УДК 636.2.082.2:636.034(476)

ВЛИЯНИЕ ГЕНОВ СОМАТОТРОПИНА (GH) И ДИАЦИЛГЛИЦЕРОЛ-О-АЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ 1 (DGAT1) НА ПОКАЗАТЕЛИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КОРОВ БЕЛОРУССКОЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ

А. Н. МИХАЛЮК, Л. А. ТАНАНА, О. А. ЕПИШКО

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь, 230008, e-mail: alex-vet@mail.ru

(Поступила в редакцию 17.02.2021)

В работе представлены результаты изучения полиморфизма генов соматотропина (GH) и диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1), влияющих на показатели молочной продуктивности коров белорусской черно-пестрой породы. Объектом исследований являлись крупный рогатый скот и биологический материал (ушной выщип) коров белорусской черно-пестрой породы, содержащихся в УСП «Новый Двор-Агро» Свислочского района Гродненской области.

ДНК-генотипирование животных по генам соматотропина (GH) и диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1) проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

В результате проведенных исследований популяции коров белорусской черно-пестрой породы установлен полиморфизм гена соматотропина (GH), представленный двумя аллелями – GH^L и GH^V, при этом идентифицировано три генотипа GH^{LL}, GH^{LV} и GH^{VV}. Среди опытных животных чаще встречались особи с генотипами GH^{LL} – 71 %, GH^{LV} – у 27 %, а GH^{VV} лишь у 2 % коров. Изучаемая группа животных по гену диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1) была мономорфна, все животные имели предпочтительные генотипы $DGAT1^{KK}$, что вероятно связано с ведением целенаправленной селекции на закрепление признаков молочной продуктивности. Результаты проведенных исследований по изучению влияния генов соматотропина (GH) и диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1) на показатели молочной продуктивности коров белорусской черно-пестрой породы показали, что по удою за 305 дней лактации в большинстве случаев животные с генотипом GH^{LV} превосходили своих сверстниц GH^{LL} и GH^{LL} на 2,7–5,0 %. Вместе с тем по жирно-и белковомолочности гомозиготные особи GH^{LL}, превосходили своих сверстниц двух других генотипов на 0,16–0,30 п.п., а в некоторых случаях по количеству молочного жира и белка в молоке на 2,6–15,9 %. Оценка показателей молочной продуктивности по гену диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1) по трем лактациям свидетельствует о том, что наиболее высокие показатели молочной продуктивности были у коров второй лактации.

Ключевые слова: *ген соматотропина (GH), ген диацетил глицерол О-ацил трансферазы 1 (DGAT1), молочная продуктивность, крупный рогатый скот.*

The paper presents results of studying the polymorphism of somatotropin (GH) gene and diacylglycerol-O-acyltransferase 1 (DGAT1) gene, which affect the milk productivity of cows of Belarusian black-and-white breed. The object of research was cattle and biological material (ear pinch) of cows of Belarusian black-and-white breed, contained in the farm "Novy Dvor-Agro" of Svisloch district of Grodno region.

DNA genotyping of animals for somatotropin (GH) gene and diacylglycerol-O-acyltransferase 1 (DGAT1) gene was performed using the polymerase chain reaction (PCR) method and restriction fragment length polymorphism (RFLP).

As a result of the studies of the population of Belarusian black-and-white cows, polymorphism of the somatotropin (GH) gene was established, represented by two alleles – GH^L and GH^V, while three genotypes were identified: GH^{LL}, GH^{LV} and GH^{VV}. Among the experimental animals, individuals with GH^{LL} genotypes were more common – 71 %, GH^{LV} – in 27 %, and GH^{VV} – in only 2 % of cows. The study group of animals was monomorphic for the diacylglycerol-O-acyltransferase 1 (DGAT1) gene; all animals had preferred $DGAT1^{KK}$ genotypes, which is probably associated with targeted selection for the fixation of milk productivity traits. The results of research into the influence of somatotropin (GH) gene and diacylglycerol-O-acyltransferase 1 (DGAT1) gene on the milk productivity of Belarusian black-and-white cows showed that in most cases the animals with GH^{LV} genotype exceeded in milk yield in 305 days of lactation their peers with GH^{LL} and GH^{LL} by 2.7–5.0 %. At the same time, homozygous GH^{LL} individuals surpassed their counterparts of the other two genotypes by 0.16–0.30 pp in terms of milk fat and protein content, and in some cases according to the amount of milk fat and protein in milk by 2.6–15.9 %. Evaluation of milk productivity indices according to diacylglycerol-O-acyltransferase 1 (DGAT1) gene for three lactations indicates that the highest milk productivity indices were in the second lactation cows.

Key words*: somatotropin (GH) gene, diacylglycerol-O-acyltransferase 1 (DGAT1) gene, milk productivity, cattle.*

Введение

За последние 15–20 лет в Республике Беларусь практически в два раза увеличилась молочная продуктивность коров и, как результат – валовое производство молока. Это позволило значительно нарастить объемы производства молочной продукции, большая часть которой поставляется на экспорт, обеспечивая поступление в стану валютной выручки. Кроме того, молоко или как его еще называют «белое золото», обеспечивает продовольственную безопасность нашей страны. Учитывая вышесказанное, актуальной проблемой в настоящее время является поиск и выявление перспективных генов-маркеров, а также изучение информации о полиморфизме маркеров, обуславливающих хозяйственно полезные признаки молочной продуктивности животных и позволяющих вести целенаправленную селекционную работу по наиболее ценным показателям.

Одним из наиболее важных генов липидного обмена является ген диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1). Локус количественного признака (QTL), влияющий на процентное содержание жира в молоке был картирован на хромосоме 14 в геноме *Bos taurus* как маркер, влияющий на качество молока. Анализ последовательности нуклеотидов позволил идентифицировать последовательность как структурную геномную область гена DGAT1, который кодирует ацилCoA-диацилглицерин-ацилтрансферазу1. Аллельный вариант K ассоциирован с повышенным содержани-

ем жира, в то время как вариант А ассоциирован – с высокими удоями [1, 2, 3]. Ген гормона роста (GH) — важнейший регулятор соматического роста животных, обладающий, в том числе лактогенным и жиромобилизующим действием. У крупного рогатого скота ген гормона роста локализован на 19-й хромосоме и состоит из пяти экзонов и четырёх интронов. Установлена связь различных полиморфных вариантов гена GH с ростом и молочной продуктивностью (удой, содержание жира и белка в молоке) [4, 5].

В этой связи целью наших исследований явилось изучение влияния генов соматотропина (GH) и диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT 1) на показатели молочной продуктивности коров белорусской черно-пестрой породы.

Основная часть

Объектом исследований являлись крупный рогатый скот и биологический материал (ушной выщип) коров белорусской черно-пестрой породы, содержащихся в УСП «Новый Двор-Агро» Свислочского района Гродненской области в количестве 105 проб.

Генотипирование животных по генам соматотропина (GH) и диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT 1) проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Ядерную ДНК выделяли перхлоратным методом. Основные растворы для выделения ДНК, амплификации готовили по Т. Маниатису, Э. Фрич, Дж.Сэмбруку [6].

Для амплификации участков генов GH и DGAT1 использовали праймеры:

GH 1: 5' CCG TGT CTA TGA GAA GC 3'

GH 2: 5' GTT CTT GAG CAG CGC GT 3'

DGAT1 1: 5' CAC CAT CCT CTT CCT CAA GC 3'

DGAT1 2: 5' ATG CGG GAG TAG TCC ATG TC 3'

Реакционная смесь для проведения амплификации по генам соматотропина (GH) и диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT 1) состояла из:

Компоненты:	Концентрация на 1 пробу:
1 х Taq-буфер	1 х
50 мМ $MgCl_2$	2–5 мМ
Смесь дНТФ	2–4 мМ
Праймер 1	10–25 пМ
Праймер 2	10–25 пМ
Taq-полимераза	0,5–1,5 е.а.
ДНК	0,5–1 мкл
H_2O	до 25 мкл

ПЦР-программа GH:– 94°С, 4 мин.; 35 циклов – 94°С, 45 с.; 65°С, 45 с.; 72°С, 45 с.; достройка или финальная элонгация – 72°С, 7 мин. Концентрацию и специфичность амплификата оценивали электрофоретическим методом в 2 % агарозном геле при напряжении 120 В, 50–60 мин. Длина амплифицированного фрагмента гена GH составила 223 п.о. Для рестрикции амплифицированного участка гена GH применяли эндонуклеазу AluI. Реакцию проводили при температуре 37 ºС. Продукты рестрикции генов разделяли электрофоретически в 3 % агарозном геле при напряжении 130 В, 50–60 мин, в 1×TBE буфере. Визуализацию фрагментов проводили при УФ-свете на системе гельдокументирования Gel Doc RX+(BIORAD) с использованием бромистого этидия. При расщеплении продуктов амплификации гена GH рестриктазой идентифицировались генотипы: GH^{LL} –208 п.н.; GH^{LV} – 208/172/35 п.н.; GH^{VV} – 172/35 п.н. (рис.1).

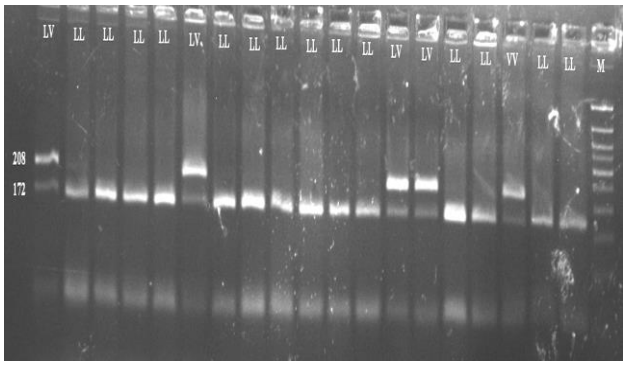

Рис. 1. Электрофореграмма рестрикционного анализа гена GH

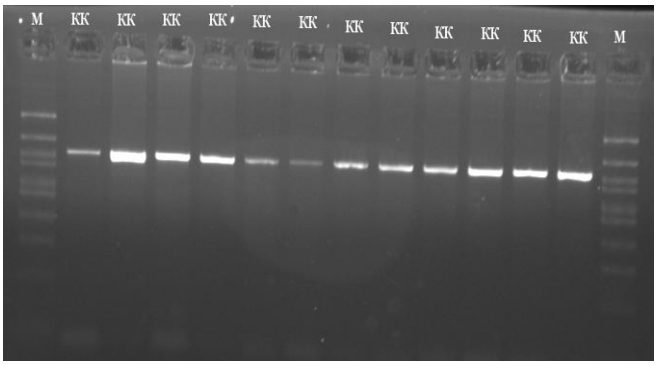

Рис. 2. Электрофореграмма рестрикционного анализа гена DGAT1

ПЦР-программа DGAT1:– 94°С, 5 мин.; 30 циклов – 94°С, 30 с.; 59°С, 40 с.; 72°С, 40 с.; достройка или финальная элонгация – 72°С, 7 мин. Концентрацию и специфичность амплификата оценивали

электрофоретическим методом в 2 % агарозном геле при напряжении 120 В, 50–60 мин. Длина амплифицированного фрагмента гена DGAT1 составила 411 п.о. Для рестрикции амплифицированного участка гена DGAT1 применяли эндонуклеазу AcoI. Реакцию проводили при температуре 37 ºС. Продукты рестрикции генов разделяли электрофоретически в 3 % агарозном геле при напряжении 130 В, 50–60 мин, в 1×ТВЕ буфере. Визуализацию фрагментов проводили при УФ-свете на системе гельдокументирования Gel Doc RX+(BIORAD) с использованием бромистого этидия. При расщеплении продуктов амплификации по гену DGAT1 идентифицировался генотип: $DGAT1^{KK}$ – фрагмент 411 п.н. (рис. 2).

Для изучения молочной продуктивности подопытные животные белорусской черно-пестрой породы были сгруппированы в зависимости от возраста: первотелки, коровы второго и третьего отелов. Молочную продуктивность коров определяли по результатам контрольных доений. В статистическую обработку включали показатели по животным, продолжительность лактации у которых была не менее 240 дней. У животных с различными генотипами по изучаемым генам учитывали удой, массовую долю жира и белка, выход молочного жира и белка за 305 дней лактации или укороченную лактацию.

Селекционно-генетические параметры основных хозяйственно полезных признаков обработаны методом вариационной статистики с применением компьютерной техники и прикладных программ, входящих в стандартный пакет Microsoft Office.

Большое значение для создания стад с более высокими качественными показателями молока является характеристика генофонда крупного рогатого скота по полиморфизму генов, связанных с показателями молочной продуктивности животных. В результате проведенных исследований популяции коров белорусской черно-пестрой породы установлен полиморфизм гена соматотропина (GH), представленный двумя аллелями – GH^{L} и GH^{V}, при этом идентифицировано три генотипа GH^{LL}, GH^{LV} и GH^{VV}. Среди опытных животных чаще встречались особи с генотипами GH^{LL} – 71 %, GH^{LV} – у 27 %, а GH^{VV} лишь у 2 % коров. В отношении гена диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1) результаты исследований показали, что все животные имели лишь один генотип – $DGAT1^{KK}$ т.е. по данному гену отсутствовал полиморфизм. Литературные данные (Grisart B.2002) указывают на то, что генотип $DGAT1^{KK}$ является наиболее желательным, т. к. коровы, имеющие данный генотип, производят более жирное молоко, чем коровы с генотипами $DGAT1^{AK}$ и $DGAT1^{AA}$ [3]. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что стадо хорошо отселекционировано и все животные имеют желательный по показателю жирномолочности генотип – $DGAT1^{KK}$.

На следующем этапе исследований нами изучена взаимосвязь молочной продуктивности коров белорусской черно-пестрой породы с различными генотипами по генам соматотропина (GH) и диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1) (табл. 1–3).

Анализ данных таблицы 1 свидетельствует о том, что более высокие показатели молочной продуктивности имели первотелки с генотипом GH^{LL}. Так, по удою за 305 дней лактации они превосходили первотелок с генотипом GH^{LV} на 5,3 % (P<0,05), а первотелок GH^{VV} – на 9,0 % (P<0,01), соответственно. По жирномолочности первотелки с генотипами GH^{LL} и GH^{LV} находились на одном уровне и превосходили сверстниц с генотипом GH^{VV} на 0,3 п.п. Количество молочного жира за 305 дней лактации также оказалось выше у первотелок с генотипом GH^{LL} и составило 248,5±7,32 кг, что на 6,2 % (P<0,05) выше, чем у первотелок GH^{LV} и на 17,2 %(P<0,01), чем у животных с генотипом GH^{VV}. Аналогичная тенденция наблюдалась по показателям белковомолочности и количеству молочного жира. Так, массовая доля белка в молоке первотелок с генотипом GH^{LL} составила 3,31±0,033 %, GH^{LV} – 3,30±0,048 % и GH^{VV} – 3,24±0,051 % соответственно.

Таблица 1. **Молочная продуктивность первотелок с различными генотипами по генам соматотропина (GH) и диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1)**

Показатели	Генотип			
	GH^{LL}	GH^{LV}	GH^{VV}	$DGAT1^{KK}$
Удой за 305 дней лактации, кг	6281,50±178,84**	5964,29±152,36*	5761,05±198,54	5708,39±166,11
Жирномолочность, %	3,98±0,144**	3,98±0,196**	3,68±0,211	3,82±0,041
Количество молочного жира, кг	248,50±7,32**	233,86±11,49*	212,00±12,42	217,13±6,07
Белковомолочность, %	3,31±0,033*	3,30±0,048*	3,24±0,051	3,31±0,018
Количество молочного белка, кг	207,92±5,42**	196,57±5,37*	187,15±8,12	188,29±5,59

* – P<0,05; ** – P<0,01.

Количество молочного белка оказалось выше у первотелок с генотипом GH^{LL} на 5,7 % (P<0,05), чем в молоке первотелок генотипа GH^{LV} и на 11,0 % (P<0,01), чем у животных с генотипом GH^{VV}.

Что касается гена DGAT1, то, как было отмечено выше, все опытные животные имели один генотип – $DGAT1^{KK}$ и, поэтому, не представляется возможным оценить показатели молочной продуктив-

ности в сравнительном аспекте с учетом генотипов. В этой связи сравнение проводили по показателям молочной продуктивности с учетом лактации.

Анализ данных табл. 2 свидетельствует о том, что показатели молочной продуктивности коров по второй лактации отличаются от аналогичных показателей первотелок. Коровы второй лактации с генотипом GH^{LV} характеризуются более высокими показателями молочной продуктивности в сравнении с гомозиготными животными GH^{LL} и GH^{VV}.

Таблица 2. **Молочная продуктивность коров с различными генотипами по генам GH и DGAT1 по второй лактации**

Показатели	Генотип			
	GH^{LL}	GH^{LV}	GH^{VV}	$DGAT1^{KK}$
Удой за 305 дней лактации, кг	5704,86±196,25*	5993,75±205,22**	5462,67±212,47	6086,80±144,58*
Жирномолочность, %	3,85±0,051*	3,67±0,054	4,01±0,068*	3,95±0,107*
Количество молочного жира, кг	219,07±7,41	219,25±9,25	219,42±7,87	239,75±6,85*
Белковомолочность, %	3,33±0,027*	3,32±0,044*	2,98±0,037	3,30±0,025
Количество молочного белка, кг	189,68±6,69*	195,50±8,41**	163,60±7,24	201,10±4,67*

* – P<0,05; ** – P<0,01.

Так, по удою за 305 дней лактации они превосходили коров с генотипом GH^{LL} на 5,0 % (P<0,05), GH^{VV} – на 9,7 % (P<0,01) соответственно. Что касается показателя жирномолочности, то гомозиготные коровы второй лактации GH^{LL} и GH^{VV} превосходили животных с генотипом GH^{LV} на 0,18 и 0,34 п.п., при этом количество молочного жира у животных всех трех генотипов оказалось одинаковым. Более низкая жирномолочность у гетерозиготных особей GH^{LV} компенсировалась более высокой молочной продуктивностью.

Что касается показателя белковомолочности, то у коров с генотипами GH^{LV} и GH^{LL} он находился примерно на одном уровне и составлял 3,2–3,3 %, что выше, чем у гомозиготных животных GH^{VV} на 0,35 и 0,34 п.п. соответственно. Учитывая, что удой у коров с генотипом GH^{LV} был выше, чем у животных двух других генотипов, то и количество молочного белка в молоке у них также было выше и составило 195,50±8,41 кг, в то время как у животных с генотипом GH^{LL} – 189,68±6,69 кг, GH^{VV} – 163,60±7,24 кг. По гену диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT 1) коровы второй лактации имели более высокие качественные показатели молока в сравнении с первотелками. Так, удой у коров второй лактации был выше, чем у первотелок на 6,6 %, жирномолочность - на 0,13 п.п. По массовой доле белка в молоке различий между коровами второй лактации и первотелками не наблюдалось. Учитывая, что удой и жирномолочность у коров второй лактации были выше, чем у первотелок, а по массовой доле белка в молоке различий не наблюдалось, то показатели количества молочного белка и жира также были выше у коров второй лактации в сравнении с первотелками.

Анализ данных табл. 3 свидетельствует о том, что показатели молочной продуктивности коров по третьей лактации повторяли динамику показателей молочной продуктивности коров по второй лактации.

Таблица 3. **Молочная продуктивность коров с различными генотипами по генам GH и DGAT1 по третьей лактации**

Показатели	Генотип			
	GH^{LL}	GH^{LV}	GH^{VV}	$DGAT1^{KK}$
Удой за 305 дней лактации, кг	5834,36±197,49	6003,83±201,52	5922,15±178,21	5925,42±110,27
Жирномолочность, %	3,87±0,056*	3,67±0,061	3,69±0,072	3,83±0,050
Количество молочного жира, кг	225,09±7,13	220,00±5,33	219,44±6,27	226,15±4,04
Белковомолочность, %	3,33±0,022	3,31±0,035	3,31±0,039	3,32±0,019
Количество молочного белка, кг	194,59±6,97	198,33±5,77	196,18±5,69	196,46±4,74

* – P<0,05.

Так, удой за 305 дней лактации был несколько выше у особей с генотипом GH^{LV} в сравнении с удоем особей с генотипами GH^{LL} и GH^{VV}. Вместе с тем, по показателям жирномолочности и белковомолочности более высокие показатели имели коровы третьей лактации с генотипом GH^{LL}. Несмотря на то, что удой был незначительно выше у коров с генотипом GH^{LV}, у гомозиготных особей GH^{LL} была выше жирномолочность в сравнении с особями GH^{LV} на 5,4 % (P<0,05) и с животными генотипа GH^{VV} – на 4,8 %, по количеству молочного белка достоверных различий межу животными трех генотипов не наблюдалось. Несмотря на то, что наиболее низкий удой был у коров третьей лактации с генотипом GH^{LL}, показатели жирно- и белковомолочности у них были выше, чем у животных двух других генотипов, и поэтому, количество молочного жира и белка также у них оказалось выше. Аналогичные результаты были получены и в исследованиях других ученых (А. А. Ярышкин, 2019) [7].

По гену диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT 1) коровы третьей лактации имели более низкие качественные показатели молока в сравнении с животными второй лактации. Так, удой у коров третьей лактации был ниже, чем у коров второй на 2,7 %, жирномолочность – на 0,12 п.п. По массовой доле белка в молоке различий между коровами третьей и второй лактаций не наблюдалось. Показатели количества молочного белка и жира также были выше у коров второй лактации в сравнении с животными третьей лактации. Оценка показателей молочной продуктивности по гену диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1) по трем лактациям свидетельствует о том, что наиболее высокие показатели молочной продуктивности были у коров второй лактации.

Заключение

Результаты проведенных исследований по изучению влияния генов диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1) и соматотропина (GH) на показатели молочной продуктивности коров белорусской черно-пестрой породы показали, что по удою за 305 дней лактации в большинстве случаев животные с генотипом GH^{LV} превосходили своих сверстниц GH^{LL} и GH^{LL} на 2,7–5,0 %. Вместе с тем, по жирно-и белковомолочности гомозиготные особи GH^{LL}, превосходили своих сверсниц двух других генотипов на 0,16–0,30 п.п., а в некоторых случаях по количеству молочного жира и белка в молоке на 2,6–15,9 %. Оценка показателей молочной продуктивности по гену диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1 (DGAT1) по трем лактациям свидетельствует о том, что наиболее высокие показатели молочной продуктивности были у коров второй лактации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зиннатова, Ф. Ф. Роль генов липидного обмена (DGAT1, TG5) в улучшении хозяйственно-полезных признаков крупного рогатого скота / Ф. Ф. Зиннатова, Ф. Ф. Зиннатов//Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э.Баумана. – 2014. – Т. 219. – С. 164–168.

2. Перчун, А. В. Оценка Костромской породы крупного рогатого скота по ДНК- маркерам хозяйственно полезных признаков / А. В. Перчун // диссертация канд. биол. Наук. – Караваево, Костромская область, 2015. – 121 с.

3.Grisart, B. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition / B. Grisart, W. Coppieters, F. Farnir [et.al.] // Genome Research. 2002. V. 12(2). – P. 222 – 231.

4. Леонова, М. А. Перспективные гены-маркеры продуктивности сельскохозяйственных животных / М. А. Леонова, А. Ю. Колосов, А. В. Радюк [и др.]. — Текст: непосредственный // Молодой ученый. – 2013. – № 12 (59). – С. 612–614.

5. Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификация племенного материала в животноводстве: учеб. пособие. — М.: РУДН, 2008. – 120 с.

6. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э.Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: «Мир», 1984 – 480 с.

7. Ярышкин, А. А. Влияние полиморфных вариантов гена соматотропина на молочную продуктивность коров / А. А. Ярышкин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2019. – №6(80). – С. 279–280.