

Молекулярная генетика

Рубрика

doi.org/10.31043/2410-2733-2021-4-5-10

УДК 636.2.034;636.2:4.082

Н. В. Ковалюк^{1,2}, Н. С. Алтухова¹, М. А. Глущенко¹, А. Г. Соловых¹Структура субпопуляции российского скота голштинской породы по локусам *CSN2* и *CSN3*

Аннотация.

Цель: определение потенциала российской субпопуляции голштинской породы в отношении селекции по локусам бета-и каппа-казеина.

Материалы и методы. По локусам *CSN2* и *CSN3* генотипировано 1539 голов крупного рогатого скота голштинской породы, в том числе 1242 коровы и телки и 297 быков-производителей, а также проанализирована информация о *CSN2*- и *CSN3*-генотипах 297 быков США (World Wide Sires, Ltd).

Результаты. Установлено, что за последние 2 года произошло увеличение доли быков-производителей в компании WWS с *CSN2* генотипами A2A2 и *CSN3* генотипами BB. Так частота встречаемости таких быков-производителей в каталоге 2019 года составила, соответственно, 0,51 и 0,29; а в каталоге 2021 года, соответственно, 0,68 и 0,31.

Генотипированные быки отечественных племенных предприятий, значительная часть которых завезена из за рубежа, также отличаются преобладанием *CSN2* аллеля A2, в этой группе частота встречаемости этого аллеля составила 0,63. Однако, *CSN3* аллель B встречался в группе быков-производителей, принадлежащих отечественным предприятиям, с лишь с частотой 0,34, что 1,6 раза ниже, чем у американских быков-производителей.

Если говорить о генотипированной группе голштинских коров и телок ($n=1242$) из 3 крупных хозяйств Краснодарского края, то частота встречаемости *CSN2* аллеля A2 оказалась минимальной (0,57), а *CSN3* аллеля B (0,40) — несколько выше частоты встречаемости этого аллеля в выборке быков-производителей отечественных племенных предприятий.

Заключение. В настоящее время, российские племенные предприятия и хозяйства отстают по данным показателям, однако, проводя целенаправленную селекцию в соответствии с обозначенным трендом, путем подбора соответствующих быков-производителей, можно в следующем поколении увеличить долю животных — носителей ценных генотипов.

Ключевые слова: ген *CSN2*; ген *CSN3*; частоты аллелей; молочная продуктивность.

Авторы:

Ковалюк Наталья Викторовна — доктор биологических наук; e-mail: nvk1972@yandex.ru;

Алтухова Наталья Сергеевна — кандидат сельскохозяйственных наук, e-mail: n.nadeeva@yahoo.com;

Соловых Алексей Геннадьевич — кандидат сельскохозяйственных наук, e-mail: a.solovykh@rgau-msha.ru;

Глущенко Марина Анатольевна — кандидат биологических наук, e-mail: m.glushenko@rgau-msha.ru.

¹ ФГНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»; 350055, Российская Федерация, г. Краснодар, п. Знаменский, ул. Первомайская 4;

² ФГБОУ ВО РГАУ–МСХА имени К. А. Тимирязева; 127434, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49.

Введение. К основным белковым компонентам молока относятся β -казеин (β -CN), α s1-казеин (α s1-CN), α s2-казеин (α s2-CN), κ -казеин (κ -CN), α -лактоальбумин (α -LA) и β -лактоглобулин (β -LG.)

Для гена бета-казеина (*CSN2*) в настоящее время описано 12 полиморфных вариантов. Наиболее частыми генетическими вариантами *CSN2* являются A1 и A2 [1, 2]. Мутация, вызывающая различия в белке-казеине, является результатом

однонуклеотидного полиморфизма (C/A) в кодоне 67 седьмого экзона. Происходит замена пролина (A2) на гистидин (A1). Биоактивный пептид β-казоморфин 7, происходящий из казеиновых вариантов A1 [3, 4], может быть одним из факторов риска ишемической болезни, атеросклероза, сахарного диабета I типа, синдрома внезапной детской смерти и аутизма [4-7].

Предполагают, что данная мутация возникла около 5000 лет назад и широко распространилась в различных породах крупного рогатого скота. Частота аллеля A1 в Гернзейской, Браун Швицкой, Джерсейской, Голштинской, Айрширской и красных датских породах крупного рогатого скота составляет около 4–2%, 34–30%, 50–37%, 56–47%, 60–51% и 77%, соответственно [4].

Как и ген бета-казеина, ген каппа-казеина *CSN3* расположен на шестой хромосоме, имеет размер 13 тысяч пн, состоит из 5 экзонов общей длиной 850 пн и 4 интронов. Длина полипептидной цепи каппа-казеина составляет около 169 аминокислот [8]. На сегодняшний день описаны 13 генетических вариантов каппа-казеина крупного рогатого скота, причем, наиболее распространенными являются аллели A и B [9]. Причем аллель A в большинстве исследованных групп встречается значительно чаще аллеля B. Установлено, что присутствие в генотипе коровы аллеля B гена *CSN3* положительно влияет на содержание белка в молоке, а также на выход творога и сыра (+10%) [10].

Цель исследований — определение потенциала российской субпопуляции голштинской породы в отношении селекции по локусам бета-и каппа-казеина.

Материалы и методы. Исследования проводили на базе лаборатории молекулярно-генетической экспертизы ООО НПО «Юг-Плем» в 2019–2020 гг. Генотипировано по локусам *CSN2* и *CSN3* 1539 голов крупного рогатого скота голштинской породы, в том числе 1242 коровы и телки (АО «Рассвет», АО «Родина», ОАО «Нива Кубани»), и 297 быков-производителей (ОАО «Московское» по племенной работе и ОАО «Невское» по племенной работе), также проанализирована информация из каталогов World Wide Sires Russia о *CSN2*- и *CSN3*-генотипах 297 быков (68 из каталога 2019 года (апрель) и 229 из каталога 2021 года (апрель)).

Для выделения ДНК из крови и спермы использовали наборы реагентов Diatom™ DNA Prep 100 (ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва). Для постановки ПЦР реакции использовали наборы Gene Pak PCR Core (ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва).

Праймеры для амплификации участка гена *CSN2* были подобраны нами с использованием

программы Primer Premier, путем создания сайта рестрикции в области необходимого SNP [11]. Использовали праймеры следующей последовательности:

5'AGG GAT GTT TTG TGG GAG GCT CTT3'

5'ATA AAA TCC ACC CCT TTG CCC AGA 3'

Применялись следующие условия амплификации: 94°C — 3,5 мин; 94°C — 30 с, 63°C — 30 с, 72°C — 30 с — 30 циклов; 72°C — 3 мин.

В результате, фрагменты, которые амплифицировались с участка гена β-казеина A2 варианта, расщеплялись эндонуклеазой — BstDEI (НПО «СибЭнзим») на 2 фрагмента: 64 и 22 пн. Фрагмент, амплифицированный с аллеля A1, сайта рестрикции не имел (размер его составлял — 86 пн). Результаты рестрикции оценивали в 2.5% агарозном геле (рисунок 1).

Для амплификации участка гена *CSN3* использовали праймеры следующей последовательности [12]:

KKAZ 1 5' TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG 3';

KKAZ 2 5' GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT CCT TAG 3'

В результате фрагменты, которые амплифицировались с участка гена каппа-казеина варианта A, расщеплялись эндонуклеазой *HinfI* (НПО «СибЭнзим») на 3 фрагмента: 326, 100 и 27 п.н. Фрагмент, амплифицированный с аллеля B, расщеплялся на 2 фрагмента: 426 и 27 п.н. Результаты рестрикции оценивали в 2,0%-ном агарозном геле (рис. 2, визуализированы фрагменты 426 и 326 п.н.).

Фактические частоты встречаемости отдельных генотипов определяли путем соотношения количества особей, носителей генотипа, к общему количеству особей в анализируемой группе.

Для подсчета частот аллелей использовали следующую формулу:

$P(A) = (2N_1 + N_2) / 2n$, где N_1 — число гомозигот по исследуемому аллелю, а N_2 — число гетерозигот, n — объем выборки.

Статистическая ошибка для частот встречаемости аллелей определялась по формуле:

$$m_q = \sqrt{\frac{qi(1-qi)}{2N}}$$

где qi — частота встречаемости аллеля, а N — количество животных.

Результаты и обсуждение. В таблице 1 представлен анализ данных частот встречаемости генотипов и аллелей у быков-производителей из каталогов компании WWS Russia, по которому

можно судить об основных направлениях мировой селекции по локусам бета- и капа-казеинов.

Очевидно, что основной тренд в селекции голштинской породы компании WWS в настоящее время направлен, во-первых, на усиление внимания к белковым маркерам молока. Так доля генотипированных по локусам *CSN2* и *CSN3* быков-производителей в каталоге WWS Russia 2019 года составляла около 30% от общего числа быков, в каталоге 2021 — все представленные быки генотипированы по указанным выше маркерам. Во-вторых, очевидно увеличение доли животных с *CSN2* генотипами A2A2 и *CSN3* генотипами BB. Так, частота встречаемости таких быков-производителей в каталоге 2019 года составила, соответственно, 0,51 и 0,29; а в каталоге 2021 года, соответственно, 0,68 и 0,31.

Частоты встречаемости генотипов и аллелей коров и телок из хозяйств Краснодарского края и быков-производителей, принадлежащих отечественным племенным предприятиям, генотипированных по локусам бета- и каппа-казеинов представлены в таблице 2.

Генотипированные быки отечественных племенных предприятий, значительная часть которых завезена из за рубежа, также отличаются преобладанием *CSN2* аллеля A2, в этой группе частота встречаемости этого аллеля составила 0,63. Однако, *CSN3* аллель B встречался в группе быков-производителей, принадлежащих отечественным предприятиям, с лишь с частотой 0,34, что в 1,6 раза ниже, чем у американских быков-производителей.

Если говорить о генотипированной группе голштинских коров и телок (n=1242) из 3 крупных

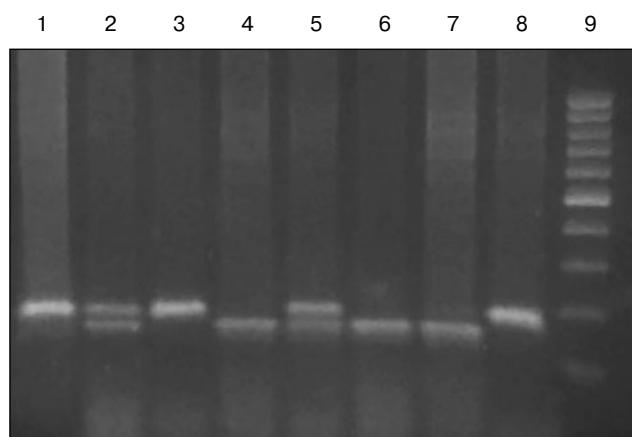


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов гидролиза амплификатов участка гена *CSN2* эндонуклеазой рестрикции BstDEI.

2, 5 — генотип A1A2;
1, 3, 8 — генотип A1A1;
4, 6, 7 — генотип A2A2;
9 — маркер молекулярного веса

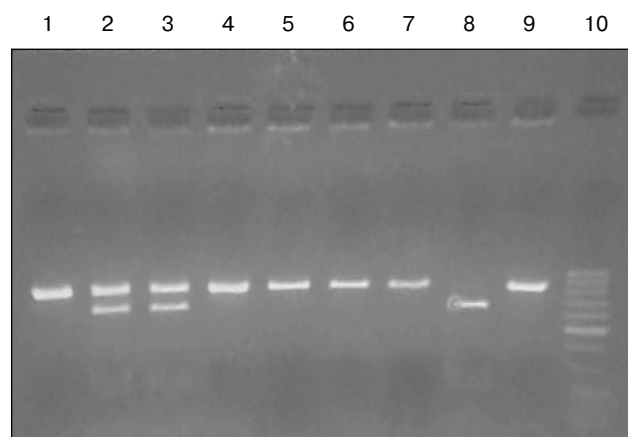


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов гидролиза амплификатов участка гена *CSN3* эндонуклеазой рестрикции HinfI.

1, 4, 5, 6, 7, 9 — генотип BB;
8 — генотип AA;
2, 3 — генотип AB;
10 — маркер молекулярного веса

Таблица 1. Частота встречаемости *CSN2* и *CSN3* генотипов и аллелей у быков-производителей голштинской породы WWS Russia

Генотип / аллель	Частота встречаемости <i>CSN2</i> генотипов и аллелей у быков-производителей голштинской породы WWS Russia	
	(n=68, каталог 2019 года)	(n=229, каталог 2021 года)
A1A1	0,12	0,04
A1A2	0,37	0,28
A2A2	0,51	0,68
A1	0,31±0,039	0,18±0,018
A2	0,70±0,039	0,82±0,018
AA	0,24	0,20
AB	0,47	0,49
BB	0,29	0,31
A	0,48±0,043	0,45±0,023
B	0,53±0,043	0,56±0,023

хозяйств Краснодарского края, то частота встречаемости *CSN2* аллеля А2 оказалась минимальной (0,57), а *CSN3* аллеля В (0,40) — несколько выше частоты встречаемости этого аллеля в выборке быков-производителей отечественных племенных предприятий. Частота встречаемости аллеля А2 гена *CSN2* в генотипированной выборке коров и телок лишь незначительно выше таковой в голштинской породе, в исследованиях проведенных до 2015 года [4].

Выводы. Таким образом, за последние 2 года произошло увеличение частоты встречаемости аллеля А2 гена бета казеина (в большей степени, + 12%) и В аллеля гена каппа казеина (в меньшей степени, +3%) у быков-производителей компании

WWS. Так как компания World Wide Sires, Ltd — признанный мировой лидер, представляющий порядка 40% лучших быков мира в рейтингах «ТОП 100», с большой долей уверенности можно говорить о том, что одним из направлений мировой селекции голштинского скота является увеличение доли быков-производителей носителей *CSN2* аллелей А2 и *CSN3* аллелей В.

В настоящее время, российские племенные предприятия и хозяйства отстают по данным показателям, однако, проводя целенаправленную селекцию в соответствии с обозначенным трендом, путем подбора соответствующих быков-производителей, можно в следующем поколении увеличить долю животных — носителей ценных генотипов.

Таблица 2. Частота встречаемости *CSN2* и *CSN3* генотипов и аллелей у животных голштинской породы

Генотип / аллель	Частота встречаемости <i>CSN2</i> и <i>CSN3</i> генотипов и аллелей у животных голштинской породы	
	В группе коров и телок, (n=1242)	В группе быков-производителей, (n=297)
A1A1	0.15	0,15
A1A2	0.50	0,45
A2A2	0.31	0,40
A1	0,43±0,010	0,37±0,020
A2	0,57±0,010	0,63±0,020
AA	0,40	0,46
AB	0,40	0,39
BB	0,20	0,15
A	0,60±0,010	0,66±0,019
B	0,40±0,010	0,34±0,019

Литература

- Farrell H. M. Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision / H. M. Farrell, R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, H. E. Swaisgood // J. Dairy Sci. — 2004. — № 87. — P. 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6).
- Kaminski S. Polymorphism of bovine -casein and its potential effect on human health / S. Kaminski, A. Cieslinska, E. Kostyra / J. Appl. Genet. — 2007. — № 48. — P. 189–198. <https://doi.org/10.1007/bf03195213>.
- Cieslinska A. Milk from cows of different Я -casein genotypes as a source of Я-casomorphin-7 / A. Cieslinska, E. Kostyra, H. Kostyra, K. Olenski, E. Fiedorowicz, S. Kaminski // Int. J. Food Sci. Nutr. — 2012. — № 63. — P. 426–430. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.634785>.
- Parashar A. A1 milk and its controversy-a review / A. Parashar, R. K. Saini // International Journal of Bioassays. — 2015. — № 4.12. — P. 4611–4619.
- Cieslinska A. Influence of candidate polymorphisms on the dipeptidyl peptidase IV and opioid receptor genes expression in aspect of the Я -casomorphin-7 modulation functions in autism / A. Cieslinska, E. Sienkiewicz-Szłapka, J. Wasilewska, E. Fiedorowicz, B. Chwała, M. Moszynska-Dumara, E. Kostyra Peptides. — 2015. — № 65. — P. 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.11.012>.
- Petrat-Melin B. In vitro digestion of purified Я -casein variants A(1), A(2), B, and I: Effects on antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory capacity / B. Petrat-Melin, P. Andersen, J. T. Rasmussen, N. A. Poulsen, L. B. Larsen, J. F. Young // J. Dairy Sci. — 2015. — № 98. — P. 15–26. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8330>.

7. Reichelt K. L. Peptides' role in autism with emphasis on exorphins / K. L. Reichelt, D. Tveiten Bio-engineer, A. M. Knivsberg, G. Brønstad // Microb. Ecol. Health D. — 2012. — № 231. — 8958. <https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18958>.
8. Тёпел А. Химия и физика молока: пер. с нем. под ред. С.А. Фильчаковой. Санкт-Петербург: Профессия, 2012. — 832 с.
9. Prinzenberg E. M. Genetic variation in kappa-casein gene (*CSN3*) of Chinese yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of *CSN3* sequences in the genus *Bos* / E. M. Prinzenberg, H. Jianlin, G. Erhardt // J. Dairy Sci. — 2008. — V. 91(3). — P. 1198–1203.
10. Heck J. M. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk / J. M. Heck, A. Schennink, H. J. Van Valenberg, H. Bovenhui, M. H. Visker, J. A. Van Arendonk, et al. // J. Dairy Sci. — 2009. — № 92. — P. 1192–1202. doi: 10.3168/jds.2008-1208.
11. Ковалюк Н. В. Селекция крупного рогатого скота по гену бета-казеина в Краснодарском крае / Н. В. Ковалюк, В. Ф. Сацук, М. А. Ковалюк, Е. В. Мачульская // Генетика и разведение животных. — 2019. — № 1. — С. 22–27. doi: 10.31043/2410-2733-2019-1-22-26.
12. Barroso A. Technical Note: Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C, and E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) / A. Barroso, S. Dunner, J. Canon // J. Anim. Sci. — 1998. — № 76. — P. 1535–1538.

Kovalyuk N.^{1,2}, Altukhova N.¹, Glushchenko M.¹, Solovykh A.¹

Structure of the holstein dairy cattle subpopulation in Russia by locus *CSN2* and *CSN3*

Abstract.

Purpose. to determine the potential of the Russian subpopulation of the Holstein breed in relation to selection by loci of beta- and kappa-casein.

Materials and methods. For loci *CSN2* and *CSN3*, 1,539 Holstein cattle were genotyped, including 1,242 cows and heifers and 297 sires, and information on *CSN2* and *CSN3* genotypes of 297 US bulls was analyzed [World Wide Sires, Ltd].

Results. It has been established that in the last two years there has been an increase in the percentage of sires in WWS with *CSN2* genotypes A2A2 and *CSN3* genotypes BB. Thus, sires allele frequency in the 2019 catalog was 0.51 and 0.29, respectively; and in the 2021 catalog was 0.68 and 0.31, respectively.

Genotyped sires of domestic breeding organizations, which are mostly foreign origin, were characterized by predominance of the A2 allele *CSN2*; in this group the frequency of the allele was 0.63. However, the *CSN3* B allele in the group of sires belonging to domestic organizations was found with a frequency of 0.34, which is 1.6 times lower than that of sires of American origin.

In the genotyped group of Holstein cows and heifers ($n=1242$) belonging to 3 large farms in the Krasnodar Krai, the gene frequency *CSN2* allele A2 was minimal (0.57), and the *CSN3* allele B (0.40) was higher than the allele frequency in the sires group of domestic breeding enterprises.

Conclusion. At present, Russian breeding enterprises and farms are lagging behind in these indicators, however, by conducting targeted selection in accordance with the indicated trend, by selecting the appropriate breeding bulls, it is possible in the next generation to increase the proportion of animals carrying valuable genotypes.

Keywords: *CSN2* gene; *CSN3* gene; allele frequencies; milk production.

Authors:

Kovalyuk N. — Dr. Habil. (Biol. Sci.) ; e-mail: nvk1972@yandex.ru;

Altukhova N. — PhD (Agr. Sci.); e-mail: n.nadeeva@yahoo.com;

Solovykh A. — PhD (Agr. Sci.); e-mail: a.solovykh@rgau-msha.ru;

Glushchenko M. — PhD (Agr. Sci.); e-mail: m.glushenko@rgau-msha.ru.

- ¹ Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine; 350055, Russia, Krasnodar city, Znamensky, Pervomayskaya Str., 4;
- ² Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy; 127434, Russia, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49.

References

1. Farrell H. M. Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision / H. M. Farrell, R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, H. E. Swaisgood // *J. Dairy Sci.* — 2004. — № 87. — P. 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6).
2. Kaminski S. Polymorphism of bovine κ -casein and its potential effect on human health / S. Kaminski, A. Cieslinska, E. Kostyra / *J. Appl. Genet.* — 2007. — № 48. — P. 189–198. <https://doi.org/10.1007/bf03195213>.
3. Cieslinska A. Milk from cows of different κ -casein genotypes as a source of κ -casomorphin-7 / A. Cieslinska, E. Kostyra, H. Kostyra, K. Olenski, E. Fiedorowicz, S. Kaminski // *Int. J. Food Sci. Nutr.* — 2012. — № 63. — P. 426–430. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.634785>.
4. Parashar A. A1 milk and its controversy—a review / A. Parashar, R. K. Saini // *International Journal of Bioassays.* — 2015. — № 4.12. — P. 4611–4619.
5. Cieslinska A. Influence of candidate polymorphisms on the dipeptidyl peptidase IV and opioid receptor genes expression in aspect of the κ -casomorphin-7 modulation functions in autism / A. Cieslinska, E. Sienkiewicz-Szłapka, J. Wasilewska, E. Fiedorowicz, B. Chwała, M. Moszynska-Dumara, E. Kostyra *Peptides.* — 2015. — № 65. — P. 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.11.012>.
6. Petrat-Melin B. In vitro digestion of purified κ -casein variants A(1), A(2), B, and I: Effects on antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory capacity / B. Petrat-Melin, P. Andersen, J. T. Rasmussen, N. A. Poulsen, L. B. Larsen, J. F. Young // *J. Dairy Sci.* — 2015. — № 98. — P. 15–26. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8330>.
7. Reichelt K. L. Peptides' role in autism with emphasis on exorphins / K. L. Reichelt, D. Tveiten Bioengineer, A. M. Knivsberg, G. Brønnstad // *Microb. Ecol. Health D.* — 2012. — № 231. — P. 8958. <https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18958>.
8. Tepel A. Chemistry and Physics of Milk: trans. with him. ed. S.A. Filchakova. St. Petersburg: Profession, 2012. — 832 p.
9. Prinzenberg E. M. Genetic variation in kappa-casein gene (CSN3) of Chinese yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of CSN3 sequences in the genus *Bos* / E. M. Prinzenberg, H. Jianlin, G. Erhardt // *J. Dairy Sci.* — 2008. — V. 91(3). — P. 1198–1203.
10. Heck J. M. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk / J. M. Heck, A. Schennink, H. J. Van Valenberg, H. Bovenhui, M. H. Visker, J. A. Van Arendonk, et al. // *J. Dairy Sci.* — 2009. — № 92. — P. 1192–1202. doi: 10.3168/jds.2008-1208.
11. Kovalyuk N. V. Breeding of cattle by the beta-casein gene in the Krasnodar Territory / N. V. Kovalyuk, V. F. Satsuk, M. A. Kovalyuk, E. V. Machulskaya // *Genetics and animal breeding.* — 2019. — № 1. — P. 22–27. doi: 10.31043/2410-2733-2019-1-22-26
12. Barroso A. Technical Note: Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C, and E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) / A. Barroso, S. Dunner, J. Canon // *J. Anim. Sci.* — 1998. — № 76. — P. 1535–1538.