

Badania polimorfizmu ukraińskiego bydła rasy holsztyńskiej

✉ NATALIA SHKAVRO¹, ✉ ANNA KOZUBSKA-SOBOCIŃSKA², ✉ DOMINIKA RUBIŚ²,
ALISA SHKAVRO³, ✉ MAREK BABICZ⁴, ✉ OLENA SHCHERBAK⁵,
✉ IWONA ŁUSZCZEWSKA-SIERAKOWSKA⁶

¹Institut of Animal Science, National Academy of Agrarian Sciences, Tvarynnykiv, 1-A, Kharkov, 61026, Ukraine

²Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt, Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice, Polska

³Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gołębia 24, 31-007 Kraków, Polska

⁴Katedra Hodowli Zwierząt i Doradztwa Rolniczego, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin, Polska

⁵Kharkov State Veterinary Academy, 1 Mala Danylivka, Derhachivsky Raion, Kharkov Region, 62341, Ukraine

⁶Zakład Anatomii Prawidłowej, Uniwersytet Medyczny, ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, Polska

Otrzymano 11.03.2022

Zaakceptowano 11.08.2022

Shkavro N., Kozubska-Sobocińska A., Rubiś D., Shkavro A.,
Babicz M., Shcherbak O., Łuszczewska-Sierakowska I.

Ukrainian Holstein cattle DNA polymorphism study

Summary

The aim of the research was to evaluate the genetic structure of Ukrainian Holstein cattle ($n = 150$) of the state enterprise Chayka (Kiev region, Ukraine) on the basis of the analysis of 12 microsatellite DNA loci and 3 QTL genes: *k*-casein (*CSN3*), prolactin (*PRL*), and fatty acid synthase (*FASN*). A total of 93 allelic variants were identified, and the largest number of alleles were found for TGLA53, TGLA122 and TGLA227 loci, the mean PIC = 0.693, and the heterozygosity index for all loci was 0.7314. The greatest number of effective alleles per locus were found for the BM1824 locus. Based on association analyses, complex genotypes were established for the three genes (*CSN3*, *PRL*, *FASN*). It was found that the $AA^{PRL} AA^{CSN3} AA^{FASN}$ genotype determined the highest milk yield (8351 kg/lactation) and the protein content in milk (3.10%), whereas the $AA^{PRL} AB^{CSN3} GG^{FASN}$ genotype determined the highest level of fat content in milk (3.80%).

Keywords: Ukrainian Holstein cattle, polymorphism, microsatellite loci, genes *CSN3*, *PRL*, *FASN*, milk yield

Badania polimorfizmu DNA polegające na ocenie genomowej zmienności allelicznej, w połączeniu z analizami asocjacyjnymi pozwalają na precyzyjne określenie potencjału genetycznego zwierząt, a także dostarczają nowoczesnych narzędzi selekcyjnych. Wskazanie alleli warunkujących ważne, z punktu widzenia hodowli, cechy użytkowe umożliwiają prowadzenie selekcji preferującej genotypy gwarantujące szybki postęp hodowlany (17, 18).

Istotnym źródłem markerów genetycznych są krótkie tandemowe powtórzenia (STR – short tandem repeat), charakteryzujące się wysokim stopniem polimorfizmu, losowym rozmieszczeniem w genomie, a ich zmienność jest efektem mutacji i dryfu genetycznego (10).

Od połowy lat 90. ub. wieku International Society for Animal Genetics (ISAG) rekomenduje do analiz polimorfizmu STR u różnych ras bydła mięsnego i mlecznego, panel 12 markerów mikrosatelitarnych:

BM1814, BM1818, BM2113, ETH3, ETH10, ETH225, INRA023, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126, TGLA227. Dzięki standaryzacji i weryfikacji przez ISAG testów genetycznych polimorfizmu STR wyniki uzyskiwane w różnych laboratoriach są powtarzalne, porównywalne i uznawane na całym świecie (18).

Rozwój nowoczesnej genetyki molekularnej umożliwił identyfikację genów warunkujących istotne ekonomicznie cechy użytkowe. Wskazywanie genów związanych z określoną cechą ilościową QTL (Quantitative Trait Loci) zapewnia możliwość przewidywania i modelowania potencjału genetycznego młodych zwierząt na podstawie kluczowych wskaźników wydajności, co realizowane jest poprzez selekcję par rodzicielskich, selekcję określonych genotypów oraz selekcję związaną z markerem (MAS) (1, 8, 15, 19).

Zagadnienia związane z jakością mleka stanowią istotny obszar badań z zakresu hodowli bydła mlecznego.

go. W ramach modelowego systemu determinacji genetycznej wydajności mlecznej najczęściej prowadzono kompleksową ocenę polimorfizmu genów kappa-kazeiny (związanych z jakością białek mleka), prolaktyny (warunkującej ogólną wydajność mleka i zawartość tłuszczu w mleku) oraz syntazy kwasów tłuszczowych (związanej z regulacją składu kwasów tłuszczowych mleka) przy wykorzystaniu techniki PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (2, 5-7, 9, 11, 13, 16-18).

Celem pracy była ocena struktury genetycznej bydła ukraińskiego rasy holsztyńskiej przeprowadzona na podstawie analizy polimorfizmu DNA 12 *loci* mikrosatelitarnych oraz wybranych genów cech ilościowych (kappa kazeiny – *CSN3*, prolaktyny – *PRL* i syntazy kwasów tłuszczowych – *FASN*).

Materiał i metody

Badaniami objęto populację bydła ukraińskiego rasy holsztyńskiej (150 sztuk) pochodzącą z trzech gospodarstw SE Chayka – filie: Chemerz regionu kozieleckiego obwodu czernihowskiego, Dudarkiv z obwodu boryspolskiego i Lisne z regionu kijowsko-światoszyńskiego obwodu Kijów.

Analizy molekularne genów *CSN3*, *PRL* i *FASN* przeprowadzono dla całej populacji doświadczalnej, natomiast wskaźniki produkcyjności mlecznej oznaczono tylko u krów będących w okresie laktacji (91 sztuk), uwzględniając dane z wszystkich laktacji dotyczące całkowitej wydajności mleka (kg/laktację), zawartość tłuszczu (%) oraz zawartość białka (%).

DNA izolowano z pełnej krwi obwodowej przy użyciu zestawu Diatom DNA Prep 100 (Biokom). Polimorfizm mikrosatelitarnego DNA szacowano na podstawie rekomendowanego przez ISAG panelu 12 markerów mikrosatelitarnych: BM1818, BM1824, BM2113, INRA023, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126, TGLA227, ETH3, ETH10, ETH225. *Loci* mikrosatelitarne analizowano metodą multipleksowej reakcji PCR przy użyciu zestawu Qiagen Type-it Microsatellite PCR Kit i starterów znakowanych fluorescencyjnie. Analizę fragmentów DNA przeprowadzono w 24-kapilarnym analizatorze genetycznym 3500xL (Applied Biosystems). Dane analizowano przy użyciu oprogramowania GeneMapper® Software 5.0 (Applied Biosystems). Polimorfizm genów kappa-kazeiny (*CSN3*), prolaktyny (*PRL*) i syntazy kwasów tłuszczowych (*FASN*) identyfikowano metodą PCR-RFLP. Do amplifikacji zastosowano następujące startery: *K-CSN*: 5'-gaaarccctaccaracc-3'; 5'-ccatctactactagtttagatg-3' (5) w warunkach temperaturowych: 94°C – 4 min; 94°C – 30 s, 58°C – 30 s, 72°C – 30 s (35 cykli); 72°C – 5 min; *PRL*: 5'-cgagtccttatgagcttgattctt-3'; 5'-gccttcagaagtcgtt-gttttt-3' (6) w temperaturze: 95°C – 5 min; 94°C – 30 s, 58°C – 30 s, 72°C – 30 s (35 cykli); 72°C – 7 min; *FASN1*: 5'-ttaagggcaccttagcttg-3'; 5'-gcctttggaggcttcttag-3' (1) w warunkach temperaturowych: 94°C – 4 min; 95°C – 30 s, 55°C – 30 s, 72°C – 30 s (35 cykli); 72°C – 5 min. Produkty PCR poddano amplifikacji z zastosowaniem specyficznych restrykcyjnych endonukleaz (Fermentas, Litwa): *Hind* III dla genu kappa-kazeiny, *Rsa* I dla genu prolaktyny i *Hha* I

dla genu syntazy kwasów tłuszczowych, według schematu: woda – 3,5 µl, 10 × bufor dla enzymu – 1,0 µl, enzym restrykcyjny – 0,5 µl i 5,0 µl. Wizualizację wyników przeprowadzono metodą rozdziału elektroforetycznego fragmentów DNA w 2% żelu agarozowym w buforze 1 × TBE i barwieniu bromkiem etydyny.

Analizy asocjacyjne dotyczyły zidentyfikowanych genotypów w *loci* kappa-kazeiny, prolaktyny i syntazy kwasów tłuszczowych oraz wskaźników wydajności mlecznej zwierząt doświadczalnych (całkowita wydajność mleka w laktacji, zawartość tłuszczu i białka w mleku). Badaniami objęto wszystkie krowy w okresie laktacji (91 sztuk).

Do określenia częstości alleli i genotypów analizowanych genów wykorzystano metodę bezpośredniego liczenia. Stan równowagi Hardy'ego-Weinberga, sprawdzano stosując test chi-kwadrat (χ^2) z użyciem GenAlEx 6.5 (14). Wyniki badań mikrosatelitarnego DNA poddano analizie statystycznej przy użyciu Tfpga 2000 wersja 1.3 (Tools for Population Genetic Analyses). W obliczeniach asocjacyjnych stosowano pakiet statystyczny PRISM Graph Pad (test ANOVA).

Wyniki i omówienie

Na podstawie oceny polimorfizmu 12 markerów mikrosatelitarnych DNA w populacji bydła ukraińskiego rasy holsztyńskiej zidentyfikowano łącznie 93 allele. Dla każdego *locus* obliczono wskaźniki zmienności genetycznej, tj.: liczbę alleli, obserwowaną heterozygotyczność (H_o) i indeks stopnia polimorfizmu (PIC) (3). Największą liczbę alleli zaobserwowano w *locus* TGLA53 (14 alleli) oraz w *loci* TGLA227 i TGLA122 (odpowiednio: 11 i 10 alleli). Równomierny rozkład alleli wykazano w pozostałych *loci*, natomiast najmniejszą liczbą (5 alleli) charakteryzowały się sekwencje mikrosatelitarne TGLA126 i BM1824. Obliczono częstość występowania alleli w poszczególnych *loci*, a wartości analizowanych parametrów zestawiono w tabeli 1.

Dla najbardziej polimorficznego *locus* TGLA53 najwyższą frekwencję (0,205) odnotowano dla allelu o długości 162 pz i tylko trzy kolejne warianty alleliczne (186, 176 i 160 pz) występowały z częstości od 0,141 do 0,188, współczynnik heterozygotyczności wynosił poniżej 0,900, a liczba efektywnych alleli (E) poniżej 7. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Brenigai Schütza (4) dla populacji bydła niemieckiego rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, w której również najczęściej rejestrowano wariant alleliczny 176 pz. Podobne wartości dla bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, dotyczące liczby alleli (11) i indeksu polimorficzności (PIC) równego 0,834 przedstawili Radko i wsp. (15). Z kolei badania Zhang i wsp. (19), przeprowadzone na populacji bydła chińskiego rasy holsztyńskiej, wykazały w *locus* TGLA53 taką samą liczbę alleli wynoszącą 11 i nieco niższy PIC równy 0,791. W badaniach własnych charakteryzujących ukraińskie bydło rasy holsztyńskiej z najniższą częstością występowały allele 164, 182 pz (frekwencja 0,007) oraz 154, 172 pz (frekwencja 0,010).

Dla *locus* TGLA227 zidentyfikowano 11 wariantów allelicznych o długości od 77 do 103 pz, wśród których z największą częstością reprezentowane były allele 97 pz (0,299), 91 pz (0,198) i 89 pz (0,185). *Locus* TGLA227 był również bardzo polimorficzny u bydła niemieckiego rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (16 wariantów), gdzie najwyższą frekwencję wykazywał allel o wielkości 89 pz (0,264) (4).

Znaczącą liczbę alleli (10 wariantów) zarejestrowano dla *locus* TGLA 122. Dla pozostałych *loci* wykazano równomierny rozkład alleli od 5 do 8, z najwyższą częstością wariantu o wielkości 117 pz (0,587) dla *locus* TGLA126, 248 pz (0,537) dla *locus* SPS115, 117 pz (0,470) w *locus* ETH3, 219 pz (0,470) dla *locus* ETH10, 188 pz (0,369) dla *locus* BM1824 – te wartości

były zbliżone do odnotowanych dla bydła niemieckiego rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (4). W kolejnym *locus* BM1818 najwyższą frekwencję (0,456) wykazywał allel 266 pz, w *locus* ETH225 wariant 148 pz (0,376), a w INRA23 allel 214 pz (0,359).

Locus BM2113 był reprezentowany przez 7 alleli z najwyższą frekwencją allelu 125 pz (0,302) i nieco niższą (0,232) allelu 135 pz, co jest zgodne z danymi podawanymi przez Breniga i wsp. (4). Indeks PIC również podobny jest do określonego przez Zhang i wsp. (20) dla bydła chińskiego, a także Movahedina i wsp. (12) dla irańskiego bydła holsztyńskiego (odpowiednio: 0,726 i 0,724). Podobieństwa dotyczyły również *locus* TGLA126, w którym najczęściej identyfikowano allele 117 pz i 115 pz, jednak PIC dla tego *locus* był

Tab. 1. Charakterystyka *loci* mikrosatelitarnego DNA bydła ukraińskiego rasy holsztyńskiej (n = 150)

Locus	Liczba alleli	Allele (pz)	Częstość alleli (średnia ± SE)	PIC	H	E	Fis
TGLA 227	11	77	0,003 ± 0,003	0,795	0,817	5,479	0,183
		81	0,060 ± 0,014				
		83	0,094 ± 0,017				
		87	0,057 ± 0,013				
		89	0,185 ± 0,022				
		91	0,198 ± 0,023				
		93	0,010 ± 0,006				
		95	0,007 ± 0,005				
		97	0,299 ± 0,027				
		99	0,030 ± 0,010				
		103	0,057 ± 0,013				
BM 2113	7	125	0,302 ± 0,027	0,757	0,788	4,727	0,212
		127	0,201 ± 0,023				
		131	0,003 ± 0,003				
		133	0,040 ± 0,011				
		135	0,232 ± 0,024				
		137	0,114 ± 0,018				
		139	0,107 ± 0,018				
TGLA 53	14	154	0,010 ± 0,006	0,837	0,853	6,820	0,147
		158	0,030 ± 0,010				
		160	0,188 ± 0,023				
		162	0,205 ± 0,023				
		164	0,007 ± 0,005				
		166	0,067 ± 0,014				
		168	0,084 ± 0,016				
		170	0,030 ± 0,010				
		172	0,010 ± 0,006				
		174	0,013 ± 0,007				
		176	0,188 ± 0,023				
		182	0,007 ± 0,005				
		184	0,020 ± 0,008				
		186	0,141 ± 0,020				
ETH 10	8	209	0,020 ± 0,008	0,685	0,715	3,513	0,285
		213	0,101 ± 0,017				
		215	0,010 ± 0,006				
		217	0,198 ± 0,023				
		219	0,470 ± 0,029				
		221	0,047 ± 0,012				
		223	0,081 ± 0,016				
		225	0,074 ± 0,015				
SPS 115	6	248	0,537 ± 0,029	0,585	0,633	2,727	0,367
		252	0,225 ± 0,024				
		254	0,148 ± 0,021				
		256	0,077 ± 0,015				
		258	0,007 ± 0,005				
		260	0,007 ± 0,005				

Locus	Liczba alleli	Allele (pz)	Częstość alleli (średnia ± SE)	PIC	H	E	Fis
TGLA 126	5	115	0,248 ± 0,025	0,526	0,580	2,381	0,420
		117	0,587 ± 0,029				
		119	0,050 ± 0,013				
		121	0,104 ± 0,018				
		123	0,010 ± 0,006				
TGLA 122	10	139	0,010 ± 0,006	0,802	0,824	5,695	0,176
		141	0,003 ± 0,003				
		143	0,275 ± 0,026				
		149	0,185 ± 0,022				
		151	0,141 ± 0,020				
		153	0,003 ± 0,003				
		161	0,107 ± 0,018				
		163	0,161 ± 0,021				
		171	0,027 ± 0,009				
		183	0,087 ± 0,016				
INRA 23	7	200	0,034 ± 0,010	0,683	0,729	3,689	0,271
		202	0,084 ± 0,016				
		206	0,315 ± 0,027				
		208	0,020 ± 0,008				
		210	0,185 ± 0,022				
		214	0,359 ± 0,028				
ETH 3	6	216	0,003 ± 0,003	0,664	0,702	3,353	0,298
		117	0,470 ± 0,029				
		119	0,030 ± 0,010				
		121	0,037 ± 0,011				
		125	0,104 ± 0,018				
		127	0,181 ± 0,022				
ETH 225	7	129	0,178 ± 0,022	0,697	0,734	3,766	0,266
		140	0,084 ± 0,016				
		142	0,007 ± 0,005				
		144	0,101 ± 0,017				
		146	0,040 ± 0,011				
		148	0,376 ± 0,028				
		150	0,315 ± 0,027				
		152	0,077 ± 0,015				
BM 1824	5	178	0,154 ± 0,021	0,681	0,728	3,679	0,272
		180	0,161 ± 0,021				
		182	0,292 ± 0,026				
		188	0,369 ± 0,028				
		190	0,023 ± 0,009				
BM 1818	7	258	0,037 ± 0,011	0,610	0,665	2,983	0,335
		260	0,030 ± 0,010				
		262	0,342 ± 0,027				
		264	0,040 ± 0,011				
		266	0,456 ± 0,029				
		268	0,074 ± 0,015				
		270	0,020 ± 0,008				

niższy niż określony dla populacji irańskiego bydła holsztyńskiego (0,687) (12).

Z przeprowadzonych zestawień wynika, że *loci* TGLA53, TGLA 122 i TGLA227 charakteryzowały się najwyższymi indeksami polimorficzności i wskaźnikami heterozygotyczności, co nie koresponduje z danymi uzyskanymi przez autorów irańskich. Przyczyną tej niezgodności może być zbyt mała liczebność populacji doświadczalnej irańskiego bydła holsztyńskiego (68 sztuk bydła) lub wprowadzenie genów ze źródła zewnętrznego, ze względu na stosowanie inseminacji (12).

Charakterystyka bydła ukraińskiego rasy holsztyńskiej, określająca frekwencję alleli w 12 *loci* mikrosatelitarnego DNA, będzie cennym źródłem informacji, przydatnym w weryfikacji pochodzenia osobników należących do tej grupy rasowej, a także będzie stanowić podstawę do aktualizacji danych o nasyceniu populacji przez określone markery. Obliczone w niniejszym badaniu podstawowe parametry genetyczne (tab. 1) wykazały, że badana populacja charakteryzowała się wysokimi wartościami PIC obliczonymi dla każdego markera przekraczającymi średnio 0,693, przy wartościach minimalnych dla *locus* TGLA126 (0,526), natomiast stopień heterozygotyczności (H_o) wahał się od 58,0% do aż 83,5%. Kolejne *locus* BM1824 ze średnimi wartościami PIC i H_o (odpowiednio: 0,681 i 0,728) charakteryzowało się największą liczbą efektywnych alleli (E) (3,679, czyli około 4 z 5 dostępnych).

W *locus* TGLA227, o dużej liczbie wykrytych alleli ($n = 11$), liczba alleli efektywnych była znacznie niższa ($E = 5,479$). Podobne wartości tych parametrów zaobserwowano dla *loci* BM1818 i TGLA126. Istotnie różniły się te wskaźniki w odniesieniu do *loci* TGLA122 i BM2113 (odpowiednio: PIC = 0,802, $H = 0,24$, $E = 5,695$ i 0,757; 0,788; 4,727). Dla pozostałych *loci* liczba efektywnych alleli wahała się od 2,727 (*locus* SPS115) do 3,766 (*locus* ETH225). Na podstawie wartości PIC i H_o stwierdzono, że badane mikrosatelitarne sekwencje DNA charakteryzowały się wysokim stopniem polimorfizmu. Współczynnik inbredu Wrighta (F_{is}) dla wszystkich badanych *loci* mikrosatelitarnych był dodatni z najwyższą wartością dla TGLA126 (0,420).

Wyniki analizy molekularnej genów kappa-kazeiny, prolaktyny i syntazy kwasów tłuszczowych w populacji doświadczalnej (całe stado – 150 sztuk) przedstawiono w tab. 2. Z kolei wskaźniki produkcyjności mlecznej oznaczono u wszystkich krów będących w okresie laktacji (91 sztuk), uwzględniając dane ze wszystkich laktacji dotyczące całkowitej wydajności mleka (kg/laktacja), zawartości tłuszczu (%) oraz zawartości białka (%) (tab. 3).

W badanej populacji gen kappa-kazeiny (*CSN3*) charakteryzował się dominującą częstością allelu A

Tab. 2. Struktura genetyczna badanej populacji bydła rasy holsztyńskiej ($n = 150$) na podstawie genów cech ilościowych

QTL	Częstość alleli		Częstość genotypów		
CSN3	A	B	AA	AB	BB
	0,823 ± 0,001	0,177 ± 0,003	0,673 ± 0,002	0,300 ± 0,005	0,027 ± 0,006
PRL	A	B	AA	AB	BB
	0,820 ± 0,001	0,180 ± 0,003	0,660 ± 0,002	0,320 ± 0,005	0,020 ± 0,007
FASN	A	G	AA	AG	GG
	0,847 ± 0,001	0,153 ± 0,003	0,740 ± 0,002	0,213 ± 0,005	0,047 ± 0,006

Tab. 3. Wskaźniki wydajności mlecznej bydła ukraińskiego rasy holsztyńskiej dla różnych genotypów w *loci* CSN3, PRL i FASN

Genotyp	n	Wydajność mleka kg/laktację	Tłuszcz %	Białko %
AA ^{CSN3}	68	8068,65 ± 152,00 ^a	3,70 ± 0,03	3,09 ± 0,02 ^a
AB ^{CSN3}	22	7764,86 ± 152,00 ^b	3,65 ± 0,03	3,05 ± 0,02 ^b
BB ^{CSN3}	1	7764,00	3,72	3,08
wartość p		0,007	0,104	0,036
AA ^{PRL}	61	8267,33 ± 276,04 ^a	3,66 ± 0,03	3,08 ± 0,01
AB ^{PRL}	28	7430,64 ± 276,04 ^b	3,75 ± 0,03	3,07 ± 0,01
BB ^{PRL}	2	7447,02 ± 276,04 ^b	3,75 ± 0,03	3,09 ± 0,01
wartość p		0,049	0,155	0,151
AA ^{FASN}	73	8080,82 ± 326,30	3,68 ± 0,03	3,08 ± 0,01
AG ^{FASN}	14	7812,57 ± 326,30	3,69 ± 0,03	3,07 ± 0,01
GG ^{FASN}	4	6995,75 ± 326,30	3,87 ± 0,03	3,10 ± 0,01
wartość p		0,059	0,121	0,159
Średnio		7991,86 ± 109,23	3,69 ± 0,02	3,08 ± 0,01

Objaśnienie: ^{a, b} – $p < 0,05$; BB^{CSN3} – genotyp nie uwzględniony w obliczeniach statystycznych, ponieważ wystąpił tylko raz

($q = 0,823 \pm 0,001$), co jest związane ze zwiększoną całkowitą wydajnością mleka, natomiast częstość allelu B wynosiła $0,177 \pm 0,003$ (tab. 2). Należy zaznaczyć, że w selekcji genomowej allel B jest uważany za pożądany, a genotyp BB warunkuje korzystne parametry technologiczne produkcji białka mleka, to jednak populacje bydła holsztyńskiego charakteryzują się zwykle mniejszym niż 20% udziałem tego allelu. U większości badanych zwierząt określono homozygotyczny genotyp AA (67,3%), u około 30,0% – heterozygotyczny AB, natomiast tylko u 2,7% ($q = 0,027$) stwierdzono homozygotyczny genotyp BB, który jest genotypem pożądanym, gdyż determinuje m.in. wysoką jakość serów. Uzyskane wyniki są zbliżone do podanych przez Bonvillani i wsp. (2) dla 12 stad holsztyńskich w Argentynie oraz do wyników analiz Gurses i wsp. (7), dotyczących różnych populacji, w tym bydła hodowanego w Turcji.

Gen prolaktyny (*PRL*) charakteryzował się wysoką frekwencją allelu A ($0,820 \pm 0,001$), a pożądany allel B występował z częstością $0,180 \pm 0,003$ (tab. 2). Wśród badanych krów prawie 66% miało genotyp AA, o połowę mniej było heterozygot AB ($q = 0,320$

$\pm 0,005$), natomiast homozygoty BB stanowiły tylko 2% populacji ($0,020 \pm 0,007$).

Dla genu syntazy kwasów tłuszczowych (*FASN*) wykazano wyższą frekwencję allelu A ($0,847 \pm 0,001$) w porównaniu z allelem G ($0,153 \pm 0,003$), a także określono frekwencję homozygotycznego genotypu AA na poziomie 74% ($0,740 \pm 0,002$).

Wskaźniki produkcyjności mlecznej badanej populacji (91 krów w okresie laktacji) w zależności od genotypu w *loci* genu kappa-kazeiny, prolaktyny i syntazy kwasów tłuszczowych przedstawiono w tab. 3. Stwierdzono powiązania asocjacyjne niektórych wariantów genotypowych genów *CSN3*, *PRL* i *FASN* z cechami produkcyjnymi. Różnice w wartościach poszczególnych cech między analizowanymi genotypami były statystycznie nieistotne dla wskaźników tłuszczu i również nieistotne dla poziomu białka w odniesieniu do *PRL* i *FASN*. Wykazano, że zwierzęta o genotypie homozygotycznym GG w *locus FASN* charakteryzowały się najwyższą średnią zawartością białka i tłuszczu w mleku (odpowiednio: 3,10% i 3,87%) oraz najniższą wydajnością mleczną na poziomie 6995,75 kg mleka za laktację.

Analiza genotypów w *locus* kappa-kazeiny wykazała, że genotyp AA warunkował najwyższą średnią wydajność mleka i zawartość białka w mleku (odpowiednio: 8068,65 kg/laktację i 3,09%), a genotyp BB najwyższy poziom tłuszczu w mleku (3,72%).

Z kolei zwierzęta o genotypach AB i BB genu prolaktyny charakteryzowały się wysoką zawartością tłuszczu w mleku (3,75%), a homozygoty BB najwyższą zawartością białka w mleku (3,09%), natomiast homozygoty AA najwyższą wydajnością mleka, znacznie przekraczającą średnią (8267,33 kg/laktację).

W tab. 4. zestawiono różne warianty genotypowe dla *loci CSN3*, *PRL* i *FASN* warunkujące cechy użytkowości mlecznej. Wykazano, że złożony genotyp $AA^{PRL}AA^{CSN3}AA^{FASN}$ (dla genów kappa-kazeiny – *CSN3*, prolaktyny – *PRL* i syntazy kwasów tłuszczowych – *FASN*) charakteryzował się najwyższymi wskaźnikami wydajności mleka (8351,46 kg/laktację) i zawartości białka w mleku (3,1%). Najniższe wskaźniki wydajności mleka (6938,33 kg/laktację) przy jednocześnie najwyższym poziomie tłuszczu w mleku (3,80%) stwierdzono u zwierząt o genotypie $AA^{PRL}AB^{CSN3}GG^{FASN}$. Wysoki poziom tłuszczu i białka w mleku określono u krów o genotypach $AA^{PRL}AB^{CSN3}AA^{FASN}$ i $AA^{PRL}AA^{CSN3}AG^{FASN}$ (odpowiednio: 3,75% i 3,09%). Genotyp $AB^{PRL}AA^{CSN3}AA^{FASN}$ występował u zwierząt o minimalnej wartości tych wskaźników (odpowiednio: 3,59% i 3,03%) i wysokiej mleczności (8005,31 kg/laktację). Zwierzęta z innymi wariantami genotypów charakteryzowały się średnią zawartością tłuszczu i białka w mleku. Najczęstszą formułą genotypową identyfikowaną w badanej po-

Tab. 4. Wskaźniki produkcyjności mlecznej bydła ukraińskiego rasy holsztyńskiej dla złożonych wariantów genotypowych w *loci PRL*, *CSN3* i *FASN*

Genotyp (<i>PRL</i> , <i>CSN3</i> , <i>FASN</i>)	n	Wydajność mleka kg/laktację	Tłuszcz %	Białko %
$AA^{PRL}AA^{CSN3}AA^{FASN}$	46	8351,65 $\pm$ 146,12	3,68 $\pm$ 0,02	3,10 $\pm$ 0,01
$AA^{PRL}AB^{CSN3}AA^{FASN}$	20	7480,35 $\pm$ 212,86	3,75 $\pm$ 0,05	3,07 $\pm$ 0,02
$AA^{PRL}BB^{CSN3}AA^{FASN}$	2	7447,00 $\pm$ 836,00	3,75 $\pm$ 0,03	3,09 $\pm$ 0,00
$AB^{PRL}AA^{CSN3}AA^{FASN}$	13	8005,31 $\pm$ 277,53	3,59 $\pm$ 0,07	3,03 $\pm$ 0,03
$AB^{PRL}AB^{CSN3}AA^{FASN}$	6	7466,83 $\pm$ 459,72	3,69 $\pm$ 0,01	3,06 $\pm$ 0,02
$AA^{PRL}AA^{CSN3}AG^{FASN}$	10	8126,90 $\pm$ 294,34	3,69 $\pm$ 0,06	3,09 $\pm$ 0,03
$AA^{PRL}AB^{CSN3}GG^{FASN}$	3	6938,33 $\pm$ 320,90	3,80 $\pm$ 0,15	3,06 $\pm$ 0,03
$AA^{PRL}AB^{CSN3}AG^{FASN}$	2	6659,00 $\pm$ 537,00	3,67 $\pm$ 0,00	3,02 $\pm$ 0,01
Średnio		7991,86 $\pm$ 109,23	3,69 $\pm$ 0,02	3,08 $\pm$ 0,01
wartość p	n	0,035	0,0001	0,0001

Objaśnienie: # – genotyp nie uwzględniony w obliczeniach statystycznych

populacji był genotyp $AA^{PRL}AA^{CSN3}AA^{FASN}$ (50,5%), charakterystyczny dla najwyższej całkowitej wydajności mleka i zawartości białka, ale niższego poziomu tłuszczu w mleku.

Przeprowadzone badania potwierdziły przydatność wybranych mikrosatelitarnych markerów DNA (TGLA53, TGLA227 i TGLA122) dla charakterystyki genetycznej bydła ukraińskiego rasy holsztyńskiej oraz wskazały na możliwość wykorzystania w selekcji MAS konkretnych zestawień genotypów z *loci CSN3*, *PRL* i *FASN*.

Piśmiennictwo

1. Abe T., Saburi J., Hasebe H., Nakagawa T., Kawamura T., Saito K., Nade T., Misumi S., Okumura T., Kuchida K., Hayashi T., Nakane S., Mitsuhashi T., Nirasawa K., Sugimoto Y., Kobayashi E.: Bovine quantitative trait loci analysis for growth, carcass, and meat quality traits in an F2 population from a cross between Japanese Black and Limousin. J. Anim. Sci. 2008, 86, 2821-2832.
2. Bonvillani A. G., Di Renzo M. A., Tiranti I. N.: Genetic polymorphism of milk protein loci in Argentinian Holstein cattle. Genet. Mol. Biol. 2000, 23 (4), 819-823.
3. Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Hum. Genet. 1980, 32 (3), 314-331.
4. Brenig B., Schütz E.: Recent development of allele frequencies and exclusion probabilities of micro satellites used for parentage control in the German Holstein Friesian cattle population. BMC Genetics 2016, 17 (1), 18, 2-9.
5. Contreras V. P., Jaramillo D. L., Bracamonte G. M., González J. C. M., Rincón A. M. S.: Convenient genotyping of nine bovine K-casein variants. Electr. J. Biotech. 2011, 14 (4), 1-6.
6. Dybus A., Grzesiak W., Kamieniecki H., Szatkowska I., Sobek Z., Błaszczak P., Czerniawska-Piątkowska E., Zych S., Muszyńska M.: Association of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle. Arch. Tierz. 2005, 48 (2), 149-156.
7. Gurses M., Yuce H., Etem E. O., Patir B.: Polymorphisms of kappa-casein gene and their effects on milk production traits in Holstein, Jersey and Brown Swiss cattle. Anim. Prod. Sci. 2016, 58 (5), 778-784.
8. Kopylov K. V.: Polimorfizm of genes associated with economically useful signs (QTL) of breeds cattle. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology 2010, 12, 3 (45), 52-58.
9. Lewin H. A., Schmitt K., Hubert R.: Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes mapping in cattle by single sperm typing. Genomics 1992, 13, 44-48.
10. Mariani S., Bekkevold D.: The nuclear genome: neutral and adaptive markers in fisheries/Stock identification methods: applications in fishery science

- (eds Cadrin S. X., Kerr L. A., Mariani S.). 2nd edn., Academic Press, Elsevier 2014, 297-328.
11. Matsuhashi T., Maruyama S., Uemoto Y., Kobayashi N., Mannen H., Abe T., Sakaguchi S., Kobayashi E.: Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-co-enzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *J. Anim. Sci.* 2011, 89, 12-22.
 12. Movahedin M., Amirinia C., Noshary A., Mirhadi S. A.: Detection of genetic variation in sample of Iranian proofed Holstein cattle by using microsatellite marker. *Afr. J. Biotechnol.* 2011, 9 (53), 9042-9045.
 13. Onal O., Kepenek E., Dinc H., Ozer F.: Growth hormone (GH), prolactin (PRL), and diacylglycerolacyltransferase (DGAT1) gene polymorphisms in Turkish native cattle breeds. *Turk. J. Zool.* 2015, 39 (5), 734-748.
 14. Peakall R., Smouse P. E.: Gen AlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 2012, 28, 2537-2539.
 15. Radko A., Zyga A., Zabek T., Slota E.: Genetic variability among Polish Red, Hereford and Holstein-Friesian cattle raised in Poland based on analysis of microsatellite DNA sequences. *J. Appl. Genet.* 2005, 46 (1), 89-91.
 16. Sermyagin A. A., Gladyr' E. A., Kharitonov S. N., Ermilov A. N., Strekozov N. I., Brem G., Zinovieva N. A.: Genome-wide association study for milk production and reproduction traits in Russian Holstein cattle population. *Agric. Biol.* 2015, 51 (2), 182-193.
 17. Shkavro N.: The main productive traits of Simmental cattle association with the kappa-casein and growth hormone genes polymorphism. *Scientific Herald of the Lugansk National Agrarian University, Series "Agricultural Sciences"* 2013, 54, 153-57.
 18. Shkavro N., Radko A., Kozubska-Sobocińska A., Tkachyk T.: Genetic diversity of Ukrainian Charolais cattle assessed by selected genetic markers. *Ann. UMCS, Zootechnica, Sectio EE* 2016, 34 (2), 13-21.
 19. Tjulkin S. V., Ahmetov T. M., Valiullina E. F., Vafin R. R.: Polymorphism of genes for somatotropin, prolactin, leptin, and thyroglobulin in studbulls. *Vavilov J. Genet. Breed.* 2012, 16 (4/2), 1008-1012.
 20. Zhang Y., Sun D. X., Yu Y.: Validation of 17 Microsatellite Markers for Parentage Verification and Identity test in Chinese Holstein Cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2010, 23 (4), 425-429.

Autor korespondencyjny: prof. dr hab. Marek Babicz, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin; e-mail: marek.babicz@up.lublin.pl