DOI 10.28983/asj.y2020i5pp64-67 УДК 636.082.2:636.034

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ГЕНОТИПОВ ГЕНОВ КАППА-КАЗЕИН (CSN3) И БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛИН (LGB) НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ ГОЛШТИНСКОГО СКОТА

САФИНА Наталья Юрьевна, *ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН*
ГАЙНУТДИНОВА Эльза Равилевна, *ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН*
ЗИННАТОВА Фарида Фаттыховна, *ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН*
ШАКИРОВ Шамиль Касымович, *ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН*
ШАРАФУТДИНОВ Газимзян Салимович, *Казанский государственный аграрный университет*

Представлены результаты ДНК-тестирования аллельного полиморфизма методом ПЦР-ПДРФ по генам CSN3 и LGB и влияние их комплексных генотипов на показатели молочной продуктивности коров-первотелок голштинской породы. Выявлены все комплексные генотипы CSN3/LGB. Максимальная частота встречаемости отмечена у сочетания гетерозиготных генотипов AB/AB – 120 голов (25,5 %), что составляет четвертую часть от исследуемого поголовья крупного рогатого скота. Группа особей с гомозиготными генотипами BB/BB генов CSN3/LGB является самой малочисленной – 10 голов (2,1%). Оценка молочной продуктивности с учетом комплексных генотипов генов CSN3 и LGB показала, что у первотелок с комплексным сочетанием $CSN3^{BB}LGB^{AA}$ достоверно высокий уровень продуктивности за 305 дней лактации (7239,8 кг), а у первотелок, имеющих комплексный генотип $CSN3^{BB}LGB^{AB}$, – минимальный (6222,9 кг) по сравнению с показателями удоя коров-первотелок с другими комплексными генотипами. По содержанию массовой доли жира достоверно лучшие показатели установлены в субпопуляции животных с комплексным генотипом AA/AB (3,90 %), худший результат зафиксирован у группы особей с комплексным генотипом AB/AA(3,44 %). Высокое содержание массовой доли белка отмечено у особей с комплексным генотипом BB/AA (3,43 %), пониженный уровень белка у первотелок с сочетанием генотипов AA/AA и BB/BB по изучаемым генам (3,18 %). По основным показателям молочной продуктивности выгодно отличались особи, несущие в комплексном генотипе гомозиготный аллель B гена каппа-казеин (CSN3) и гомозиготный аллель A гена бета-лактоглобулин (LGB).

Введение. Основной целью животноводства является получение потомства, превосходящего по продуктивным показателям своих предшественников. Для достижения этой цели частота желаемых генотипов генов-маркеров хозяйственно полезных признаков должна увеличиваться от одного поколения к другому, что приводит к получению поголовья с более высокой продуктивностью.

Молекулярные маркеры ДНК экспрессируются в различных формах и всегда могут находиться в одном и том же месте генома из поколения в поколение, что является преимуществом генетического анализа [14].

Каппа-казеин и бета-лактоглобулин являются двумя наиболее важными белками молока млекопитающих. Эти молочные белки синтезируются эпителиальными клетками молочных желез и играют важную роль в изменениях качественного состава молока, его коагуляционных и технологических свойств. Процесс коагуляции обеспечивает хорошее усвоение основных компонентов молока.

Ген CSN3 кодирует молочный белок каппа-казеин – важный компонент для структуры и стабильности казеиновых мицелл, который содержит 169 аминокислот, а его молекулярная масса составляет от 19 006 до 19 037 дальтон [10]. Ген *Bostaurus* каппа-казеин (CSN3) расположен на 6-й хромосоме, содержит 5 экзонов и 4 интрона. Аллели A и B являются наиболее распространенными генетическими вариантами у молочного скота [17]. Варианты гена каппа-казеин $CSN3^A$ и $CSN3^B$ отличаются двумя аминокислотными заменами в полипептидной цепи: Thr→Ile в положении 136 и Asp→Ala в положении 148 [2, 13].

Исследования, проведенные в различных регионах, показали смешанные результаты относительно ассоциаций между генотипами CSN3 AA, AB и BB и молочной продуктивностью коров (удой, массовая доля белка и жира и др.) [2, 8, 18]. Аллель $CSN3^B$ ассоциируется с более высоким удоем и более высоким содержанием белка в молоке [5, 20]. Каппа-казеин обеспечивает оптимальные технологические свойства молока при производстве сыра, следовательно, его ген рассматривается как один из главных маркеров животноводческой ценности.

Белок β-лактоглобулина – одноцепочечный полипептид с молекулярной массой 18 кДа, содержащий 162 аминокислотных остатка молекулярной массой 36 000 дальтон. Ген *Bostaurus* LGB, кодирующий основной белок молочной сыворотки, расположен на хромосоме 11, состоит из 7 экзонов и 6 интронов [11]. Этот ген имеет в общей сложности 15 вариантов, наиболее часто встречающиеся генетические варианты бета-лактоглобулина – LGB^A и LGB^B, которые отличаются двумя аминокислотными заменами: Asp→Gly в положении 64 и Val→Ala в положении 118 [2, 3, 9, 12].

Результаты исследований влияния генотипов бета-лактоглобулина на признаки молочной продуктивности были более согласованными по сравнению с исследованиями других полиморфизмов молочных белков. Таким образом, этот ген был

предложен в качестве генетического фактора, влияющего главным образом на состав и качество молока, аллель В был признан лучшим по качеству молока в породах крупного рогатого скота [7, 18]. Аллель А связывался в основном с показателями надоя молока [4, 19], а аллель В с содержанием жира в молоке лактирующих коров. Кроме того, было показано, что генотип АА гена LGB оказывает существенное влияние на выход белка [1, 2].

ДНК-диагностика полиморфизма генов, связанных с одним и тем же признаком молочной продуктивности, в комплексе может считаться более эффективной, чем исследование каждого гена в отдельности [6].

Цель исследования – изучение комплексного влияния генотипов по локусам генов CSN3 – *Hinf* I и LGB-*Hae* III на показатели молочной продуктивности коров-первотелок голштинской породы, выращенных в Республике Татарстан.

Методика исследований. В ходе исследований были отобраны образцы биологического материала 471 коровы-первотелки голштинской породы СХПК «Племзавод им. Ленина» Атнинского района Республики Татарстан. Экстрагирование крови проводилось с использованием набора «Ампли Прайм ДНК-сорб В» (Некст Био, Россия), согласно инструкции производителя. Животных генотипировали по генам CSN3 и LGB методом ПЦР-ПДРФ. Аллели А и В гена CSN3 (хромосома 6) были идентифицированы на основе амплификации фрагмента длиной 350 п.н., расположенного между 201-м нуклеотидом экзона IV и 149-м нуклеотидом интрона IV. Для определения аллелей А и В гена LGB (хромосома 11) фрагмент размером 247 п.н. расположен между 23-м нуклеотидом экзона IV и 158-м нуклеотидом интрона IV. Амплификацию осуществляли в программируемом термоциклере T100 Thermal Cycler (Bio-Rad,США) при оптимальных температурно-временных режимах, указанных в табл. 1.

В состав реакционных смесей входили олигонуклеотидные праймеры (Евроген, Россия), представленные в табл. 2.

Полученные в ходе полимеразной цепной реакции ампликоны обрабатывали при температуре 37 °С в течение 16 ч эндонуклеазами рестрикции (СибЭнзим, Россия): *Hinf* I для гена CSN3 и *Hae* III для гена BLG. ПДРФ-продукты ДНК визуализировали на агарозном геле путем окрашивания бромидом этидия с последующим воздействием ультрафиолетовым светом. Гели фотографировали для последующего анализа данных, используя цифровую систему фотодокументации Gel&Doc (Bio-Rad,США). Генотипы особей определяли для каждого полиморфизма путем анализа размера фрагментов, представленных в виде пар оснований (bp).

Показатели молочной продуктивности получены из официальной электронной картотеки о стаде «СЕЛЭКС. Молочный скот» (АРМ Плинор, Россия). Для оценки качественного состава молока использовали анализатор молока «Клевер-2М» (Биомер, Россия). Отбор проб молока для проведения этого анализа осуществлялся во время контрольных доек один раз в сезон (4 раза за лактацию) в пробирки объемом 50 мл (Axygen, США).

Обработку данных осуществляли в программе MS Excel, с использованием формул биометрического анализа и вариационной статистики. Достоверность проверяли по критерию *t*-Стьюдента.

Результаты исследований. В результате ДНК-тестирования методом ПЦР-ПДРФ идентифицировали фрагменты гена CSN3 – 84 п.о., 132/134 п.о., 265 п.о. и гена LGB – 74/76 п.о., 109 п.о., 153 п.о. По итогам визуализации были определены все возможные аллели и генотипы изучаемых генов, что свидетельствовало о полиморфизме в исследуемом поголовье голштинского скота. Максимальную частоту встречаемости отмечали у сочетания гетерозиготных генотипов АВ/АВ – 25,5 % (120 гол.), что составляет четвертую часть от исследуемого поголовья крупного рогатого скота. Группа особей с гомозиготными генотипами ВВ/ВВ генов CSN3/LGB является самой малочисленной – 2,1 % (10 гол.).

Показатели молочной продуктивности опытного поголовья, представленные в табл. 3, свидетельствуют о превосходстве первотелок с комплексным генотипом ВВ/АА по удою за 305 дней лактации. Статистически значимые раз-

Таблица 1

Температурно-временные режимы протекания полимеразной цепной реакции

Ген	Температурно-временной режим					
	предварительная денатурация	денатурация	отжиг	элонгация	количество циклов	финальная элонгация
CSN3	95 °С, 3 мин	95 °С, 15 с	63 °С, 30 с	72 °С, 30 с	35	72 °С, 5 мин
LGB	95 °С, 3 мин	95 °С, 15 с	60 °С, 15 с	72 °С, 25 с	34	72 °С, 5 мин

Таблица 2

Праймеры для полимеразной цепной реакции

Ген	Праймер	п.о.	Источник
CSN3	F: 5’ – ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG – 3’ R: 3’ – GCCCATTTCGCCTTCTCTGTAACAGA – 5’	25 26	J.F. Medrano [15]
LGB	F: 5’ – GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA – 3’ R: 5’ – CAGGACACCGGCTCCCGGTATATGA – 3’	25 26	J.F. Medrano [16]

Таблица 3

Молочная продуктивность коров-первотелок с разными комплексными генотипами CSN3/LGB

Генотип	n = 471, n (%)	Удой за 305 дней, кг	Массовая доля жира, %	Массовая доля белка, %	Молочный жир, кг	Молочный белок, кг
AA/AA	50 (10,6)	6785,7±167,8	3,72±0,09	3,18±0,03***	252,5±7,9	215,8±6,2
AA/AB	103 (21,9)	6357,0±121,4***	3,90±0,07	3,22±0,03***	248,1±6,6	204,6±4,7*
AA/BB	54 (11,5)	6427,5±155,0**	3,86±0,11	3,24±0,04**	248,3±8,5	208,3±6,3*
AB/AA	46 (9,8)	6972,7±189,1	3,44±0,11***	3,38±0,04	240,0±10,1	235,4±7,5
AB/AB	120 (25,5)	6828,1±116,3	3,56±0,06***	3,28±0,03*	242,8±5,1*	223,9±4,7
AB/BB	50 (10,6)	6886,6±146,1	3,76±0,09	3,32±0,04	259,1±7,7	228,5±6,6
BB/AA	12 (2,5)	7239,8±214,1	3,57±0,14*	3,43±0,05	258,5±18,1	248,4±16,4
BB/AB	26 (5,5)	6222,9±226,8**	3,62±0,15	3,31±0,05	225,3±10,8**	206,2±8,3*
BB/BB	10 (2,1)	6951,0±286,0	3,67±0,21	3,18±0,06**	254,9±18,1	221,1±12,7

* $p \leq 0,05$;** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (по отношению к наибольшему показателю).

личия по выходу молока между этой группой животных и группами с другими генотипами: BB/AA и AA/AB – 882,8 кг (12,2 %; $p \leq 0,001$), BB/AA и AA/BB – 812,3 кг (11,2 %; $p \leq 0,01$), BB/AA и BB/AB – 1016,9 кг (14,0 %; $p \leq 0,01$).

Коровы-первотелки с комплексным сочетанием генотипов генов $CSN3^{BB}LGB^{AA}$ также достоверно выгодно отличались по содержанию массовой доли белка в молоке. Наблюдаемое превосходство между группой с генотипом BB/AA и сверстницами с генотипом AA/AA составило 0,25 % ($p \leq 0,001$), AA/AB – 0,21 % ($p \leq 0,001$), AA/BB – 0,19 % ($p \leq 0,01$), BB/BB – 0,15 % ($p \leq 0,01$), AB/AB – 0,15 % ($p \leq 0,05$). Эта же субпопуляция характеризуется максимальным выходом молочного белка. Разница по этому показателю у первотелок с генотипами BB/AA и AA/AB достоверно составила 43,8 кг (17,6 %; $p \leq 0,05$), у особей с генотипами BB/AA и BB/AB – 42,2 кг (17,0 %; $p \leq 0,05$) и BB/AA и AA/BB – 40,1 кг (16,1%; $p \leq 0,05$).

Повышенное содержание массовой доли жира зафиксировано у коров-первотелок с комплексным генотипом $CSN3^{AA}LGB^{AB}$. Достоверное различие с группами, имеющими генотипы AB/AA, AB/AB и BB/AA, составило 0,46 % ($p \leq 0,001$), 0,34 % ($p \leq 0,001$) и 0,33 % ($p \leq 0,05$) соответственно.

Животные, идентифицированные как носители комплексного сочетания генотипов AB/BB генов CSN3/LGB, имели преимущество по выходу молочного белка. Установленная разница между особями с генотипами AB/BB и BB/AB – 34,5 кг (13,3 %; $p \leq 0,01$), а генотипами AB/BB и AB/AB – 17,0 кг (6,5 %; $p \leq 0,05$).

Заключение. По итогам ДНК-тестирования аллельного полиморфизма генов CSN3 и LGB установлено, что изучаемое поголовье полиморфно, так как представлено всеми комплексными сочетаниями генотипов.

По уровню молочной продуктивности, содержанию массовой доли белка и выходу молочного белка статистически значимое превосходство отмечено у коров-первотелок, имеющих комплексный генотип $CSN3^{BB}LGB^{AA}$. Максимальные значения по содержанию массовой доли жира и выходу молочного жира зафиксированы у животных, несущих в своем генотипе аллель B по локусу гена LGB.

Следовательно, при отборе и подборе животных при маркерно-вспомогательной селекции на увеличение удоев и белковомолочность следует обращать внимание на особей с гомозиготными генотипами BB по локусу гена CSN3-*Hinf* I и AA по локусу гена LGB-*Hae* III в их комплексном сочетании генотипов.

Результаты, полученные по комплексным генотипам, дают важную информацию, которая может быть использована в будущих программах разведения и селекции с помощью маркеров для групп крупного рогатого скота голштинской породы.

Статья подготовлена в рамках государственного задания «Мобилизация генетических ресурсов растений и животных, создание новаций, обеспечивающих производство биологически ценных продуктов питания с максимальной безопасностью для здоровья человека и окружающей среды». Номер регистрации: АААА-А18-118031390148-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ахметов Т.М., Тюлькин С.В., Валиуллина Э.Ф.* Молочная продуктивность коров с разными комбинациями генотипов каппа-казеина и бета-лактоглобулина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2011. – Т. 207. – С. 51–57.

2. *Долматова И.Ю., Валитов Ф.Р.* Оценка генетического потенциала крупного рогатого скота по маркерным генам // Вестник Башкирского университета. – 2015. – Т. 20. – № 3. – С. 850–853.

3. *Ельчанинов В.В.* Номенклатура и биохимические свойства основных сывороточных белков. Бета-лактоглобулин // Сыроделие и маслоделие. – 2009. – № 2. – С. 38–39.

4. *Зиннатова Ф.Ф., Алимов А.М., Зиннатов Ф.Ф.* Взаимосвязь полиморфизма гена бета-лактоглобулин с молочной продуктивностью у коров и коров-первотелок // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 211. – С. 206–209.

5. *Малкин М.Н.* Молочная продуктивность и воспроизводительные качества коров красно-пестрой породы, полученных при скрещивании и от разведения «в себе» // Аграрный научный журнал. – 2016. – № 8. – С. 25–28.

6. *Сафина Н.Ю., Юльметьева Ю.Р., Шакиров Ш.К.* Влияние комплекса полиморфизма генов к-казеина (CSN3) и пролактина (PRL) на молочную продуктив-

ность коров-первотелок голштинской породы // Молочнохозяйственный вестник. – 2018. – № 1. – С. 74–82.

7. *Тюлькин С.В., Ахметов Т.М., Нургалиев М.Г.* Технологические свойства молока помесных коров с разными генотипами β-лактоглобулина в условиях Республики Татарстан // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 11. – С. 61–62.

8. *Шайдуллин Р.Р., Ганеев А.С.* Комплексное влияние полиморфизма генов CSN3 и DGAT1 на молочную продуктивность черно-пестрого скота // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. – № 1 (37). – С. 156–159.

9. *Шапканова Е.В.* Молочная продуктивность черно-пестрого скота с разными генотипами бета-лактоглобулина // Зоотехния. – 2010. – № 12. – С. 2–3.

10. *Alexander L.J.* Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene // Eur. J. Biochem., 1988, Vol. 178, P. 395–401.

11. *Eggen A., Fries R.* An integrated cytogenic and meiotic map of the bovine genome // Anim. Genet., 1995, No. 26, P. 216–236.

12. *Erhardt G.J., Juszczak L., Panicke H., Krick-Saleck* Genetic polymorphism of milk proteins in Polish Red Cattle: a new genetic variant of β-lactoglobulin // Journal of Animal Breeding and Genetics, 1998, Vol. 115, P. 63–71.

13. *Grosclaude F.* Genetic polymorphism of the principal milk proteins in cattle. Relation with quantity, composition and cheese making suitability of milk. INRA Productions Animales 1:5 // Journal of Dairy Science., 1988, No. 74, P. 1730–1742.

14. *Luque I., Herráez A.* Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud // Harcourt, 2001. – 469 p.

15. *Medrano J.F., Aguilar-Cordova E.* Genotyping of bovine κ-casein loci following DNA sequence amplification // Biotechnology, 1990a, No. 8 (2), P. 144–146.

16. *Medrano J.F., Aguilar-Cordova E.* Polymerase chain reaction amplification of bovine β-lactoglobuline genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis // Animal Biotechnology, 1990b, No. 1, P. 73–77.

17. *Mitra A., Schlee P., Krause I., Blusch J., Werner T., Balakrishnan C., Pirchner F.* Kappa-casein polymorphisms in Indian dairy cattle and buffalo: A new genetic variant in buffalo // Anim Biotechnol. – 1998. – No 9. – PP. 81–87.

18. *Vătăşescu-Balcan R.A., Georgescu S.E., Manea M.A., Dinischiotu A., Tesio C.D., Costache M.* Analysis of beta-lactoglobulin and kappa-casein genotypes in cattle // Lucrări ştiintifice Zootehnie şi Biotehnologii, 2007, Vol. 40(1), P. 211–216.

19. *Zaglool A.W., Awad A., Araby E. El-Bayomi K.M.* Association of β –Lactoglobulin Gene Polymorphism with Milk Yield, Fat and Protein in Holstein-Friesian Cattle // World's Veterinary Journal, 2016, No. 6(3), P. 117–122.

20. *Zepeda–Batista J.L., Alarcón–Zúñiga B., Ruíz–Flores A., Núñez–Domínguez R., Ramírez–Valverde R.* Polymorphism of three milk protein genes in Mexican Jersey cattle // Electron J Biotechnol., 2015, Vol. 18, P. 1–4.

Сафина Наталья Юрьевна, *канд. биол. наук, научный сотрудник, ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.*

Гайнутдинова Эльза Равилевна, *младший научный сотрудник, ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.*

Зиннатова Фарида Фаттыховна, *канд. биол. наук, зам. руководителя по науке, ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.*

Шакиров Шамиль Касымович, *д-р с.-х. наук, проф., главный научный сотрудник, ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.*

420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31.

Тел.: (843) 277-81-17.

Шарафутдинов Газимзян Салимович, *д-р с.-х. наук, проф., Казанский государственный аграрный университет. Россия.*

420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 65.

Тел.: (843) 567-45-00.

Ключевые слова: *ген; генотип; полиморфизм; каппа-казеин; бета-лактоглобулин; удой; жир; белок.*

INFLUENCE OF POLYMORPHISM OF COMPLEX OF CSN3 AND LGB GENES ON THE DAIRY PRODUCTIVITY IN HOLSTEIN CATTLE

Safina Natalia Yurevna, *Candidate of Biological Sciences, Researcher, Tatar Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center of RAS. Russia.*

Gaynutdinova Elza Ravilevna, *Junior Researcher,Tatar Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center of RAS. Russia.*

Zinnatova Farida Fattihovna, *Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Tatar Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center of RAS. Russia.*

Shakirov Shamil Kasimovich, *Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Chief Researcher, Tatar Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center of RAS. Russia.*

Sharafutdinov Gazimzyan Salimovich, *Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Kazan State Agrarian University. Russia.*

Keywords: *gene; genotype; polymorphism; kappa-casein; beta-lactoglobulin; yield; fat; protein.*

The study presents the results obtained in the course of DNA testing of allelic polymorphism by PCR-RFLP on CSN3 and LGB genes and the associations of their complex genotypes to the indicators of milk productivity of Holstein cow-heifers. Genetic polymorphism was detected by digestion with the endonucleases Hinf I (CSN3) and Hae III (LGB). All integrated CSN3/LGB genotypes were identified during the work. The maximum frequency of occurrence is observed in a combination of heterozygous AB/AB genotypes – 120 animals (25.5%), which is the fourth part of the studied cattle population. The group of animals with homozygous BB/BB genotypes of CSN3/LGB genes is the smallest one – 10 animals (2.1%). Milk productivity test, based on the complex CSN3 and LGB genotypes is observed in heifers with an integrated combination of CSN-3^{BB}LGB^{AA}showed that a significantly high level of productivity for 305 days of lactation – 7239.8 kg, and a minimum level of productivity (6222.9 kg) is observed in heifers with the complex CSN3^{BB}LGB^{AB} genotype, compared with indicators of milk yield of cow-heifers with other integrated genotypes. According to the content of the mass fraction of fat, the best indicators were established in the subpopulation of animals with the complex AA/AB genotype – 3.90%, and the worst result was recorded in the group of animals with the complex AB/AA genotype, which amounted to 3.44%. The high content of the mass fraction of protein was observed in individuals by the complexof the CSN3 and LGB genes BB/AA – 3.43%, and a reduced level of protein was observed in heifers with a combination of homozygous AA/AA and BB/BB genotypes by the genes under study – 3.18%. Thus, individuals carrying the homozygous A allele of the kappa-casein (CSN3) gene and the homozygous B allele of the beta-lactoglobulin (LGB) gene in the integrated genotype favorably differed on the main indicators of milk productivity.