УДК: 591.151:636.32/.38.082.13
DOI: 10.26897/2074-0840-2021-3-28-31

ОСОБЕННОСТИ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ПРОЛАКТИНА, БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛИНА У ОВЕЦ ПОРОДЫ ЛАКОН

М.И. СЕЛИОНОВА[1], Д.Д. ЕВЛАГИНА[2], С.И. СВЕТЛИЧНЫЙ[3]

[1] Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева;
[2] Всероссийский НИИ овцеводства и козоводства – филиала «Северо-Кавказский Федеральный аграрный научный центр»
[3] Главный технолог ООО «Агро Холдинг»

FEATURES OF ALLELIC POLYMORPHISM OF PROLACTIN AND BETA-LACTOGLOBULIN GENES IN LACON SHEEP

M.I. SELIONOVA[1], D.D. EVLAGINA[2], S.I. SVETLICHNY[3]

[1] Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy
[2] All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch North Caucasus Federal Agrarian Research Centre
[3] Chief technologist of LLC «Agro Holding»

Аннотация. *В работе представлен полиморфизм по генам пролактина (PRL) и бета-лактоглобулина (β-LG) у овец породы лакон, разводимых в КФХ «Николаев» Краснодарского края. В результате генетико-статистического анализа определены числовые значения генетических констант. Дана оценка генетической структуры исследуемой популяции и её своеобразия, определяемой как породной принадлежностью, так и аллельным состоянием генов.*

Ключевые слова: *полиморфизм, гены, овцы, лакон*

Summary. *The paper presents prolactin (PRL) and beta-lactoglobulin (β-LG) gene polymorphism in the Lacaune sheep, bred at Nikolaev peasant farm enterprise, Krasnodar Krai. Genetic and statistical analysis allowed to determine numerical values of the genetic constants. The genetic structure of the population under study and its distinctness, determined both by breed affiliation and by allele status of the genes, was assessed.*

Key words: *polymorphism, genes, PRL, β-LG, sheep, Lacaune*

Изучение генетической структуры популяции с.-х. животных является важнейшим условием для поддержания её равновесия и хозяйственной ценности. Имеется достаточно обширная группа генов-кандидатов, оказывающих влияние на продуктивные качества животных и вносящих большой вклад в их формирование [1, 2]. Метод маркер-зависимого отбора даёт возможность не только прогнозировать продуктивность с.-х. животных, но и избежать потери генетической изменчивости, тем самым сохраняя биоразнообразие, уделяя особое внимание находящимся под угрозой исчезновения породам, несущим селекционно-значимые аллели [3]. Эффективным инструментом для выявления полиморфизма генов у с.-х. животных является полимеразная цепная реакция с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). В настоящее время благодаря усовершенствованию этого метода удалось значительно упростить, ускорить и удешевить, не снижая точности анализа, проведение исследований по выявлению генов у животных любого возраста и пола, тем самым предоставляя потенциально более эффективный и гибкий инструмент отбора за короткий промежуток времени [4, 5].

Известно, что молоко и молочные продукты имеют фундаментальное значение в животноводстве и мировой экономике. С использованием современных методов молекулярной генетики можно идентифицировать аллельные варианты генов, связанных с более высоким содержанием белка и жира в молоке и, следовательно, более высоким выходом сыра [6, 7]. Поиск таких маркеров, может улучшить качество продуктов животного происхождения.

Для молочного животноводства значительный интерес представляют гены пролактина *(PRL)*, бета-лактоглобулина *(β-LG)*. В нашей стране распределение частот генотипов и аллелей по данным генам у крупного рогатого скота изучалось многими исследователями [8, 9, 10], тогда как у молочных овец, полиморфизм этих генов изучен недостаточно. В связи с этим исследование популяции овец породы лакон, по генам *PRL, β-LG* является актуальным.

Материал и методы исследований. Исследования выполнены в лаборатории иммуногенетики и ДНК-технологий ВНИИОК-филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ». Объектом исследования явились овцематки породы лакон (n = 248), разводимые в КФХ «Николаев» Краснодарского края. Кровь отбирали путём пункции яремной вены в вакуумные пробирки, в качестве консерванта использовали ЭДТА. Выделение нуклеиновых кислот осуществляли набором реагентов «DIAtomTM DNA Prep 100». Выход ДНК составил 3-5 мкг/100мкл с OD260/280 от 1,6 до 2,0. Анализ проводили методом ПЦР-ПДРФ на программируемом четырехканальном термоциклере «Терцик» в объёме 20 мкл, с использованием

синтетических олигонулеотидов, приведенных в работе K. Jawasreh et. all, [11]. В ультрафиолетовом свете методом горизонтального гель-электрофореза в 1,5-3% агарозном геле в буфере TBE (pH 8,0), после окрашивания бромистым этидием, определялась длина и число фрагментов рестрикции.

Генетико-статистический анализ выполнен по общепринятым методикам [8, 12] с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel.

Результаты исследования. Методом ПЦР был амплифицирован фрагмент гена PRL длинною 1209 п.н. После рестрикции амплификата эндонуклеазой HaeIII было выявлено три генотипа (рис. 1). Гомозиготному генотипу PRL^{AA} характерны фрагменты рестрикции длиной 540/370/147/152 пар нуклеотид, гетерозиготному генотипу PRL^{AB} соответствуют фрагменты рестрикции длиной: 540/517/370/147/152 пар нуклеотидов. Для гомозиготного генотипа PRL^{BB} характерны длины фрагментов рестрикции 517/370/147/152 пар нуклеотид.

После амплификации гена β-LG получили фрагмент длиной 301 п.н., который затем был разрезан эндонуклеазой рестрикции RsaI (рис 2). Гомозиготный генотип $\beta\text{-}LG^{AA}$ образуют два фрагмента величиной 241/60 п.н., гетерозиготные PRL^{AB} – четыре фрагмента: 241/175/66/60 п.н., генотип PRL^{BB} – три фрагмента 175/66/60 п.н.

Результаты анализа распределения генотипов и аллелей генов *PRL* и *β-LG* в исследуемой популяции овец представлены в таблице 1.

Для полиморфизма пролактина, характерна высокая (0,81) концентрация аллеля PRL^{A} и низкая (0,19) аллеля PRL^{B}. У овцематок преобладает гомозиготный тип PRL^{AA} – 75,0%, отмечена практически одинаковая частота встречаемости генотипов PRL^{BB} и PRL^{AB} – 12,0 и 13,0% соответственно.

В гене β-лактоглобулин почти в 2 раза отмечается преобладание аллеля – $\beta\text{-}LG^{B}$ (0,66) над аллелем $\beta\text{-}LG^{A}$ (0,34), что нашло отражение в наличии гомо- и гетерозиготных генотипов: $\beta\text{-}LG^{AA}$ – 11,0; $\beta\text{-}LG^{BB}$ – 43,0; $\beta\text{-}LG^{AB}$ – 46,0%.

В результате генетико-статистического анализа определены числовые значения генетических констант и дана оценка генетической структуры исследуемого поголовья овец (табл. 2).

Степень гомозиготности (Са), свидетельствующая о консолидации генов, гена *PRL* составила 69,22%; гена *β-LG* – 55,12%. Число эффективно действующих аллелей (Na) изучаемых генов *PRL* и *β-LG* составило 1,45 и 1,82 соответственно. Степень генетической изменчивости (V) была сравнительно равномерной: 30,6 – гена *PRL*, 44,6 – гена *β-LG*. Уровень наблюдаемой (Hobs) и ожидаемой (Hex) гетерозиготности изучаемых генов был 0,15 и 0,22 – гена *PRL*; 0,86 и 0,81 – гена *β-LG*. Свидетельствующий об уровне генетического разнообразия популяции, тест гетерозиготности (ТГ), имел положительное значение (+0,05) – в гене *β-LG*, для гена *PRL* он был

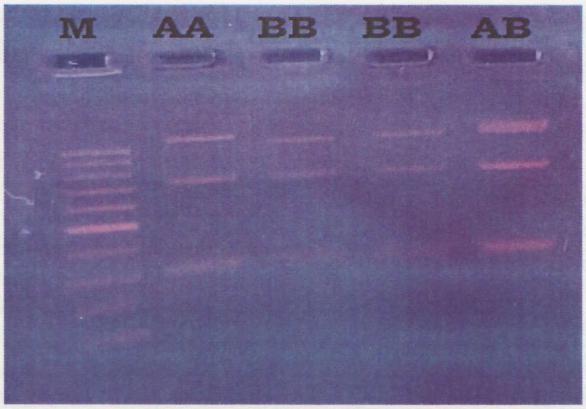

Рис. 1. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ пролактина (PRL)

Fig. 1. Electropherogram of the result of PCR-RFLP prolactin (PRL)

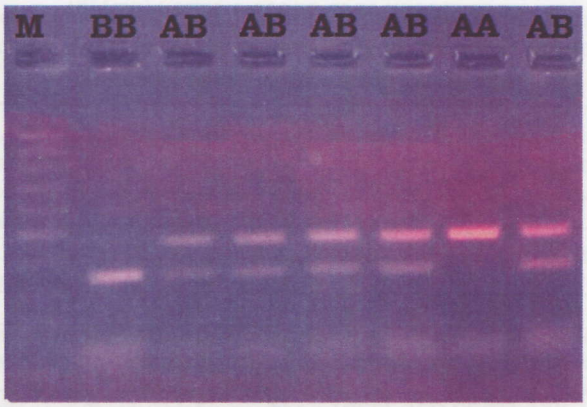

Рис. 2. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ β-лактоглобулин (β-LG)

Fig. 2. Electropherogram of the result of PCR-RFLP β-lactoglobulin (β-LG)

Таблица 1

Частота встречаемости аллелей и генотипов генов *PRL* и *β-LG* овец породы лакон (n = 248)

Frequency of occurrence of alleles and genotypes of PRL and β-LG genes in Lacaune sheep (n = 248)

Ген	Генотип	n	Частота встречаемости	
			генотипа	аллеля
PRL	AA	186	0,75	A 0,81 B 0,19
	AB	32	0,13	
	BB	30	0,12	
β-LG	AA	27	0,11	A 0,34 B 0,66
	AB	115	0,46	
	BB	106	0,43	

отрицателен (–0,11), что является результатом недостатка гетерозигот в исследуемой популяции.

Для оценки значимости селективного различия между генотипами, был рассчитан критерий соответствия Пирсона (χ^2), чтобы проверить соответствие

Таблица 2

Генетическая структура овец породы лакон

Genetic structure of Lacaune sheep

Показатель	Ген	
	PRL	β-LG
Количество гомозигот (n)	216	133
Количество гетерозигот (n)	32	115
Критерий согласия Пирсона (χ^2)	52,95	0,26
Степень гомозиготности (Са), %	69,22	55,12
Число эффективно действующих аллелей, (Na)	1,45	1,82
Степень генетической изменчивости (V), %	30,6	44,6
Наблюдаемая гетерозиготность (Hobs)	0,15	0,86
Ожидаемая гетерозиготность (Hex)	0,22	0,81
Тест гетерозиготности (ТГ)	-0,07 Ф<Т	+0,05 Ф>Т

Таблица 3

Распределение комплексных генотипов в популяции овец породы лакон (n=248)

Distribution of complex genotypes in the population of sheep of the Lacaune breed (n = 248)

Комплексные генотипы	Количество голов, n	Частота встречаемости, %
PRL^{AA} β-LG^{AA}	23	9,3
PRL^{AB} β-LG^{AA}	1	0,4
PRL^{BB} β-LG^{AA}	3	1,2
PRL^{AA} β-LG^{AB}	83	33,5
PRL^{AB} β-LG^{AB}	13	5,2
PRL^{BB} β-LG^{AB}	19	7,7
PRL^{AA} β-LG^{BB}	80	32,2
PRL^{AB} β-LG^{BB}	18	7,3
PRL^{BB} β-LG^{BB}	8	3,2

фактических частот генотипов теоретически ожидаемым согласно закону Харди-Вайнберга. При сравнении фактического распределения генотипов с теоретически ожидаемым в гене *β-LG* не выявлено нарушения генного равновесия, χ^2 = 0,26, критерий Пирсона не превышал критического значения. Расчёт критерия χ^2 гена *PRL* составил 52,95, фактическое распределение генотипов не соответствует теоретически ожидаемому, что свидетельствует о смещении в сторону гомозиготности. В ожидаемом распределении отмечается снижение гетерозиготных особей PRL^{AB} и увеличение гомозиготных особей PRL^{AA} и PRL^{BB}.

В исследуемой популяции овец породы лакон выявлено 9 комплексных генотипов из 9 теоретически возможных (табл. 3).

Оценка исследуемого поголовья показала, что наиболее часто встречаются животные с комплексным генотипом $PRL^{AA}\beta\text{-}LG^{AB}$ (33,5%) и $PRL^{AA}\beta\text{-}LG^{BB}$ (32,2%), четыре генокомплекса: $PRL^{AA}\beta\text{-}LG^{AA}$ (9,3%), $PRL^{BB}\beta\text{-}LG^{AB}$ (7,7%), $PRL^{AB}\beta\text{-}LG^{BB}$ (7,3%), $PRL^{AB}\beta\text{-}LG^{AB}$ (5,2%) имели частоту встречаемости больше 5,0%. Комплексные генотипы $PRL^{BB}\beta\text{-}LG^{BB}$, $PRL^{BB}\beta\text{-}LG^{AA}$, не превышали 5,0% и составили 3,2%, 1,2% соответственно.

Наименьшая встречаемость отмечена у генокомплекса $PRL^{AB}\beta\text{-}LG^{AA}$ (0,4%).

Заключение. В результате проведенного исследования методом ПЦР-ПДРФ установлены породные особенности полиморфизма аллельного спектра генов *PRL, β-LG* у овец породы лакон. Исследование популяции позволило установить своеобразие генетической структуры, зависящей как от породной принадлежности, так и от изучаемого гена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Селионова М.И. Оценка полиморфизма гена пролактина у коров молочных пород / М.И. Селионова, Л.В. Кононова, О.В. Сычёва // Животноводство и кормопроизводство. – 2018. – № 1. – С. 27-33.

2. Наметов А.М., Современные ДНК-технологии, используемые в селекции сельскохозяйственных животных / А.М. Наметов, И.С. Бейшова, Г.Д. Чужебаева // 3 и – интеллект, идея, инновация. – 2018. – № 3. – С. 51-55.

3. Арнаутовский И.Д. Племенному животноводству – инновационные, молекулярно-генетические, биотехнические технологии и современные кадры / И.Д. Арнаутовский, Р.Л. Шарвадзе, В.А. Гогулов, Е.В. Талалай // Дальневосточный аграрный вестник. – 2017. – № 3 (43). – С. 84-91.

4. Zinovieva N.A. Genome editing: current state of research and application to animal husbandry / N.A. Zinovieva, N.A. Volkova, V.A. Bagirov // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2019. – Т. 55. – № 7. – С. 711-721.

5. Широкова Н.В. Оптимизация техники проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования овец / Н.В. Широкова, Ю.А. Колосов, Л.В. Гетманцева, А.В. Радюк, Н.Ф. Бакоев // Научный журнал КубГАУ. – 2015. – № 113.

6. Сермягин А.А. Связь генотипов BOLA-DRB3 с племенной ценностью по показателям молочной продуктивности в российской популяции молочного скота / А.А. Сермягин, Н.В. Ковалюк, А.Н. Ермилов, И.Н. Янчуков, В.Ф. Сацук, А.В. Доцев, Т.Е. Денискова, Г. Брем, Н.А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – № 6. – С. 775-781.

7. Чижова Л.Н. Оценка генетического потенциала молодняка молочного скота по маркерным генам CSN3, GH, PIT-1, PRL / Л.Н. Чижова, Е.С. Суржикова, Т.Н. Михайленко // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 6. – С. 40-46.

8. Селионова М.И. Породные особенности аллельного профиля генов, контролирующих молочную продуктивность крупного рогатого скота / М.И. Селионова, Л.Н. Чижова, Е.С. Суржикова, Г.Н. Шарко, Т.Н. Михайленко, А.И. Чудновец // АгроЗооТехника. – 2019. – № 1. – Т. 2. – С. 3.

9. Позовникова М.В. Ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов генов-кандидатов PRL и β-LG с хозяйственно-полезными признаками у коров черно-пестрой породы / М.В. Позовникова, Г.Н. Сердюк, О.В. Митрофанова // Генетика и разведение животных. – 2017. – № 4. – С. 31-36.

10. Епишко О.А. Влияние генов бета-лактоглобулина и пролактина на показатели молочной продуктивности коров белорусской черно-пестрой породы / О.А. Епишко, В.В. Пешко, Н.Н. Пешко // В сборнике: сельское хозяйство – проблемы и перспективы. Сборник научных трудов. Под редакцией В.К. Пестиса. – Гродно. – 2017. – С. 52-59.

11. Jawasreh K. Effect and Interaction of β-Lactoglobulin, Kappa Casein, and Prolactin Genes on Milk Production and Composition of Awassi Sheep / K. Jawasreh, A.A. Amareen, P. Aad // Animals. – 2019. – 9 (6). – P. 382.

12. Орлова Н.Н. Генетический анализ. Москва: МГУ. – 1991. – 318 с.

REFERENCES

1. Selionova M.I. Evaluation of prolactin gene polymorphism in dairy cows / M.I. Selionova, L.V. Kononova, O.V. Sycheva // Animal husbandry and feed production. – 2018. – № . 1. – P. 27-33.

2. Nametov A.M. Modern DNA technologies used in breeding farm animals / A.M. Nametov, I.S. Beishova, G.D. Chuzhebaeva // 3 i – Intellect, idea, innovation. 2018. № . 3. P. 51-55.

3. Arnautovsky I.D. Pedigree animal husbandry – Innovative, molecular genetics, biotechnical technologies and modern personnel / I.D. Arnautovsky, R.L. Sharvadze, V.A. Gogulov, E.V. Talalay // Far Eastern Agrarian Bulletin. – 2017. – № . 3 (43). – P. 84-91.

4. Zinovieva N.A., Genome editing: current state of research and application to animal husbandry / N.A. Zinovieva, N.A. Volkova, V.A. Bagirov // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2019. – T. 55. – № 7. – P. 711-721.

5. Shirokova N.V. Optimization of PCR-RFLP technique for sheep genotyping / N.V. Shirokova Yu.A. Kolosov, L.V. Getmantseva, A.V. Radyuk, N.F. Bakoev // Scientific journal of KubSAU. – 2015. – № . 113.

6. Sermyagin A.A. Relationship of BOLA-DRB3 genotypes with breeding value in terms of milk productivity in the Russian population of dairy cattle / A.A. Sermyagin, N.V. Kovalyuk, A.N. Ermilov, I.N. Yanchukov, V.F. Satsuk, A.V. Dotsev, T.E. Deniskova, G. Brem, N.A. Zinovieva // Agricultural biology. – 2016. – T. 51. – № . 6. – P. 775-781.

7. Chizhova L.N. Assessment of the genetic potential of young dairy cattle by marker genes CSN3, GH, PIT-1, PRL / L.N. Chizhova, E.S. Surzhikova, T.N. Mikhailenko // Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy. – 2020. – № . 6. – P. 40-46.

8. Selionova M.I. Breed features of the allelic profile of genes that control milk production in cattle / M.I. Selionova, L.N. Chizhova, E.S. Surzhikova, G.N. Sharko, T.N. Mikhailenko, A.I. Chudnovets // AgroZooTechnika. – 2019. – № . 1. – Vol. 2. – P. 3.

9. Pozovnikova M.V. Association of single nucleotide polymorphisms of candidate genes PRL and β-LG with economically useful traits in black-and-white cows / M.V. Pozovnikova, G.N. Serdyuk, O.V. Mitrofanova // Genetics and animal breeding. – 2017. – № . 4. – P. 31-36.

10. Epishko O.A. The influence of the genes of beta-lactoglobulin and prolactin on the indicators of milk productivity of cows of the Belarusian black-and-white breed / O.A. Epishko, V.V. Peshko, N.N. Peshko // In the collection: agriculture – problems and prospects. Collection of scientific papers. Edited by V.K. Pestis. Grodno. – 2017. – P. 52-59.

11. Jawasreh K. Effect and Interaction of β-Lactoglobulin, Kappa Casein, and Prolactin Genes on Milk Production and Composition of Awassi Sheep / K. Jawasreh, A.A. Amareen, P. Aad // Animals. – 2019. – 9 (6). – P. 382.

12. Orlova N.N. Genetic analysis. Moscow: Moscow State University. – 1991. – 318 p.

Селионова Марина Ивановна, *РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: selionova@rgau-msha.ru; тел.: (968) 266-33-03;*

Евлагина Дарья Дмитриевна, *ВНИИОК – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ», 355017, Российская Федерация, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 15, e-mail: d1319731@yandex.ru, тел.: (918) 131-97-31;*

Светличный Сергей Иванович, *ООО «Агро Холдинг», Российская Федерация, г. Краснодар, e-mail: s.s.i.23@yandex.ru, тел.: (918) 976-62-77*