода местной селекции (1,691). Самый низкий уровень полиморфности наблюдался у симментальской породы австрийской селекции (1,557). Наблюдаемая степень гетерозиготности по трем генам варьировала от 0,317 (симментальская порода австрийской селекции) до 0,426 (симментальская порода местной селекции). Показатель ожидаемой степени гетерозиготности был выше также в симментальской породе местной селекции (0,400).

Рассчитанный коэффициент инбридинга (F) показывает генетическую изменчивость популяций. В исследованных породах крупного рогатого скота наблюдается избыток гетерозигот, на что указывает рассчитанный коэффициент инбридинга по трем генам, который имеет отрицательное значение в калмыцкой породе

Таблица 4

Значение основных показателей генетической изменчивости крупного рогатого скота Якутии по генам молочности

Порода	Локус	A_e	H_o	H_e	F
Холмогорская (n=38)	Каппа-казеин	1,699	0,421	0,411	-0,024
	Бета-лактоглобулин	1,915	0,421	0,478	0,119
	Пролактин	1,362	0,263	0,266	0,010
	$M \pm m$	1,659 $\pm$ 0,161	0,368 $\pm$ 0,053	0,385 $\pm$ 0,063	0,035 $\pm$ 0,043
Симментальская местной селекции (n=86)	Каппа-казеин	1,821	0,523	0,451	-0,161
	Бета-лактоглобулин	1,833	0,442	0,454	0,027
	Пролактин	1,419	0,314	0,295	-0,062
	$M \pm m$	1,691 $\pm$ 0,136	0,426 $\pm$ 0,061	0,400 $\pm$ 0,052	-0,065 $\pm$ 0,054
Симментальская австрийской селекции (n=20)	Каппа-казеин	1,663	0,350	0,399	0,122
	Бета-лактоглобулин	1,956	0,550	0,489	-0,125
	Пролактин	1,051	0,050	0,049	-0,026
	$M \pm m$	1,557 $\pm$ 0,267	0,317 $\pm$ 0,145	0,312 $\pm$ 0,134	-0,010 $\pm$ 0,072
Калмыцкая (n=12)	Каппа-казеин	2,000	0,500	0,500	0,000
	Бета-лактоглобулин	1,385	0,333	0,278	-0,200
	Пролактин	1,492	0,417	0,330	-0,263
	$M \pm m$	1,626 $\pm$ 0,190	0,417 $\pm$ 0,048	0,369 $\pm$ 0,067	-0,154 $\pm$ 0,079

Примечание. N – количество особей; A_e – эффективное число аллелей; H_o – средняя наблюдаемая гетерозиготность; H_e – средняя ожидаемая гетерозиготность; F – коэффициент инбридинга.

Таблица 5

Значение коэффициента F-статистики Райта для популяций крупного рогатого скота исследованных пород

Локус	Fis	Fit	Fst
Каппа-казеин	-0,019	0,017	0,035
Бета-лактоглобулин	-0,028	0,065	0,090
Пролактин	-0,110	-0,065	0,040
В среднем	-0,052	0,005	0,055

Примечание. Fit – коэффициент инбридинга особи относительно большой популяции; Fis – коэффициент инбридинга особи относительно субпопуляции; Fst – коэффициент инбридинга субпопуляции относительно большой популяции.

(–0,154), симментальской породе местной (–0,065) и австрийской селекции (–0,010), а также довольно низкое положительное значение в холмогорской породе (0,035).

Использование F-статистики Райта (табл. 5) показало, что в целом у коров исследованных пород по трем изученным генам коэффициент F_{is} имеет отрицательное значение, который также указывает на смещение генетического равновесия в сторону избытка гетерозигот. Коэффициент F_{st} (0,055), отражающий пространственную дифференциацию популяций, незначителен.

Выводы

1. В изученных популяциях крупного рогатого скота Якутии выявлено два аллеля гена каппа-казеина – А и В и три генотипа – АА, АВ и ВВ. Частота встречаемости аллеля А была выше по сравнению с аллелем В и варьировала в зависимости от породы от 0,50 до 0,73. Среди исследованных пород крупного рогатого скота животных с генотипом АА больше всего выявлено в симментальской породе австрийской селекции (55%) и в холмогорской породе (50%). Частота аллеля А в этих популяциях составила 0,73 и 0,71 соответственно. Гетерозиготных животных по данному гену больше всего встречалось в симментальской породе местной селекции (51%) и в калмыцкой породе (50%). Желательный для производства сыра генотип ВВ имели 25% коров калмыцкой породы и 10% – симментальской австрийской селекции.

2. У исследованных пород по гену бета-лактоглобулину установлено, что частота аллеля В преобладает у коров холмогорской (0,60), симментальской пород местной селекции (0,65) и особенно у коров калмыцкой породы (0,83).

У коров симментальской породы австрийской селекции по гену бета-лактоглобулину преимущественно встречались животные с генотипом АВ (55%) и АА (30%). У коров калмыцкой породы преобладают животные с генотипом ВВ (67%) и не встречались с генотипом АА.

3. В отношении гена пролактина было установлено, что у всех исследованных пород крупного рогатого скота частота аллеля А (0,79...0,98) преобладает над частотой аллеля В (0,02...0,21).

4. В изученной выборке коров холмогорской породы выявлено 10 различных сочетаний генотипов $CSN/LGB/PRL$. Чаще встречаются животные с генотипом $CSN^{AB}/LGB^{BB}/PRL^{AA}$ (26,7%). Предварительные исследования молочной продуктивности показали, что животные с генотипом $CSN^{AB}/LGB^{BB}/PRL^{AA}$ имели наибольшие удои (3578 кг), а животные с генотипом $CSN^{AA}/LGB^{AB}/PRL^{AA}$ – наименьшие (2170 кг).

Большее количество молочного жира отмечалось у коров с генотипом $CSN^{AB}/LGB^{BB}/PRL^{AA}$ (123,8 кг).

5. Наибольшей полиморфностью по трем генам характеризуется симментальская порода местной селекции (1,691). Самый низкий уровень полиморфности наблюдался у симментальской породы австрийской селекции (1,557). Наблюдаемая степень гетерозиготности по трем генам варьировала от 0,317 (симментальская порода австрийской селекции) до 0,426 (симментальская порода местной селекции). Показатель ожидаемой степени гетерозиготности был выше также в симментальской породе местной селекции (0,400).

6. В исследованных породах крупного рогатого скота наблюдается избыток гетерозигот, на что указывает рассчитанный коэффициент инбридинга (F) по трем генам, который имеет отрицательное значение в калмыцкой (–0,154), симментальской породе местной (–0,065) и австрийской селекции (–0,010), а также довольно низкое положительное значение в холмогорской породе (0,035).

Литература

1. Чугунов А.В. Якутия и адаптация пород // Перспективы социально-экономического развития села. – Якутск, 2015. – С. 3–5.
2. Перчун А.В., Лазебная И.В., Белокуров С.Г. и др. Полиморфизм генов $CSN3$, $bPRL$ и bGH у коров костромской породы в связи с показателями молочной продуктивности // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 11-2. – С. 304–308;
3. Калашикова Л.А. и др. ДНК- технологии оценки сельскохозяйственных животных. – Лесные поляны: ВНИИплем, 1999. – 148 с.
4. Peakall R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539.
5. Калашикова Л.А., Труфанов В.Г. Влияние генотипа каппа-казеина на молочную продуктивность и технологические свойства молока коров холмогорской породы // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2006. – № 4. – С. 43–44.
6. Федотова Н.В., Лозовая Г.С. Полиморфизм бета-лактоглобулина и оценка молочной продуктивности черно-пестрых коров разных генотипов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – 6 (80). – С.57–60.

Поступила в редакцию 31.05.2016