
ТВАРИННИЦТВО, КОРМОВИРОБНИЦТВО, ЗБЕРЕЖЕННЯ ТА ПЕРЕРобКА СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ ПРОДУКЦІЇ

ЖИВОТНОВОДСТВО, КОРМОПРОИЗВОДСТВО,
ХРАНЕНИЕ И ПЕРЕРАБОТКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

ANIMAL HUSBANDRY, FEED PRODUCTION,
STORAGE AND PROCESSING OF AGRICULTURAL PRODUCTS

УДК 575.113:63.27.082(477)

DOI <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2019.109-2.1>

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦІЇ КОРІВ УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ ЗА ЛОКУСАМИ ПРОЛАКТИНУ ТА ПЛАЦЕНТАРНОГО ЛАКТОГЕНА

Альшамайлех Х. – аспірант кафедри біології тварин,
Національний університет біоресурсів і природокористування України
Кулібаба Р.О. – д.с.-г.н., с.н.с., завідувач лабораторії
молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві,
Інститут тваринництва Національної академії аграрних наук України

Проведено аналіз генетичної структури популяції тварин української чорно-рябої молочної породи за локусами пролактину та плацентарного лактогена. Із використанням методу ПЛР з подальшим рестрикційним аналізом (ПЛР-ПДРФ – Полімеразна Ланцюгова Реакція – Поліморфізм Довжин Рестрикційних Фрагментів) проаналізовано поліморфізм генів пролактину та плацентарного лактогена. У дослідній групі корів локус пролактину за *RsaI*-поліморфізмом у четвертому екзоні виявився поліморфним. У групі тварин з найбільшою частотою виявлено особин з генотипом *CC* (0,42); за найменшою – з генотипом *TT* (0,23). Частота алеля *C* становила 0,6; алеля *T* – 0,4; значення фактичної та очікуваної гетерозиготності становили 0,35 та 0,48, відповідно. За результатами досліджень з'ясовано, що у дослідній популяції значення показника індексу фіксації Райта становило 0,27, що вказує на суттєвий дефіцит гетерозиготних особин (надлишок гомозигот), тобто інбридинг популяції, що може бути пов'язано з особливостями селекційної роботи з великою рогатою худобою у дослідній групі тварин. Значення показника ефективної кількості алелів становило 1,92. За результатами аналізу встановлено, що за розподілом частот генотипів та алелів дослідна група корів є перспективною для проведення досліджень з аналізу асоціативного зв'язку різних алельних варіантів гена пролактину з показниками продуктивності тварин. За значенням частот алелів та генотипів дослідна група тварин перебуває у стані генетичної рівноваги, що свідчить про відсутність дії добору на рівні маркерних алелів. Локус плацентарного лактогена за *RsaI*-поліморфізмом у п'ятому екзоні у дослідній популяції виявився монорфним. У наявності лише особини з геноти-

ном CC (RsaI/RsaI-), що призводить до неможливості його використання у подальших селекційних програмах на дослідній популяції корів.

Ключові слова: велика рогата худоба, популяція, поліморфізм, локус, ген, алель, пролактин, плацентарний лактоген, мінливість.

Alshamaileh H., Kulibaba R.O. The population genetic structure of the Ukrainian Black-Pied cattle breed by prolactin and placental lactogen loci

The analysis of the Ukrainian Black-Pied cattle population genetic structure by prolactin and placental lactogen loci was conducted. With using of PCR-RFLP method (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) the polymorphism of prolactin and placental lactogen genes was analyzed. In the experimental group of cows, the prolactin locus was polymorphic by the RsaI-polymorphism in the fourth exon. In the population of animals the highest frequency was detected for genotype CC (0.42) and the lowest – for TT (0.23). The frequency of C allele was 0.6; allele T – 0.4; the obtained and expected heterozygosity indexes were 0.35 and 0.48, respectively. According to analysis results, the fixation index was 0.27 in the experimental population, that indicates on expressed deficiency of heterozygotes (excess of homozygotes) or population's inbreeding and perhaps relates with specifics of selection work in this population. The effective alleles' number was 1.92. The experimental group of cows is perspective for investigating of different allele variants association with animal's productivity traits by the results of the analysis for the distribution of genotype and allele frequencies. According to the frequency values of alleles and genotypes, the experimental population is in a state of genetic equilibrium, that indicates on the absence of action of selection on marker alleles' level. The locus of the placental lactogen by the RsaI-polymorphism of the fifth exon in the studied population was monomorphic. There were only individuals with the genotype CC (RsaI- / RsaI-) detected in the experimental group, that lead to impossibility of placental lactogen usage in further breeding programs.

Key words: cattle, population, polymorphism, locus, gene, allele, prolactin, placental lactogen, variability.

Постановка проблеми. Ефективна селекційна робота в галузі тваринництва забезпечується виконанням низки умов, до найважливіших з яких належить необхідність використання сучасних даних з генетичного різноманіття дослідних популяцій тварин. Саме сучасна генетика і є необхідним фундаментом ефективної селекції у різних галузях тваринництва – починаючи з птахівництва та закінчуючи кролівництвом [1, с. 1044]. Колективи закордонних учених уже досить давно використовують досягнення молекулярної генетики для використання у маркер-асоційованій селекції великої рогатої худоби різних порід, що й дало можливість досягти вагомих показників продуктивності тварин [2, с. 126].

Україна у цьому контексті дещо відстає від наявних тенденцій, що й визначає актуальність проведення досліджень в обраному напрямі, особливо враховуючи питання щодо загальної ефективності ведення вітчизняного аграрного сектору.

Першим кроком на шляху до реалізації маркер-асоційованої селекції великої рогатої худоби є первинне вивчення особливостей генетичної структури дослідних популяцій тварин. Саме визначення рівня генетичної мінливості популяцій дасть змогу обрати потенціальні мішені для подальших досліджень (пошук асоційованого зв'язку різних алельних варіантів функціональних генів з показниками продуктивності тварин) [3, с. 1]. До одних із найбільш перспективних генів-кандидатів у цьому контексті належать локуси пролактину та плацентарного лактогена. Розглянемо їх більш детально.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Пролактин є одним із найважливіших гормонів, які беруть участь у регуляції великої кількості загальних фізіологічних функцій організму, таких як ріст та диференціювання тканин та систем органів, регуляція імунної та репродуктивної функцій тощо [4, с. 54; 5, с. 124]. За останні два десятиріччя у популяціях різних порід великої рогатої худоби виявлено низку мутацій, деякі з яких безпосередньо пов'язані з проявом продуктив-

них ознак тварин [6, с. 1384; 7, с. 158; 8, с. 7338]. Так, наприклад, до найбільш вагомих належать мутації у різних функціональних ділянках гена (поліморфізм промоторної ділянки гена та в першому інтроні, RsaI-поліморфізм у третьому та п'ятому екзонах) [9, с. 167; 10, с. 179; 11, с. 4797]. За кожною з наведених мутацій визначено не лише різні алельні варіанти, але й проаналізований зв'язок з проявом господарсько-корисних ознак тварин, що безпосередньо дає можливість використання локусу пролактину у селекційній роботі.

Ген плацентарного лактогена, на відміну від пролактину, вивчено меншою мірою, однак, незважаючи на цей факт, у ньому також виявлено перспективні маркерні мутації (алелі). Так, наприклад, виявлено поліморфізм у першому інтроні, а також у другому (NT7409(T-C), Nt11246(G-A)) та четвертому екзонах [12, с. 1]. Встановлено зв'язок різних алельних варіантів за визначеними мутаціями з показниками молочної продуктивності тварин [13, с. 650].

Постановка завдання. Мета досліджень – вивчити генетичну структуру дослідної групи великої рогатої худоби української чорно-рябої молочної породи за поліморфізмом локусів пролактину та плацентарного лактогена.

Дослідження проводили у лабораторії молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН.

Для проведення досліджень було використано групу тварин великої рогатої худоби української чорно-рябої молочної породи (дослідне господарство Харківського району Харківської області).

Джерелом біологічного матеріалу використовували волосяні цибулини. Виділення ДНК із дослідних зразків проводили з використанням комерційного набору реагентів «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Росія).

Для ампліфікації екзонних частин генів *bPRL* та *bPL* застосовували праймери, розроблені на основі аналізу нуклеотидної послідовності в генбанку (NCBI, Ensembl) та з використанням програм FastPCR v6.5.54, PerlPrimer v1.1.21.

Послідовність олігонуклеотидів для локусу пролактину:

F. – GTTCTTGCTTTATGTAACACCG;

R. – TAGGTCATCACTCTGAGCA [Кулібаба Р.О., Ляшенко Ю.В. стаття у друці];

для локусу плацентарного лактогена:

F. – TTTGGGTGCTTAGGTTTCATCC;

R. – ATCATCACTAACCATCTCAGGAC [Кулібаба Р.О., Ляшенко Ю.В. стаття у друці].

Ампліфікацію проводили з використанням відповідних програм: 1 цикл – денатурація 94°C (3 хв); 35 циклів – денатурація 94°C (45 с), відпал 45 с (56°C для локусу пролактину та 58°C для локусу плацентарного лактогена), елонгація 72°C (45 с); 1 цикл – фінальна елонгація 72°C (10 хв). Об'єм кінцевої суміші становив 20 μ L, концентрація праймерів – 0,2 мкМ у кожному випадку.

Продукти ампліфікації розділяли у агарозних гелях (концентрація 1,5%). Візуалізацію проводили з використанням бромистого етидію в ультрафіолетовому спектрі. Розмір ампліфікаційних фрагментів визначали з використанням маркера молекулярних мас М-50 (Ізоген, Росія).

Генотипування за кожним із локусів проводили за допомогою аналізу отриманих електрофореграм.

На основі отриманих даних розраховували фактичний (O) та теоретичний розподіл генотипів (E), частоти генотипів і алелів, фактичну (H_o) й очікувану (H_e) гетерозиготність відповідно до загальноприйнятих методик [14, с. 167].

Виклад основного матеріалу дослідження. Проведення запланованих досліджень з використанням ПЛР та рестрикційного аналізу дало змогу виявити поліморфізм локусу пролактину у дослідній групі тварин. Алельні варіанти гена PRL, що виникають у результаті RsaI-поліморфізму екзонної ділянки, представлені на електрофореграмі продуктів рестрикції у вигляді окремих фрагментів, розмір яких визначається за допомогою маркера молекулярних мас (M-50).

За RsaI-поліморфізмом четвертого экзону гена PRL (транзиція С/Т у положенні 35106206) виявлені всі можливі варіанти генотипів – СС, СТ та ТТ. Генотип СС представлений на електрофореграмі фрагментами 56 та 360 п.н.; генотип ТТ – 56, 165 і 195 п.н.; СТ – 360, 195, 165 та 56 відповідно. Розмір амплікону становив 416 п.н. Слід підкреслити, що наявність мономорфного сайту рестрикції, що є характерним для кожного з алелів та призводить до появи фрагмента розміром 56 п.н., є додатковим плюсом цієї маркерної системи, оскільки дає змогу запобігти помилкам, що виникають внаслідок недостатньої ефективності рестрикції ампліконів (тобто поява на електрофореграмах вихідного фрагмента, амплікону може відбуватися за рахунок не досить ефективної роботи ендонуклеази рестрикції, але у цьому разі це жодним чином не перешкоджає ефективності генотипування).

Генетичну структуру дослідної популяції великої рогатої худоби представлено в таблиці.

Таблиця 1

Генетична структура дослідної популяції тварин за локусом PRL

Генотипи	Показники		
	О	Е	χ^2
СС	13	11,16	2,16
СТ	11	14,88	
ТТ	7	4,96	
Алелі	Частоти алелів		
С	0,6		
Т	0,4		

Примітка: О – фактично виявлена кількість особин такого генотипу; Е – теоретично очікувана кількість особин такого генотипу.

За результатами досліджень з'ясовано, що у дослідній групі ВРХ за локусом пролактину переважають особини з генотипом СС. При цьому частка гетерозигот також досить висока й становить 35%. Особин з генотипом ТТ виявлено 23% від загальної кількості протипованих тварин. Частоти алелів С і Т у дослідній популяції становили 0,6 та 0,4 відповідно. Слід зазначити, що дослідна популяція тварин перебуває у стані генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, що, своєю чергою, свідчить про відсутність дії добору на рівні дослідних локусів.

Значення фактичної гетерозиготності (H_o) у дослідній групі тварин становило 0,35; що, своєю чергою, суттєво відрізняється від значення очікуваної гетерозиготності (H_e) – 0,48. Суттєва різниця у показниках H_o і H_e призводить до вираженого позитивного значення індексу фіксації (F_{is}), що дорівнює 0,27. Значення F_{is} вказує на суттєвий дефіцит гетерозиготних особин (або надлишок гомозигот), тобто інбридинг популяції, що може бути пов'язано з особливостями селекційної роботи з великою рогатою худобою у дослідній групі. Рівень поліморфності досліджуваного локусу, що визначається значенням кількості ефективних алелів

(n), досягає майже свого максимально можливого для двохалельних систем значення й становить 1,92.

Своєю чергою наявна у дослідній популяції великої рогатої худоби ситуація стосовно поліморфізму локусу плацентарного лактогена суттєво відрізняється від вищезазначеної. Так, відповідно до використовуваних праймерів та баз даних нуклеотидних послідовностей GenBank, розмір ампліфікованого фрагмента *bPL* становить 239 п.н. При цьому за мутацією, що аналізується (RsaI-поліморфізм у п'ятому екзоні), після проведення рестрикції амплікону різні алелі відповідають фрагментам 239 п.н. для алеля С (RsaI-); 65 і 174 п.н. для А (RsaI+) відповідно. Однак за результатами проведених досліджень у популяції виявлені тільки гомозиготні за алелем С (RsaI-) особини (з генотипом RsaI-/RsaI-), тобто за цим поліморфізмом локус плацентарного лактогена виявився мономорфним. Відповідно, й визначення параметрів генетичної мінливості у цьому разі неможливе. Мономорфний характер локусу *bPL* підтверджується даними, отриманими на інших популяціях тварин [Кулібаба Р.О., Ляшенко Ю.В., стаття у друці].

Результати досліджень є першою ланкою у запланованій науково-дослідній роботі із забезпечення використання сучасних ДНК-технологій у селекції великої рогатої худоби. Початковий вибір мішеней для аналізу, заснований як на літературних джерелах, так й на розумінні фізіологічної ролі продуктів обраних генів, дав змогу виділити загальні і з цих позицій одні з найбільш цікавих об'єктів досліджень. У сучасних умовах розвитку науки відбір нових, ефективних локусів, алельні варіанти яких так або інакше пов'язані з господарсько-корисними ознаками тварин, – це практично єдиний шлях, що й забезпечує новизну та актуальність тематики досліджень. Своєю чергою подальший генетико-популяційний аналіз обраних генів-кандидатів – це необхідна стадія, на якій базується вся подальша робота. У представлений публікації ми розглянули питання визначення поліморфізму двох локусів – *bPRL* та *bPL*. Перспективи подальших досліджень полягають у продовженні роботи з дослідною групою тварин, розширенні спектра генів-кандидатів, а також переходу до наступної, практично ключової стадії завдання в цілому – вивчення зв'язку різних алельних варіантів виявлених поліморфних локусів з показниками продуктивності. Успішне завершення розпочатих досліджень дасть змогу підвищити ефективність селекції, що проводиться, та використовувати у племінній роботі різні комплексні генотипи на основі сучасних ДНК-технологій.

Висновки і пропозиції. За результатами проведених досліджень з'ясовано, що у дослідній популяції великої рогатої худоби української чорно-рябої породи локус пролактину за RsaI-поліморфізмом у четвертому екзоні є поліморфним. Частота алеля С становила 0,6; алеля Т – 0,4. Дослідна група тварин перебуває у стані генетичної рівноваги. Встановлено, що за розподілом частот генотипів дослідна група корів є перспективною для проведення досліджень з аналізу асоціативного зв'язку різних алельних варіантів гена пролактину з показниками продуктивності тварин. Виявлено, що локус плацентарного лактогена за RsaI-поліморфізмом у п'ятому екзоні є мономорфним у дослідній популяції тварин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17, № 4/2. С. 1044–1054.
2. Глазко В.И. Генотипная селекция крупного рогатого скота: исследовательские и прикладные задачи. *Известия ТСХА*. 2011. Вып. 5. С. 126–135.

3. Montaldo H.H., Meza-Herrera C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Journal of Biotechnology*. 1998. Vol. 1, No 2. P. 1–7.
 4. Echeverri J., Saldamando C.I., López-Herrera A. Genetic structure analysis of a Holstein cow population in Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 2015. No 28. P. 54–63.
 5. Sonmez Z, Ozdemir M. Prolactin-RsaI gene polymorphism in East Anatolian Red cattle in Turkey. *South African Journal of Animal Science*. 2017. Vol. 47, No 2. P. 124–129.
 6. He F., Sun D., Yu Y., Wang Y., Zhang Y. Association between SNPs within prolactin gene and milk performance traits in Holstein dairy cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 2006. Vol 19, No 10. P. 1384–1389.
 7. Alipanah M., Kalashnikova L., Rodionov G. Association of prolactin gene variants with milk production traits in Russian Red Pied cattle. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2007. Vol. 5, No 3. P. 158–161.
 8. Alfonso E., Rojas R., Herrera J.G., Ortega M.E., Lemus C., Cortez C., Ruiz J., Pinto R., Gómez H. Polymorphism of the prolactin gene (PRL) and its relationship with milk production in American Swiss cattle. *African Journal of Biotechnology*. 2012. Vol. 11, No 29. P. 7338–7343.
 9. Patel J.B., Chauhan J.B. Polymorphism of the prolactin gene and its relationship with milk production in Gir and Kankrej cattle. *J. Nat Sc Biol Med*. 2017. No 8. P. 167–170.
 10. Brym P., Kaminski S. Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits. *J. Appl. Genet*. 2005. Vol. 45 (2), P. 179–185.
 11. Mehmannaavaz Y., Amirinia C., Bonyadi M., Torshizi R.V. Effects of bovine prolactin gene polymorphism within exon 4 on milk related traits and genetic trends in Iranian Holstein bulls. *African Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 8 (19), P. 4797–4801.
 12. Zhang J., Sun D.X., Womack J.E., Wang Y.C., Yu Y., Liu R., Zhang Y. Polymorphism identification, RH mapping and association of placental lactogen gene with milk production traits of dairy cows. *Animal*. 2009. Vol. 3, No 1. P. 1–5.
 13. Mahmoudzadeh M., Torbati M.B.M., Farhangfar H., Omid A. Study of Placental Lactogen gene polymorphism and its association with milk production traits in the Holstein cows. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2014. Vol. 2, No 3. P. 650–658.
 14. Меркурьева Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве. Москва : Колос, 1977. 240 с.
-