

УДК 636.082.2 :636.2.034

АНАЛІЗ ЗАЛЕЖНОСТІ МОЛОЧНОЇ ПРОДУКТИВНОСТІ КОРІВ ВІД ПОЛІМОРФІЗМУ ОКРЕМИХ СТРУКТУРНИХ ГЕНІВ

М. І. Гиль, доктор сільськогосподарських наук

О. В. Городна, кандидат біологічних наук

С. С. Крамаренко, кандидат біологічних наук¹

О. Ю. Сметана, асистент

Досліджено генетичну структуру групи дійних корів голштинської породи стада племзводу АТЗТ «Агро-Союз» за локусами CSN3, BLG, GH, LEP. Проаналізовано взаємозв'язок систем вищезазначених структурних генів з основними ознаками молочної продуктивності.

Голштинська худоба, ознаки молочної продуктивності, MAS-селекція, ПЛР-ПДРФ, CSN3, BLG, GH, LEP.

Сучасні генетичні підходи вдосконалення порід тварин сільськогосподарських видів базуються на детальній оцінці генотипу особин, їх генетичного потенціалу, з використанням маркер-допоміжної селекції (Marker-assisted selection - MAS) [1].

Застосування методів ДНК-технологій в європейських і американських країнах дає можливість отримувати прибуток за рахунок скорочення часу генераційного інтервалу поголів'я в процесі організації керованого відтворення та застосування MAS-селекції, тобто проводити відбір і підбір батьківських пар певних генотипів та отримувати нащадків відповідного генетичного потенціалу щодо основних показників продуктивності.

Одним із основних напрямів у цій роботі є пошук та використання ДНК-маркерів, що дозволяє мітити окремі господарсько-цінні ознаки. Дослідження тварин за генами кількісних ознак (QLT) дає можливість визначити генотип тварин та передбачити господарсько-корисні ознаки на рівні алельних варіантів генів, незалежно від статі, віку та фізіологічного

стану особин [5, 9]. На сьогоднішній день є два основних напрямки пошуку «головних» генів кількісних ознак. Перший ґрунтується на використанні поліморфізму мікросателітних локусів і припущенні про те, що досить велика їх кількість може дозволити пов'язати поліморфізм окремих з мінливістю певної ознаки і, таким чином, припустити локалізацію «головних» генів даної ознаки в ділянках хромосом відміченими такими мікросателітними локусами. В основі іншого методу лежить контроль поліморфізму структурних генів, потенційно пов'язаних з фізіологічними процесами [2].

Поряд з традиційним методом відбору тварин, селекція з використанням маркерів сприяє направленому формуванню генофондів із потрібними генними поєднаннями, що супроводжується зниженням економічних витрат на виробництво продукції [5]. Разом із тим, ефективність використання молекулярно-генетичних маркерів у селекційній роботі істотно залежить від вибору останніх і ознак, у контролі розвитку яких вони приймають участь, а також від селекційного завдання, що вирішується [2].

У наших дослідженнях обрано і досліджено чотири локуси структурних генів, з метою охопити достатній спектр їх впливу на формування молочної продуктивності. Як відомо, гени капа-казеїну (CSN3), бета-лактоглобуліну (BLG) відповідальні за синтез білків молока [7], ген лаптину (LEP) бере участь у синтезі жирів [16], а ген гормону росту (GH), окрім функції регулятора соматичного росту організму, має лактогенну та інсуліноподібну функції [15].

Метою роботи було дослідити вплив генотипів вищевказаних локусів на продуктивність голштинських корів оскільки дані попередніх вітчизняних і зарубіжних досліджень по цьому питанню суперечливі.

Матеріали і методи дослідження. Експериментальний матеріал отримано від 68 корів голштинської породи молочної стада племінного

заводу АТЗТ «Агро-Союз» Дніпропетровської області. Кров для аналізу відбирали з яремної вени, висушували на марлевій основі і дезінфікували.

Аналіз поліморфізму досліджуваних генів проводили методом ПЛР-ПДРФ [8, 11] у відділі молекулярно-генетичних та біохімічних досліджень Інституту рибного господарства НААН України. Виділення геномної ДНК проводили за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб-Б», згідно рекомендацій виробника («АмплиСенс», Росія).

Для проведення ПЛР аналізу використовували ампліфікатор «Терцик». Умови ПЛР реакції для кожного з досліджуваних генів специфічні. Використовувались праймери компанії «Синтол», Росія і Таq-полімераза виробництва «АмплиСенс», Росія.

Далі продукти ампліфікації піддавали рестрикційному аналізу. Використовували ендонуклеази рестрикції виробництва «Fermentas», Литва.

Після інкубації продукти рестрикції аналізували методом електрофорезу, який проводили у 3% агарозному гелі з використанням 1*ТАЕ буфера.

Визначення величини надою (кг), вмісту жиру (%) і білку (%) та кількості молочного жиру (кг) і білку (кг) за першу, другу, третю і вищу лактації в групах генотипів за досліджуваними локусами проводили з використанням стандартних біометричних методів. Достовірність залежності показників продуктивності від генотипів визначали використовуючи алгоритм однофакторного дисперсійного аналізу за Р. Фішером [6]. Всі розрахунки виконані з використанням програми Microsoft Office Excel 2007.

Результати досліджень. У першу чергу потрібно зазначити, що казеїни є однією з найкращих моделей у біохімічних і генетичних дослідженнях детермінації ознак молочної продуктивності свійських

тварин. Нині для гена капа-казеїну описано сім алельних варіантів, з яких найрозповсюдженіші два алелі - А і В. Існує величезна кількість даних вітчизняних і зарубіжних вчених щодо цінності цього гена [4]. На сьогоднішній день можна стверджувати, що є взаємозв'язок між технологічними властивостями молока і генотипом за капа-казеїном, оскільки останній формує оболонку довкола білкових міцел, попереджуючи їх агрегацію. Бажаним для виробництва сирів є молоко корів-носіїв генотипу ВВ [18]. Молоко отримане від таких тварин під дією сичужного ферменту згортається швидше, ніж від аналогів з генотипом АВ і тим паче - АА. Затрати сировини на одиницю продукції при виготовленні сиру з молока корів гомозиготних за алелем А збільшується на 8-10 % у порівнянні з ВВ. Така закономірність виявлена в усіх породах великої рогатої худоби, про що свідчать дані більшості досліджень отриманих у різний час певними авторами [4, 10]. В той же час отримано різні, а нерідко взаємовиключні, результати про взаємозв'язок між генотипом за локусом капа-казеїну і такими господарсько-цінними ознаками, як надій, вміст жиру і відтворювальні якості тварин [8, 11].

Наші дослідження дозволили встановити, що за локусом капа-казеїну спостерігається певний зв'язок продуктивності з конкретним генотипом (табл. 1). Зокрема, найбільшими надоями відзначились тварини з генотипами ВВ за всі лактації. Це, на нашу думку, зумовило найбільшу кількість молочного жиру і білку у цих же тварин. А ось найбільший вміст жиру і білку за другу, третю і вищу лактації мають гетерозиготні особини. За першу лактацію величини останніх ознак суттєво не відрізняються між гомо- і гетерозиготами.

Достовірність впливу генотипу за геном CSN3 на рівень молочної продуктивності не була встановлена.

1. Продуктивні показники голштинських корів різних генотипів локусу CSN3

Лактація	Генотип	n	Надій, кг	Вміст жиру, %	Кількість молочного жиру, кг	Вміст білку, %	Кількість молочного білку, кг
Перша	AA	40	7387±195	3,89±0,03	286±7	3,30±0,02	243±6
	AB	25	7380±231	3,89±0,02	287±9	3,28±0,01	242±7
	BB	2	8053±936	3,91±0,04	315±39	3,29±0,01	265±31
Друга	AA	40	8452±237	3,85±0,05	324±8	3,28±0,02	376±7
	AB	25	7858±235	3,89±0,07	304±8	3,35±0,02	263±7
	BB	2	8754±1629	3,86±0,18	339±79	3,31±0,03	290±56
Третя	AA	40	8098±281	3,95±0,07	316±9	3,27±0,04	274±9
	AB	25	8312±304	4,02±0,12	334±16	3,32±0,06	284±9
	BB	2	10147±2905	3,60±0,12	363±92	3,16±0,25	317±67
Вища	AA	40	9148±238	3,78±0,07	342±8	3,24±0,03	295±6
	AB	25	8963±290	3,82±0,10	342±16	3,27±0,04	291±8
	BB	2	10147±2905	3,60±0,12	363±92	3,16±0,25	317±67

Дослідження іншого структурного гену - бета-лактоглобуліна - відрізняє цей об'єкт тим, що продуктом його трансляції є головний сироватковий білок. Його біологічна функція, як передбачається, пов'язана з транспортом вітаміну А. Цю гіпотезу підтверджує відкриття рецепторів для комплексу BLG і ретинолу в кишечнику новонароджених телят, що сприяє засвоєнню ліпідів [11]. В наш час відомо десять алельних варіантів бета-лактоглобуліну, з яких найбільш часто зустрічаються чотири - А, В, С, D [19]. Експресію варіанту В пов'язують із високим вмістом у молоці казеїнових білків. Більшим відсотком жиру й кращими параметрами казеїнового коагуляту. Варіант А контролює високий вміст сироваткових білків і сумарний вміст білків молока. У молоці корів з генотипом АВ спостерігається перевага форми А [8, 13].

Аналіз впливу бета-лактоглобуліну на продуктивні ознаки голштинських корів виявив менш чітку взаємозалежність (табл. 2).

Продуктивні показники голштинських корів різних генотипів локусу BLG

Лактація	Генотип	n	Надій, кг	Вміст жиру, %	Кількість молочного жиру, кг	Вміст білку, %	Кількість молочного білку, кг
Перша	AA	9	7439±488	3,87±0,08	286±15	3,31±0,03	246±16
	AB	40	7178±185	3,86±0,02	277±7	3,28±0,02	235±6
	BB	19	7753±264	3,94±0,04	304±9	3,32±0,02	257±8
Друга	AA	9	9246±611	3,95±0,17	361±20	3,31±0,06	304±18
	AB	40	7979±193	3,86±0,04	307±7	3,32±0,02	264±6
	BB	19	8200±343	3,86±0,08	314±10	3,29±0,04	268±9
Третя	AA	9	8014±776	4,04±0,22	319±26	3,28±0,12	284±33
	AB	40	8285±256	3,87±0,08	317±11	3,27±0,04	276±8
	BB	19	8138±416	4,14±0,09	335±16	3,31±0,06	279±12
Вища	AA	9	9733±613	3,77±0,15	363±20	3,22±0,07	312±17
	AB	40	8838±243	3,80±0,08	333±11	3,26±0,03	286±7
	BB	19	9227±324	3,79±0,07	348±11	3,23±0,04	296±8

Так, найменшим надоем за першу, другу та вищу лактації характеризуються гетерозиготи, а найбільшим - по чергово кожен з генотипових варіантів впродовж онтогенезу. В цілому за всіма ознаками молочної продуктивності корів за першу лактацію найкращими є особини гомозиготного генотипу BB, за другу - гомозиготи AA, за виключенням вмісту білку. За третій дійний період більш цінними знову виявились генотипи BB, окрім кількості молочного білку. За вищу лактацію відсоток жиру і білку в молоці найбільший у гетерозигот, а кількість жиру і білку, як і надій - у гомозигот за алелем А. Встановлена достовірність впливу гену BLG на величину надою, кількість молочного жиру і білку за другу лактацію.

Наступний структурний ген, що досліджується, продукує гормон росту, який, в свою чергу, відіграє важливу роль у стимулюванні синтезу білків, розподілі клітин і росту організму. Крім того він проявляє лактогенну активність. Відомо, наприклад, що введення в організм тварин рекомбінантного гормону росту стимулює ріст і розвиток молочної залози і збільшує вихід молока у корів на 10-40 %, окрім того знижується рівень жиру, а також збільшується кількість м'язової тканини в туші [8, 11, 15]. Нині

відкрито чотири алельних варіанти гена соматотропіну для європейської великої рогатої худоби. Особлива увага приділяється алелям L і V, наявність яких визначається за допомогою рестриктази Alu I. Було встановлено, що молоко корів з генотипом LL містить більший відсоток жиру й білку, ніж у тварин, що мають генотип VV [3, 17].

Між поліморфізмом гену соматотропіну і продуктивністю, також, можна прослідкувати певний зв'язок (табл. 3). Так, генотипи LL характеризуються відносно високими надоями протягом оціненого онтогенезу, а за вищу лактацію - найменшими. Вміст жиру найбільший за першу і другу лактації у тварин гомозиготних за алелем V, а за третю і вищу - у гетерозиготних особин. Найбільший вміст білку протягом усіх періодів пригаманній коровам з генотипом VV. За кількістю молочного жиру і білку певних закономірностей не виявлено. Достовірності впливу генотипів за локусом GH на величину господарсько цінних ознак не встановлено.

Останній досліджений нами структурний ген відповідає за синтез гормонального білку - лептину. Цей гормон регулює жирові відкладення в організмі, а також впливає на багато інших фізіологічних процесів, наприклад стимуляцію статевого дозрівання, метаболізм глюкози, літогенез, ліполіз і термоліз [16]. Дослідники знайшли понад 20 поліморфних сайтів, з яких тільки шість знаходяться в екзонах, і лише два з них призводять до амінокислотних замін. Був встановлений зв'язок поліморфізму сайтів рестрикції з «оплатою» корму в тварин [8, 11]. Існують дослідження, які свідчать, що алель T гену лептину бажаніший, ніж алель C, оскільки перший асоційований з підвищеним вмістом жиру і білку в молоці [12, 14].

3. Продуктивні показники голштинських корів різних генотипів локусу GH

Лактація	Генотип	n	Надій, кг	Вміст жиру, %	Кількість мо- лочного жиру, кг	Вміст білку, %	Кількість мо- лочного білку, кг
Перша	LL	32	7542±205	3,86±0,02	291±8	3,29±0,02	248±7
	LV	29	7317±224	3,91±0,04	285±8	3,29±0,02	240±7
	VV	6	6933±665	3,94±0,11	271±21	3,32±0,05	230±22
Друга	LL	32	8363±235	3,89±0,06	324±8	3,29±0,03	275±7
	LV	29	8021±284	3,84±0,06	305±9	3,32±0,02	265±8
	VV	6	8462±656	3,92±0,18	332±31	3,33±0,07	282±23
Третя	LL	32	8747±267	3,92±0,08	318±11	3,33±0,04	280±9
	LV	29	8525±374	3,98±0,11	334±14	3,21±0,05	278±11
	VV	6	7172±515	3,96±0,11	282±16	3,42±0,14	262±41
Вища	LL	32	9066±225	3,77±0,07	341±9	3,26±0,03	294±6
	LV	29	9119±354	3,78±0,09	341±14	3,20±0,04	289±9
	VV	6	9115±433	3,77±0,16	344±26	3,39±0,09	308±15

Поліморфізм же лептину має інший характер зв'язку з продуктивними ознаками голштинських корів, ніж вже розглянуті структурні гени (табл. 4). Зокрема, встановлено, що гетерозиготні тварини відзначаються вищими надоями, а також кількістю молочного жиру і білку, за виключенням вищої лактації, коли максимальну кількість молочного жиру встановлено у тварин-гомозигот за 7Т. Останнє пов'язане із найбільшим вмістом жиру у цих тварин за відповідний період, а також і за третю лактацію. Більше системності не віднайдено.

4. Продуктивні показники голштинських корів різних генотипів локусу LEP

Лактація	Генотип	n	Надій, кг	Вміст жиру, %	Кількість молочного жиру, кг	Вміст білку, %	Кількість молочного білку, кг
Перша	СС	20	7003±312	3,94±0,05	275±12	3,32±0,02	232±10
	СТ	38	7591±180	3,86±0,02	293±7	3,28±0,02	249±6
	ТТ	10	7287±362	3,87±0,07	281±12	3,28±0,03	238±11
Друга	СС	20	8231±332	3,83±0,06	314±11	3,30±0,04	270±10
	СТ	38	8239±236	3,89±0,06	318±8	3,30±0,02	271±7
	ТТ	10	8047±413	3,87±0,09	312±19	3,34±0,04	269±15
Третя	СС	20	8047±471	3,87±0,11	306±14	3,30±0,06	192±32
	СТ	38	8427±240	3,97±0,09	331±9	3,28±0,05	224±19
	ТТ	10	7696±625	4,12±0,15	323±41	3,25±0,05	179±44
Вища	СС	20	9031±420	3,74±0,11	333±12	3,27±0,05	278±19
	СТ	38	9122±224	3,76±0,07	340±8	3,23±0,03	293±5
	ТТ	10	8918±524	4,00±0,17	363±38	3,27±0,05	261±34

Достовірність впливу гену LEP на продуктивність також не була встановлена.

Висновки

Таким чином, проведені нами дослідження однозначно не встановили залежності продуктивних показників корів голштинської породи від генотипів особин за розглянутими локусами. Проте за геном CNS3 тварини з генотипом ВВ мали вищу жирно-, білковомолочність та величину надоїв, а за LEP - гетерозиготи характеризувались більшими надоями.

Список літератури

1. Буркат В. П. Деякі біотехнологічні та генетичні методи при створення тварин майбутнього / В. П. Буркат, С. і. Ковтун, К. В. Копилова, К. В. Копилов II Розведення і генетика тварин : міжвід. темат. наук. зб. - К.: Аграрна наука, 2008. - Вип. 42. - С. 3-10.
2. Гиль М. І. Генетичний аналіз полігенно обумовлених та поліморфних ознак худоби молочних порід: дис. ... доктора с.-г. наук : 06.02.01 / Гиль Михайло Іванович. - К., 2007. - 656 с.
3. Долматов И. Ю. Связь полиморфизма гена соматотропина

крупного рогатого скота симментальской породы с продуктивностью / И. Ю Долматов,

А. Г. Ильясов. - Зоотехния : Теоретический и научно-практический журнал. - 2008. -№ 5. -С. 6-8.

4. Иолчиев Б. С. Взаимосвязь системы капа-казеина с молочной продуктивностью коров / Б. С. Иолчиев, В. И. Сельцов // Зоотехния: Теоретический и научно-практический журнал. - 1999. - № 6. - С. 4-5.

5. Копилова К. В. Особливості генетичної структури різних порід великої рогатої худоби за локусами кількісних ознак (QLT) / К. В. Копилова, К. В. Копилов, К. О. Арнаут // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. - К., 2009. - Вип. 138. - Режим доступу до журналу:

http://www.nbu.gov.ua/portal/chem_biol/nvnau/2009_138/09kkv.pdf

6. Лакин Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г. Ф. Лакин. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: Высш. шк., 1990. - 352 с.

7. Маринчук Г. Е. Полиморфные системы лактопротеинов крупного рогатого скота как генные маркеры молочной продуктивности: Монография / Г. Е. Маринчук. -Днепропетровск : Делита, 2007. - 262 с.

8. Методичні рекомендації щодо використання методу полімеразної ланцюгової реакції в скотарстві / Р. В. Облап, Н. Б. Новак, М. Д. Мельничук та ін. - Біла Церква, 2010. - 66 с.

9. Созинов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике / А. А. Созинов. - М.: Наука, 1985.-272 с.

10. Суюнчев О. А. Качественные показатели полутвёрдых и мягких видов сыра полученного из молока коров с разными генотипами гена капа-казеина / О. А. Суюнчев, Н. Г Марутянц, Е. Е. Абонеева / Вузовская наука - Северо-Кавказскому региону: Материалы XII региональной научно-технической конференции. - Ставрополь : СевКавГТУ, 2008. - Т. 1. - С. 200-202.

11. Харченко П. Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии / П. Н. Харченко, В. И. Глазко. - М.: Воскресенье, 2006.-480 с.

12. An association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield / F. C. Buchanan, A. G. Van Kessel, C. Waldner et. al. // Journal of Dairy Science. - 2003. - Vol. 86. - P 3164-3166.

13. Comberg G. Correlation between B-lactoglobulin types in cattle and age at first calving, milk yield and fat contents / G. Comberg, M. Growing //Animal Genetics - 1994 - Vol. 36. - P. 248.

14. Effect of leptin gene polymorphism on the breeding value of milk production traits in Iranian Holstein / M. Sadeghi, M. Moradi Shahr Babak, G. Rahimi, A. Nejati Javaremi // Animal. - 2008. - Vol. 2. - № 7. - P. 999-1002.

15. Etherton T. D. Biology of somatotropin in grows and lactation of domestic animals / T. D. Etherton, D. E. Bauman // Physiological Reviews. - 1998. Vol. 78. - p. 745-761.

16. Houseknecht K. L. The biology of leptin - a review / K. L. Houseknecht, C. A. Baile, R. L. Matteri, M. E. Spurlok // Journal of Animal Science. - 1998. - Vol. 76. - p. 1405-1420.

17. Lusy M Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production / M. Lusy, S. Hause, P. Eppardo II Domestic Animal Endocrinology. - 1993. - Vol. 4. - P. 325-333.

292

18. Marzialli A. S. Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk / A. S. Marzialli, K. F. Ng-Kwai-Hang // Journal of Dairy Science. - 1986. - Vol. 69. - P 1793-1798.

19. Medrano J. Genotyping of bovine BLG loci following DNA sequence amplification / J Medrano, E. Aguilar-Cordova // Biotechnology. - 1990. - Vol. 8. - P. 144-165.

Исследована генетическая структура группы дойных коров голштинской породы стада племзавода АОЗТ «Агро-Союз» по локусам CSN3,

BLG, GH, LEP. Проанализирована взаимосвязь систем вышеуказанных структурных генов с основными признаками молочной продуктивности.

Гопштинский скот, признаки молочной продуктивности, MAS-селекция, ПЦР-ПДРФ, CSN3, BLG, GH, LEP.

The genetic structure of Holstein cows' of breeding farm JSC «Agro-Soyuz» by CSN3, BLG, GH, LEP loci was research. The interdependence between above structure genes and milk production traits was analyzed.

Holstein livestock, milk production traits, marker-assistant selection, PCR-RFLP, CSN3, BLG, GH, LEP.