УДК 575:636.082

ДИМАНЬ Т.М., д-р с.-г. наук
ДУБІН О.В., канд. с.-г. наук
ПЛІВАЧУК О.П., аспірантка
Білоцерківський національний аграрний університет

МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА ПОЛІМОРФІЗМУ QTL-ГЕНІВ В УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ХУДОБИ

Проведено аналіз генетичної структури стад української чорно-рябої молочної худоби, яка відтворюється у сільськогосподарських підприємствах Сквирського району Київської області, за 8 генами, пов’язаними з проявом ознак молочної продуктивності – капа-казеїну, бета-лактоглобуліну, лептину, гормону росту, пролактину, ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази 1, гіпофізарного фактора транскрипції Pit I, фактора транскрипції STAT5A. Для ідентифікації генотипів корів за локусами зазначених генів було використано метод ПЛР-ПДРФ. Встановлено, що генетична структура досліджених стад загалом відповідає структурі молочних порід худоби, які відтворюються в Україні. Виявлені генотипи тварин за локусами кількісних ознак свідчать про низький потенціал молочної продуктивності досліджених стад і необхідність поліпшення селекційної роботи з ними.

Ключові слова: молекулярна діагностика, QTL-гени, українська чорно-ряба молочна порода худоби, генетична структура, молочна продуктивність.

Постановка проблеми. Пошук шляхів забезпечення населення України продуктами тваринництва, не удаючись до імпорту – основна мета більшості вітчизняних наукових розробок. Традиційна селекція забезпечує невеликий селекційний ефект, який дає у високопродуктивних тварин приріст за рік на 1–3 %, що не може задовольнити потреб сьогодення. Підвищення ефективності селекції тварин сьогодні дедалі більше пов’язують з роботами у галузі ДНК-технологій, водночас одним із основних напрямів є пошук і аналіз генів, які уможливлюють маркування локусів кількісних ознак (QTL – Quantitative Trait Loci) і відбір тварин за допомогою маркерів (маркер-асоційована селекція).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Одним із методів визначення поліморфізму так званих QTL-генів є ПЛР-ПДРФ-аналіз, який вирізняється високою чутливістю, швидкістю, точністю і простотою виконання. Він дає змогу точно ідентифікувати генотипи тварин незалежно від статі, віку та фізіологічного стану і виділити серед них найбільш сприятливі для формування продуктивних ознак.

Як потенційні маркери молочної продуктивності можуть розглядатись передусім алелі генів молочних білків і гормонів. Наприклад, ген капа-казеїну пов'язаний з білковомолочністю і сиропридатністю молока; ген бета-лактоглобуліну відповідає за білковомолочність і показник біологічної цінності молока [7]; продукти гена пролактину беруть активну участь у формуванні молочної продуктивності [5]; поліморфні варіанти гена гормону росту асоціюються з показниками надою, масової частки білка та жиру [6] тощо. Ідентифікацію генів та їх мутацій, які визначають напрям і ступінь розвитку кількісної ознаки, в Україні проведено для різних порід великої рогатої худоби. У тварин молочного напряму продуктивності досліджено поліморфізм принаймні семи генів: капа-казеїну, бета-лактоглобуліну, лептину, гормону росту, пролактину, ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази 1 та гіпофізарного фактора транскрипції Pit I [1–3]. Такі дослідження дають змогу не лише отримати «генетичний портрет» тієї чи іншої популяції, а й розробити рекомендації стосовно ефективного використання стада, спрямування селекційної роботи в ньому.

Метою роботи було вивчення поліморфізму генів, пов’язаних з ознаками молочної продуктивності, в української чорно-рябої молочної худоби, яка відтворюється в господарствах Сквирського району Київської області.

Матеріали і методи досліджень. У дослідного поголів’я худоби (200 голів дійних корів) вивчали поліморфізм 8 генів: капа-казеїну (к-CN), бета-лактоглобуліну (β-LG), гормону росту

© **Димань Т.М., Дубін О.В., Пліващук О.П., 2014.**

(GH), пролактину (PRL), лептину (LEP), ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази 1 (DGAT1), гіпофізарного фактора транскрипції Pit-1, фактора транскрипції STAT5A. Ядерну ДНК з крові тварин виділяли з використанням стандартного комерційного набору «ДНК-сорб В» (Амплісенс, Росія), згідно з рекомендаціями виробника.

Генотипи тварин за локусами зазначених вище генів визначали за використання методу ПЛР-ПДРФ (полімеразна ланцюгова реакція-аналіз поліморфізму рестрикційних фрагментів) [4].

ПЛР проводили на ампліфікаторі "GeneAmp 2400" (Applied Biosystems, США), реакційна суміш мала об'єм 10 мкл.

Електрофоретичне розділення продуктів рестрикції проводили в 4%-ному агарозному гелі, їх розміри визначали, порівнюючи з маркером молекулярних мас GeneRuler 100bp (Fermentas, Литва).

Візуалізацію продуктів рестрикції здійснювали на трансілюмінаторі в УФ світлі з наступним фотографуванням електрофореграм цифровою камерою.

Частоту генотипів обчислювали за формулою:

$$P = n / N,$$

де P – частота певного генотипу;
n – кількість тварин з певним генотипом;
N – загальна кількість тварин.

Частоту окремих алелів визначали за формулою Е.К. Меркур'євої (1977):

$$P_A = (2nAA+nAB) / 2N,$$

$$Q_B = (2nBB + nAB) / 2N,$$

де P_A – частота алеля А;
Q_B – частота алеля В.

Результати досліджень та їх обговорення. За всіма дослідженими молекулярно-генетичними маркерами у корів української чорно-рябої молочної породи було виявлено поліморфізм. За локусами генів капа-казеїну, бета-лактоглобуліну, лептину та фактора Pit-1 ідентифіковано алельні варіанти А і В. Для гена гормону росту виявили алелі L і V, пролактину – А і G, DGAT1 – А і К, STAT5A – С і Т.

Дані щодо частот алелів та генотипів у дослідженій групі корів української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби наведено в таблиці 1.

Таблиця 1 – **Частоти генотипів і алелів в української чорно-рябої молочної худоби**

Локус	Генотип	Частота генотипу	Алель	Частота алеля
к-CN	AA	0,807	A	0,903
	AB	0,193	B	0,097
	BB	0,000		
β-LG	AA	0,430	A	0,630
	AB	0,400	B	0,370
	BB	0,170		
GH	LL	0,731	L	0,823
	LV	0,183	V	0,177
	VV	0,086		
PRL	AA	0,017	A	0,120
	AG	0,211	G	0,880
	GG	0,772		
LEP	AA	0,630	A	0,815
	AB	0,370	B	0,185
	BB	0,000		
DGAT1	AA	0,320	A	0,615
	AK	0,590	K	0,385
	KK	0,090		
Pit-1	AA	0,000	A	0,140
	AB	0,280	B	0,860
	BB	0,720		
STAT5A	CC	0,105	C	0,222
	CT	0,234	T	0,778
	TT	0,661		

Із таблиці 1 видно, що найбільш сприятливий для сироваріння генотип ВВ гена к-CN у досліджених тварин відсутній, алельний варіант В має низьку частоту, що є характерним для різних порід чорно-рябої худоби.

За локусом гена β-LG з більшою частотою (0,630) зустрічається алельний варіант А, який контролює високу масову частку сироваткових білків і сумарний уміст білків молока. Тимчасом варіант В пов`язують з високим умістом казеїнових білків у молоці, більшою масовою часткою жиру і кращими параметрами казеїнового коагуляту.

Генотип LV гена гормону росту у багатьох порід асоційований з високою масовою часткою жиру в молоці, VV – великими надоями. Частоти цих генотипів у досліджених тварин низькі (0,183 та 0,86 відповідно), що дає змогу спрогнозувати їх невисокий потенціал щодо жирномолочності.

У поліморфній системі гена пролактину вищою частотою вирізняється алельний варіант G (0,880), що є притаманним більшості молочних порід худоби. Згідно з даними літератури, у тварин з генотипом GG спостерігають вищі надої і масову частку білка в молоці, ніж у тварин з генотипом AG. Отже, у дослідженого поголів’я корів за локусом пролактину переважають сприятливі генотипи.

Гени LEP і DGAT1 в організмі тварин залучені до процесів метаболізму ліпідів, відтак, їх певні алельні варіанти контролюють вміст жиру в молоці корів. Так, з високими значеннями цього показника асоційовані варіант В гена LEP та варіант К (лізиновий) гена DGAT1. Як видно із таблиці 1, у досліджених корів за локусами зазначених генів переважають «нежирномолочні» генотипи.

А-алель гена Pit-1 у багатьох порід великої рогатої худоби пов’язаний з перевагами за надоєм і вищою якістю молока. У досліджених корів цей алельний варіант зустрічається рідко (частота 0,140).

Досліджене поголів’я худоби характеризується також низькою частотою (0,105) презумптивно бажаного з погляду продуктивних якостей генотипу СС у поліморфній системі гена STAT5A. Саме з цим генотипом асоційовані високий уміст жиру і білка в молоці для низки порід великої рогатої худоби.

Висновки. Таким чином, за розподілом генотипів і частотами алелів QTL-генів українська чорно-ряба молочна порода, яка відтворюється у господарствах Сквирського району Київської області, має велику подібність з іншими породами чорно-рябого генеалогічного кореня. Генетична структура досліджених стад худоби загалом відповідає структурі молочних порід України і характеризується низькими частототами алельних варіантів В за локусами генів капа-казеїну, бета-лактоглобуліну та лептину, V – гормону росту, К – ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази 1, А – фактора транскрипції Pit I та С – STAT5A, які вважають більш сприятливими для формування ознак молочної продуктивності, ніж альтернативні. Відтак, потенціал молочної продуктивності досліджених стад низький, що потребує удосконалення селекційної роботи з ними.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Копилов К.В. ДНК-діагностика генетичних ресурсів великої рогатої худоби: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. с.-г. наук: спец. 03.00.15 «Генетика» / Копилов Кирило Вячеславович. – с. Чубинське Київської області, 2011. – 36 с.

2. Аналіз генетичної структури дійних корів української чорно-рябої молочної породи агрономічної дослідної станції НАУ «Митниця» за генами, пов’язаними з проявом господарсько цінних ознак / [Малієнко В.А., Спиридонов В.Г., Новак Н.Б., Мельничук М.Д.] // Наукові доповіді НАУ. – 2008. – [Електронний ресурс]. Режим доступу: http:// www. nbuv.gov.ua/e-Journals/nd/2008-1/08mvawpt.pdf.

3. Новак Н.Б. Біотехнологічні аспекти генетичного вдосконалення показників молочної продуктивності великої рогатої худоби: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / Новак Ніна Богданівна. – К., 2010. – 23 с.

4. Методичні рекомендації щодо використання методу полімеразної ланцюгової реакції в скотарстві / [Облап Р.В., Новак Н.Б., Мельничук М.Д. та ін.]; за ред. Т.М. Димань. – Біла Церква, 2010. – 66 с.

5. New insights into the prolactin-RsaI (PRL-RsaI) locus in Chinese Holstein cows and its effect on milk performance traits / C.H. Dong, X.M. Song, L. Zhang [et al.] // Genetics and Molecular Research. – 2013. – Vol. 12 (4). – P. 5766–5773.

6. Krasnopiorova N. Growth hormone gene polymorphism and its influence on milk traits in cattle bred in Lithuania / N. Krasnopiorova, L. Baltrėnaitė, I. Miceikien // Veterinarija ir zootechnika (Vet Med Zoot). – 2012. – T. 58 (80). – P. 42–46.

7. Joint effect of CSN3 and LGB genotypes and their relation to breeding values of milk production parameters in Czech Fleckvieh / [Matejicek A., Matejickova J., Nemcova E., Frelich L.] // Czech J. Animal Sci. – 2007. – Vol. 52. – P. 83–87.

REFERENCES

1. Kopylov K.V. DNK-diagnostyka genetychnyh resursiv velykoi' rogatoi' hudoby: avtoref. dys. na zdobuttja nauk. stupenja dokt. s.-g. nauk: spec. 03.00.15 «Genetyka» / Kopylov Kyrylo Vjacheslavovych. – s. Chubyns'ke Kyi'vs'koi' oblasti, 2011. – 36 s.
2. Analiz genetychnoi' struktury dijnyh koriv ukrai'ns'koi' chorno-rjaboi' molochnoi' porody agronomichnoi' doslidnoi' stancii' NAU «Mytnycja» za genamy, pov’jazanymy z projavom gospodars'ko cinnyh oznak / [Malijenko V.A., Spyrydonov V.G., Novak N.B., Mel'nychuk M.D.] // Naukovi dopovidi NAU. – 2008. – [Elektronnyj resurs]. Rezhym dostupu: http:// www. nbuv.gov.ua/e-Journals/nd/2008-1/08mvawpt.pdf.
3. Novak N.B. Biotehnologichni aspekty genetychnogo vdoskonalennja pokaznykiv molochnoi' produktyvnosti velykoi' rogatoi' hudoby: avtoref. dys. na zdobuttja nauk. stupenja kand. s.-g. nauk: spec. 03.00.20 «Biotehnologija» / Novak Nina Bogdanivna. – K., 2010. – 23 s.
4. Metodychni rekomendacii' shhodo vykorystannja metodu polimeraznoi' lancjugovoi' reakcii' v skotarstvi / [Oblap R.V., Novak N.B., Mel'nychuk M.D. ta in.]; za red. T.M. Dyman'. – Bila Cerkva, 2010. – 66 s.
5. New insights into the prolactin-RsaI (PRL-RsaI) locus in Chinese Holstein cows and its effect on milk performance traits / C.H. Dong, X.M. Song, L. Zhang [et al.] // Genetics and Molecular Research. – 2013. – Vol. 12 (4). – P. 5766–5773.
6. Krasnopiorova N. Growth hormone gene polymorphism and its influence on milk traits in cattle bred in Lithuania / N. Krasnopiorova, L. Baltrėnaitė, I. Miceikien // Veterinarija ir zootechnika (Vet Med Zoot). – 2012. – T. 58 (80). – P. 42–46.
7. Joint effect of CSN3 and LGB genotypes and their relation to breeding values of milk production parameters in Czech Fleckvieh / [Matejicek A., Matejickova J., Nemcova E., Frelich L.] // Czech J. Animal Sci. – 2007. – Vol. 52. – P. 83–87.

Молекулярная диагностика полиморфизма QTL-генов в украинского черно-пестрого молочного скота

Т.Н. Дымань, А.В. Дубин, Е.П. Пливачук

Проведен анализ генетической структуры стад украинского чорно-пестрого молочного скота, который воспроизводится в хозяйствах Сквирского района Киевской области, по 8 генам, связанным с проявлением признаков молочной продуктивности, – каппа-казеина, бета-лактоглобулина, лептина, гормона роста, пролактина, ацил-КоА-диацилглицерол ацилтрансферазы 1, гипофизарного фактора транскрипции Pit I, фактора транскрипции STAT5A. Для идентификации генотипов коров по ло-кусам упомянутых генов был использован метод ПЛР-ПДРФ. Установлено, что генетическая структура исследованных стад в целом соответствует структуре молочных пород скота, воспроизводящегося в Украине. Выявленные генотипы животных по локусам количественных признаков свидетельствуют о низком потенциале молочной продуктивности исследованных стад и необходимости совершенствования селекционной работы с ними.

Ключевые слова: молекулярная диагностика, QTL-гены, украинская черно-пестрая молочная порода скота, генетическая структура, молочная продуктивность.

Надійшла 17.03.2014.