

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛИНА
С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КОРОВ БЕЛОРУССКОЙ
ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ**

О. А. ЕПИШКО, В. В. ПЕШКО, Н. Н. ПЕШКО

Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет»

(Гродно, Республика Беларусь)

valik-11@mail.ru

У коров белорусской черно-пестрой породы с использованием метода ПЦР-ПДРФ установлен полиморфизм гена бета-лактоглобулина. Выявлены генотипы LGB^{AA} , LGB^{AB} и LGB^{BB} . Рассчитана частота встречаемости аллелей и генотипов по гену бета-лактоглобулина. Изучена молочная продуктивность (удой, содержание жира и белка в молоке, количество молочного жира и молочного белка) у животных с различными генотипами бета-лактоглобулина. Установлено превосходство коров с генотипом LGB^{BB} по основным показателям молочной продуктивности.

Ключевые слова: ген бета-лактоглобулина, генотип, молочная продуктивность, белорусская черно-пестрая порода

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISM OF THE BETA-LACTOGLOBULIN GENE FROM
MILK PRODUCTION OF COWS OF THE BELARUSIAN BLACK-MOTLEY BREED**

O. A. Epishko, V. V. Peshko, N. N. Peshko

Education institution «Grodno state agrarian university» (Grodno, Republic of Belarus)

In cows of the Belarusian black-motley breed using PCR-RFLP method set gene polymorphism of beta-lactoglobulin. Identified genotypes LGB^{AA} , LGB^{AB} and LGB^{BB} . Calculated frequency of alleles and genotypes in the gene beta-lactoglobulin. Studied milk productivity (yield of milk, fat and protein content of the milk, the amount of milk fat and milk protein) in animals with different genotypes of beta-lactoglobulin. Established the superiority of the cows with genotype LGB^{BB} the main indicators of milk production.

Keywords: beta-lactoglobulin gene, a genotype, milk productivity, the belarusian black-motley breed

**АСОЦІАЦІЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛІНУ З МОЛОЧНОЮ
ПРОДУКТИВНІСТЮ КОРІВ БІЛОРУСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ ПОРОДИ**

О. А. Епишко, В. В. Пешко, Н. Н. Пешко

Установа освіти «Гродненський державний аграрний університет» (Гродно, Республіка Беларусь)

У корів білоруської чорно-рябої породи за використання методу ПЦР-ПДРФ встановлено поліморфізм гену бета-лактоглобуліну. Виявлено генотипи LGB^{AA} , LGB^{AB} та LGB^{BB} . Розраховано частоти алелів і генотипів за геном бета-лактоглобуліну. Вивчено молочну продуктивність (надій, вміст жиру і білку в молоці, кількість молочного жиру і молочного білку) у тварин з різними генотипами за бета-лактоглобуліном. Встановлено перевагу корів з генотипом LGB^{BB} за основними показниками молочної продуктивності.

Ключові слова: ген бета-лактоглобуліну, генотип, молочна продуктивність, білоруська чорно-ряба порода

Вступление. Современное сельское хозяйство требует значительного ускорения процесса создания новых сортов растений и пород животных, которые бы сочетали в себе высокую продуктивность с приспособленностью к унифицированным промышленным техноло-

гиям. В ряде случаев селекция по большинству хозяйственно-полезных признаков достигла биологически возможной верхней границы, где традиционные методы дальнейшего усовершенствования селекционного материала являются малоэффективными [1]. К тому же, производство молока высокого качества – сложный технологический процесс, связанный с решением комплекса зоотехнических, ветеринарных, технологических и экономических вопросов [2].

Проведение селекционно-племенной работы и ее эффективность в молочном скотоводстве зависит от многих факторов: технологических (условия содержания, оптимальное кормление), средовые (создание условий для проявления генотипа в фенотипе) и генетические (получение животных с высоким наследственным потенциалом) [3]. Поэтому в настоящее время племенная работа наряду с традиционными методами, должна включать достижения в области генетики и биотехнологии животных [4].

Применение ДНК-технологий для генотипирования животных является интенсивной технологией при совершенствовании пород крупного рогатого скота. Перспективным направлением использования этих технологий в скотоводстве считается использование генов-кандидатов. Эти гены будут функционировать при условии, что их продукты (белки) оказывают огромное влияние на проявление того или иного признака. На сегодняшний день наиболее удобными генами-кандидатами являются гены белков молока, обуславливающие уровень молочной продуктивности животных [5, 6].

До недавнего времени генотип бета-лактоглобулина не включали в программы селекционного процесса, так как полиморфизм молочных белков можно было оценить только у лактирующих коров, а производители могли быть оценены только путем типирования молочных белков их дочерей. Благодаря методу ДНК диагностики стало возможным идентифицировать генотип гена бета-лактоглобулина у производителей и молодняка, что, значительно ускоряет решение селекционных задач. Возрастающее значение производства белковой продукции диктует необходимость использования генетических и селекционных методов для повышения экономической эффективности этого производства [7, 8].

По сообщению Луполова Т.А., Петку В.С., Науменко В.Н., Макаровой А.В. [9] в популяции черно-пестрых коров молдавского типа 48,4% голов имели генотип LGB^{AB} , 29,0% – генотип LGB^{AA} и 22,6% – генотип LGB^{BB} , а в группе коров красной эстонской породы (Молдавия) частота встречаемости генотипов бета-лактоглобулина составила: LGB^{AA} – 9,7%, LGB^{AB} – 6,5% и LGB^{BB} – 83,8%, при частоте встречаемости аллеля LGB^B 87,1%. Анализ молочной продуктивности черно-пестрых коров молдавского типа показал, что самым высоким удоем характеризовались особи с генотипом LGB^{BB} , жирномолочностью и количеством молочного жира – с генотипом LGB^{AB} . Среди коров красной эстонской породы по удою отмечено превосходство животных с генотипом LGB^{BB} , а по жирномолочности – с генотипом LGB^{AA} [9].

По сообщению О.В. Дубина и Т.М. Димань [10] в популяции коров черно-пестрой молочной породы Украины, принадлежащей СТОВ «Агровит» Киевской области, частота встречаемости аллеля LGB^A была на уровне 0,650, а аллеля LGB^B – 0,350.

Как показывают результаты исследований Л.А. Калашниковой, Я.А. Хабибрахмановой и А.Ш. Тинаева [11] в популяции голштинизированных коров черно-пестрой породы (n=113), разводимых в совхозе им. Кирова Московской области, больше всего животных имели генотип LGB^{AB} – 88,5%, а частота встречаемости особей с генотипами LGB^{AA} и LGB^{BB} была на уровне 9,7% и 1,8% соответственно. По гену бета-лактоглобулина аллель LGB^A встречался чаще – 0,540, против 0,460 у аллеля LGB^B . При этом коровы с генотипом LGB^{BB} достоверно отличались более высокими показателями молочной продуктивности, превосходство которых над сверстницами с генотипами LGB^{AA} и LGB^{AB} составило по удою 621-814 кг, жирномолочности – 0,03-0,05%, количеству молочного жира – на 27,1 кг, белковомолочности – на 0,22-0,29% и количеству молочного белка – на 45,6-45,7 кг ($P<0,05$; $P<0,01$) [11].

В связи с вышеизложенным, целью нашей работы явилось изучение взаимосвязи полиморфизма гена бета-лактоглобулина с молочной продуктивностью коров белорусской черно-пестрой породы.

Материалы и методы исследований. Объектом наших исследований являлся генетический материал (ушной выщип) коров белорусской черно-пестрой породы ($n=102$), содержащихся в КСУП «Экспериментальная база «Октябрь» Вороновского района Гродненской области.

ДНК-диагностику генотипов по гену бета-лактоглобулина проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» учреждения образования «Гродненский государственный аграрный университет». Ядерную ДНК выделяли перхлоратным методом. Основные растворы для выделения ДНК, амплификации и рестрикции готовили по Т. Маниатису, Э. Фрич, Дж. Сэмбруку [12].

Для амплификации участка гена BLG использовали праймеры:

LGB 1: 5' -TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA G - 3';

LGB 2: 5' - GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT -3';

ПЦР-программа: «горячий старт» – 5 минут при 94°C, 35 циклов: денатурация – 60 секунд при 94°C, отжиг – 60 секунд при 60°C, синтез – 60 секунд при 72°C, достройка – 5 минут при 72°C. Амплификацию гена LGB проводили с использованием реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 2 мкл буфер, 2 мкл MgCl₂, 2 мкл dNTP's, 0,4 мкл праймера 1, 0,5 мкл праймера 2, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 17,1 мкл – H₂O, 100-200 нг/мкл геномной ДНК. Концентрацию и специфичность амплификата оценивали электрофоретическим методом в 1,5% агарозном геле (при напряжении 110 В). Длина фрагмента гена LGB – 247 п.н. Для рестрикции амплифицированного участка гена BLG применяли эндонуклеазу BsuRI (HaeIII). Реакцию проводили при температуре 37°C. Продукты рестрикции разделяли электрофоретически в 3% агарозном геле (при напряжении 130 В) в TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе гель-документирования Gel Doc RX+ (BIORAD).

При расщеплении продуктов амплификации по гену LGB идентифицируются следующие генотипы: LGB^{AA} – фрагмент 148, 99 п.н.; LGB^{AB} – фрагменты 148, 99, 74 п.н.; LGB^{BB} – фрагменты 99,74 п.н.

Для изучения молочной продуктивности подопытные коровы белорусской черно-пестрой породы были сгруппированы в зависимости от возраста: первотелки, коровы второго и третьего отелов. Молочную продуктивность подопытных коров определяли при помощи проведения ежемесячных контрольных доений. В обработку включали показатели по тем животным, у которых продолжительность лактации была не меньше 240 дней, а возраст при первом отеле составлял 26-30 месяцев. У животных с различными генотипами по изучаемым генам учитывали удои, содержание жира и белка, выход молочного жира и белка за 305 дней лактации.

Селекционно-генетические параметры основных хозяйственно-полезных признаков определяли методами биологической статистики, используя при этом компьютерную программу Microsoft Excel.

Результаты исследований. В результате исследований в популяции коров белорусской черно-пестрой породы установлен полиморфизм гена бета-лактоглобулина, представленный двумя аллелями – LGB^A и LGB^B. Идентифицировано три генотипа – LGB^{AA}, LGB^{AB} и LGB^{BB} (рисунки 1, 2).

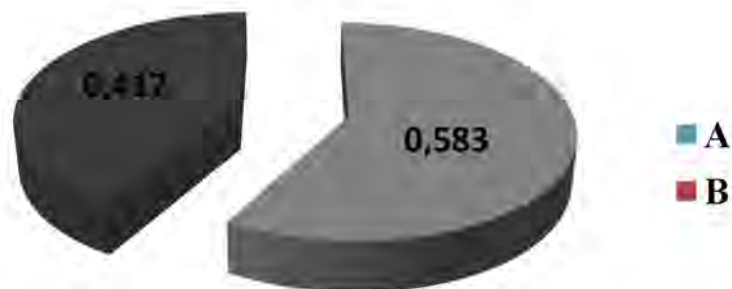


Рис. 1. Частота встречаемости аллелей гена бета-лактоглобулина в популяции коров белорусской черно-пестрой породы

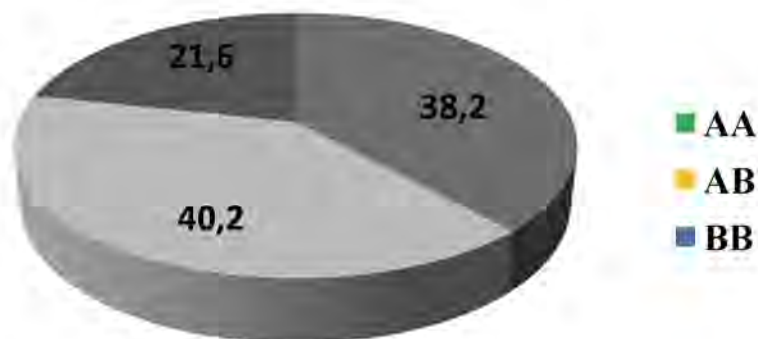


Рис. 2. Частота встречаемости генотипов по гену бета-лактоглобулина в популяции коров белорусской черно-пестрой породы, %

Представленные на рисунках данные свидетельствуют о том, что в исследуемой популяции коров белорусской черно-пестрой породы чаще встречался генотип LGB^{AB} (40,2%), чем генотипы LGB^{AA} и LGB^{BB} . Генотип LGB^{BB} идентифицирован только у 22 животных (21,6%). Частота встречаемости аллелей LGB^A и LGB^B составила 0,583 и 0,417 соответственно.

Следующим этапом наших исследований явилось изучение молочной продуктивности коров белорусской черно-пестрой породы с различными генотипами бета-лактоглобулина (табл. 1-3).

1. Молочная продуктивность первотелок с различными генотипами по гену бета-лактоглобулина

Показатели	Генотип		
	LGB^{AA}	LGB^{AB}	LGB^{BB}
Удой за 305 дней лактации, кг	4447,3±117,7	4722,9±87,9	4775,2±85,9*
Жирномолочность, %	3,72±0,02	3,74±0,01	3,75±0,02
Количество молочного жира, кг	165,5±4,5	176,8±3,6	179,2±3,1**
Белковомолочность, %	3,15±0,01	3,16±0,01	3,21±0,02**
Количество молочного белка, кг	140,1±3,8	149,3±3,0	153,5±2,9**

* – межгрупповые различия статистически достоверны при $P < 0,05$

** – межгрупповые различия статистически достоверны при $P < 0,01$

Анализ данных по молочной продуктивности первотелок с различными генотипами по гену бета-лактоглобулина (табл. 1) свидетельствует о том, что животные с генотипом LGB^{BB}

превосходили сверстниц с генотипами LGB^{AA} и LGB^{AB} по удою на 327,9 кг и 52,3 кг, жирномолочности – на 0,03% и 0,01%, количеству молочного жира – на 13,7 кг и 2,4 кг, белковомолочности – на 0,06% и 0,05% и количеству молочного белка – на 13,4 кг и 4,2 кг (P<0,05; P<0,01).

2. Молочная продуктивность коров с различными генотипами по гену бета-лактоглобулина по второй лактации

Показатели	Генотип		
	LGB ^{AA}	LGB ^{AB}	LGB ^{BB}
Удой за 305 дней лактации, кг	5053,2±121,5	5127,5±146,2	5465,5±137,0*
Жирномолочность, %	3,75±0,02	3,77±0,02	3,79±0,02
Количество молочного жира, кг	189,5±4,7	193,6±5,9	207,3±5,5*
Белковомолочность, %	3,20±0,01	3,23±0,01*	3,25±0,02*
Количество молочного белка, кг	161,6±4,1	165,5±4,9	177,8±4,5**

* – межгрупповые различия статистически достоверны при P < 0,05

** – межгрупповые различия статистически достоверны при P < 0,01

По второй лактации коровы с генотипом LGB^{BB} также как и по первой лактации характеризовались более высокими показателями удоя (на 412,3 кг и 338,0 кг), жирномолочности (на 0,04% и 0,02%), количеству молочного жира (на 17,8 кг и 13,7 кг), белковомолочности (на 0,05% и 0,03%) и количеству молочного белка (на 16,2 кг и 12,3 кг) по сравнению с животными с генотипами LGB^{AA} и LGB^{AB} соответственно (P<0,05; P<0,01).

3. Молочная продуктивность коров с различными генотипами по гену бета-лактоглобулина по третьей лактации

Показатели	Генотип		
	LGB ^{AA}	LGB ^{AB}	LGB ^{BB}
Удой за 305 дней лактации, кг	5710,6±153,3	5748,0±119,1	6160,7±146,7*
Жирномолочность, %	3,77±0,02	3,77±0,01	3,80±0,02
Количество молочного жира, кг	215,5±6,0	217,2±4,8	234,2±6,2*
Белковомолочность, %	3,22±0,01	3,25±0,01*	3,28±0,02**
Количество молочного белка, кг	183,6±4,9	186,5±3,9	202,2±5,4**

* – межгрупповые различия статистически достоверны при P < 0,05

** – межгрупповые различия статистически достоверны при P < 0,01

Аналогичная тенденция установлена и по третьей лактации. Так, коровы с генотипом LGB^{BB} имели удой, жирномолочность, количество молочного жира, белковомолочность и количество молочного белка на 412,7-450,1 кг, 0,03%, 17,0-18,7 кг, 0,03-0,06% и 15,7-18,6 кг соответственно больше, чем животные с генотипами LGB^{AA} и LGB^{AB} (P<0,05; P<0,01).

Таким образом, применение гена бета-лактоглобулина в качестве ДНК-маркера хозяйственно полезных качеств животных, позволит проводить маркер-направленную селекцию крупного рогатого скота, что обеспечит повышение уровня молочной продуктивности и создание стад с улучшенным качеством молока.

Выводы.

1. Анализ распределения генотипов бета-лактоглобулина у коров белорусской черно-пестрой породы в КСУП «Экспериментальная база «Октябрь» позволил установить преобладание животных генотипа LGB^{AB} (40,2 %) над животными генотипа LGB^{AA} (38,2 %) и с генотипом LGB^{BB} (21,6%). Соотношение частот аллелей LGB^A и LGB^B в изучаемой популяции находилось на уровне 0,583 и 0,417 соответственно.

2. В результате исследований установлено, что по трем лактациям коровы белорусской черно-пестрой породы с генотипом LGB^{BB} характеризовались более высоким удоем (на 52,3-327,9 кг) белковомолочностью (на 0,03-0,06%) и количеством молочного белка (на 4,2-18,6 кг) по сравнению с животными с генотипами LGB^{AA} и LGB^{AB}. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности проведения селекции на повышение частоты встречаемости аллеля LGB^B в популяции животных белорусской черно-пестрой породы.

3. Рекомендуем проводить ДНК-диагностику крупного рогатого скота по гену бета-лактоглобулина и учитывать результаты в селекционно-племенной работе, направленной на совершенствование хозяйственно-полезных признаков крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Полиморфные системы лактопротеинов крупного рогатого скота как генные маркеры / Г. Е. Маринчук [и др.] ; под общ. ред. В. И. Барабаша. – Днепропетровск, 2007. – 260 с.
2. Макаренко, М. Пути повышения качества молока в приморском крае / М. Макаренко // Молочное и мясное скотоводство. – 2007. – № 8. – С. 13–14.
3. Вишневец, А. В. Полиморфизм гена PRL (пролактин) у быков-производителей и его использование в селекционно-племенной работе / А. В. Вишневец, П. П. Красочко, А. П. Никитина // Ученые записки : сборник научных трудов / УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины». – Витебск, 2014. – Т. 50. – Вып. 2. – Ч. 1. – С. 261–265.
4. Эрнст, Л. К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Л.К. Эрнст, Н. А. Зиновьева. – М.: РАСХН, 2008. – С. 260–273.
5. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н. А. Зиновьева [и др.]. – ВИЖ, 2002 – 122 с.
6. Полиморфизм гена β -лактоглобулина в популяциях молочного скота Республики Башкортостан / И. Т. Гареева [и др.] // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2011. – № 3. – С. 5–11.
7. Использование ДНК-диагностики по генам каппа-казеина, β -лактоглобулина и α -лактоальбумина для повышения генетического потенциала продуктивности и эффективности селекционного процесса в молочном скотоводстве: рекомендации / Л. А. Танана [и др.]. – Гродно: ГГАУ, 2014. – 38 с.
8. Effect of quantitative traits loci for milk protein percentage on milk protein yield and milk yield in Israeli Holstein dairy cattle / E. Lipkin [et al.] // J. Dairy Science. – 2008. – Vol. 91 (4). – P. 1614–1627.
9. Структура локуса β -LG у крупного рогатого скота и его взаимосвязь с молочной продуктивностью / Т. А. Луполов [и др.] // Вестник Мозырского государственного педагогического университета им. И. П. Шамякина. – Мозырь, 2015. – № 1 (45). – С. 35–41.
10. Дубин, О. В. Генетична структура стада української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби СТОВ «Агросвіт» за поліморфізмом QTL-генів / О. В. Дубин, Т. М. Димань // Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. – 2013. – № 9 (103). – Р. 5–8.
11. Калашникова, Л.А. Влияние полиморфизма генов молочных белков и гормонов на молочную продуктивность коров черно-пестрой породы / Л.А. Калашникова, Я.А. Хабибрахманова, А.Ш. Тинаев // Доклады РАСХН. – 2009. – № 3. – С. 49–52.
12. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: «Мир». – 1984. – 480 с.

REFERENCES

1. Marinchuk, G. E. 2007. *Polimorfnye sistemy laktoproteinov krupnogo rogatogo skota kak gennye markery* – Polymorphic systems of lactoproteins of cattle as gene markers. – Dnepropetrovsk, 260 (in Russian).
2. Makarenko, M. 2007. Puti povysheniya kachestva moloka v primorskom krae – Ways to improve the quality of milk in the Primorye Territory. *Molochnoe i myasnoe skotovodstvo – Dairy and beef cattle*. 8:13–14 (in Russian).
3. Vishnevets, A. V., P. P. Krasochko, and A. P. Nikitina. 2014. Polimorfizm gena PRL (prolaktin) u bykov-proizvoditeley i ego ispol'-zovanie v seleksionno-plemennoy rabote – Polymorphism of PRL (prolactin) gene in bulls-sires and its use in selective breeding work. *Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya "Vitebskaya gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny"* –

Scientific notes of the educational institution "Vitebsk state Academy of veterinary medicine". – Vitebsk, 50 (2, 1):261–265 (in Russian).

4. Ernst, L. K., and N. A. Zinov'eva. 2008. *Biologicheskie problemy zhivotnovodstva v XXI veke – Biological problems of animal husbandry in the 21st century*. M., RASKhN, 260–273 (in Russian).

5. Zinov'eva, N. A. 2002. *Vvedenie v molekulyarnuyu gennuyu diagnostiku sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh – Introduction to molecular gene diagnostics of farm animals*. Dubrovitsy, VIZh, 122 (in Russian).

6. Gareeva, I. T. 2011. Polimorfizm gena β -laktoglobulina v populyatsiyakh molochnogo skota Respubliki Bashkortostan – Polymorphism of the β -lactoglobulin gene in dairy cattle populations of the Republic of Bashkortostan. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh – The problems of the biology of productive animals*. 3:5–11 (in Russian).

7. Tanana, L. A. 2014. *Ispol'zovanie DNK-diagnostiki po genam kappa-kazeina, β -laktoglobulina i α -laktoalbumina dlya povysheniya geneticheskogo potentsiala produktivnosti i effektivnosti selektsionnogo protsessa v molochnom skotovodstve – Use of DNA diagnostics for kappa-casein, β -lactoglobulin and α -lactalbumin genes to increase the genetic potential of productivity and efficiency of the selection process in dairy cattle breeding*. Grodno, GGAU, 38 (in Russian).

8. Lipkin, E. 2008. Effect of quantitative traits loci for milk protein percentage on milk protein yield and milk yield in Israeli Holstein dairy cattle. *J. Dairy Science*. 91 (4):1614–627 (in English).

9. Lupolov, T. A. 2015. Struktura lokusa β -LG u krupnogo rogatogo skota i ego vzaimosvyaz' s molochnoy produktivnost'yu – The structure of the β -LG locus in cattle and its relationship with dairy productivity. *Vestnik Mozyrskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta im. I. P. Shamyakina – Bulletin of the Mozyr State Pedagogical University nd. a. I. P. Shamyakina*. – Mozyr', 1 (45):35–41 (in Russian).

10. Dubyn, O. V., and T. M. Dyman'. 2013. Henetychna struktura stada ukrains'koi chornoryaboi molochnoi porody velykoi rohatoi khudoby STOV «Ahrosvit» za polimorfizmom QTL-heniv – The genetic structure of herds Ukrainian black-and-white dairy breed cattle "Ahrosvit" for polymorphism QTL-gens. *Tekhnolohiya vyrobnytstva i pererobky produktsii tvarynnytstva – Technology of production and processing of livestock products*. 9 (103):5–8 (in Ukrainian).

11. Kalashnikova, L. A., Ya. A. Khabibrakhmanova, and A. Sh. Tinaev. 2009. Vliyanie polimorfizma genov molochnykh belkov i gormonov na molochnuyu produktivnost' korov chernopestroy porody – Influence of polymorphism of genes of milk proteins and hormones on milk productivity of cows of black-and-white breed. *Doklady RASKhN*, 3:49–52 (in Russian).

12. Maniatis, T., E. Fritch, and Dzh. Sembruk. 1984. *Molekulyarnoe klonirovanie – The molecular cloning*. M.: Mir, 480 (in Russian).