

УДК: 636.082:591.151:636.2
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.4.478

ОЦЕНКА АССОЦИАЦИЙ ГЕНОВ PIT-1 И PRL С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ И АНАЛИЗ УСЛОВИЙ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ПОДТВЕРЖДАЕМОСТИ РАЗЛИЧИЙ У КОРОВ КРАСНОЙ СТЕПНОЙ ПОРОДЫ

Оздемиров А.А.^{1*} – канд. биол. наук, зав. лаб. геномных исследований, селекции и племенного дела (ORCID 0000-0003-2150-2192); Крупин Е.О.² – д-р ветеринар. наук, вед. науч. сотр. отд. физиологии, биохимии, генетики и питания животных (ORCID 0000-0002-8086-1788)

¹ ФГБУН «Федеральный аграрный научный центр Республики Дагестан»

² ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

* alim72@mail.ru

Ключевые слова: молочная продуктивность; PIT-1; PRL; ПЦР-ПДРФ; анализ чувствительности; мощность; вариабельность; красная степная порода.

Key words: milk productivity; PIT-1; PRL; PCR-RFLP; sensitivity analysis; power; variability; Red Steppe breed.

Поступила: 28.08.2025

Принята к публикации: 05.12.2025

Опубликована онлайн: 26.12.2025



РЕФЕРАТ

Целью работы было охарактеризовать полиморфизм локусов PIT-1 и PRL в стадах красной степной породы Республики Дагестан и оценить, при каких уровнях вариабельности продуктивных признаков различия между генотипами потенциально подтверждаемы статистически. Генотипирование 48 коров выполнено методом ПЦР-ПДРФ (PIT-1/HinfI; PRL/RsaI) с воспроизводимой схемой термоциклирования и рестрикции. Сформированы группы животных следующих полиморфных генотипов: для гена PIT-1 - AA (n=11), AB (n=16), BB (n=20); для гена PRL - AA (n=34), AB (n=11), BB (n=2). Учитывая семейную структуру (дочери одного быка) и отсутствие индивидуальных рядов продуктивности, формальные сравнения заменены анализом чувствительности: рассчитаны пороги SD и CV (для $p < 0,05$ и мощности ~ 80%) по удою, массовой доле жира и белка для всех парных контрастов генотипов внутри каждого локуса, а также их медианы по локусу. Результаты генотипирования показывают, что по удою подтверждение различий возможно при умеренной вариабельности, причём для PRL требуемые CV и SD ниже, чем для PIT-1; по жиру требования также умеренные. В отношении такого показателя молочной продуктивности, как белок, при типичной производственной дисперсии, различия маловероятны и потребуют увеличения выборок измерений. Полученные пороги могут служить практическими ориентирами для планирования мощности последующих исследований и интеграции маркеров в селекционные задачи на уровне хозяйств.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Повышение эффективности молочного скотоводства, все в большей мере опирается на точное описание генетической структуры стада и рациональное использование маркерных данных в племенной работе. Классические подходы (оценка по собственной продуктивности и по происхождению) постепенно дополняются и уточняются молекулярно-генетическими методами, позволяющими ускорять селекционный процесс, контролировать инбридинг и оптимизировать подбор родительских пар в локальных популяциях [1]. В таких условиях особую ценность приобретают гены-кандидаты, вовлечённые в регуляцию лактации и состава молока, по которым доступны простые и воспроизводимые протоколы генотипирования. К числу таких маркеров относятся PIT-1 и PRL (пролактин). PIT-1 - ключевой транскрипционный фактор гипофиза, регулирующий экспрессию гормона роста, пролактина и тиреотропного гормона. PRL непосредственно участвует в поддержании лактации. Для обоих локусов описаны полиморфизмы, у скота различных популяций, доступные к типированию методом ПЦР-ПДРФ PIT-1 (HinfI); PRL (RsaI), с хорошо зарекомендовавшими себя праймерами и рестрикционными картами [2-4]. В источниках литературы указывается, что носительство определённых аллелей (генотипов) может сопровождаться изменениями удоя, массовой доли жира и белка. Однако направление и величина эффектов зависят от породы, структуры выборки, системы кормления и уровня продуктивности стада, при этом необходимо учитывать, что результаты, полученные в одной популяции, нередко плохо переносимы на другую.

Красная степная порода, активно используемая в Республике Дагестан, сочетает адаптированность к местным условиям и приемлемую молочную продуктивность. При этом молекулярно-генетические характеристики региональных стад изучены ограниченно, а сведения об ассоциациях локусов PIT-1 и PRL с продуктивными признаками - фрагмен-

тарны. Это сдерживает внедрение маркеров в практическую селекцию на уровне хозяйств [5]. Дополнительная методологическая сложность заключается в том, что многие хозяйственные выборки имеют семейную структуру (например, значительная доля дочерей одного производителя). Такая конфигурация нарушает независимость наблюдений и ограничивает применимость некоторых популяционных тестов и стандартных сравнений по группам. В этих условиях полезно дополнять описательные сравнения анализом чувствительности, т.е. оценкой того, при какой дисперсии признака (SD) или относительной вариабельности (CV) различия между генотипами в принципе могут быть статистически подтверждены при заданном уровне значимости и мощности. Такой подход не заменяет формальные тесты, но дает прозрачные ориентиры для планирования объемов выборок и требований к однородности данных при последующих исследованиях.

Базовые описательные результаты по данной статье (распределение генотипов и аллелей PIT-1 и PRL, а также средние значения удоя, жирности и белка по генотипическим группам) были ранее опубликованы для этой же популяции [6]. Настоящая статья представляет методологическое развитие, а именно - повторный расчёт и интерпретацию показателей HWE с акцентом на дефицит гетерозигот; введение анализа чувствительности (пороговые SD и CV для достижения $p < 0,05$ и мощности $\sim 80\%$ по всем парным контрастам); компоновка результатов в виде медианных порогов по локусам и их визуализации; воспроизводимый ПЦР-ПДРФ протокол и схематические электрофореграммы для внедрения в практику.

Таким образом, цель настоящей работы - охарактеризовать полиморфизм локусов PIT-1 и PRL у коров красной степной породы, выращиваемых в Республике Дагестан, и оценить условия статистической подтверждаемости различий по удою, жиру и белку между генотипическими группами.

Научная новизна и практическая зна-

чимось работы состоят в представлении актуальных данных о полиморфизме PИТ-1 и PRL в региональной выборке красной степной породы, формализации требований к качеству данных (SD, CV) для статистического подтверждения различий по ключевым признакам молочной продуктивности при реальных размерах групп, и предоставлении воспроизводимого описания лабораторного протокола и визуальных ориентиров (RFLP-паттернов), пригодных для внедрения в научную практику. Полученные ориентиры по CV и SD могут использоваться при планировании последующих выборок, корректировке технологических режимов учета (для снижения технической и биологической вариабельности) и приоритизации маркеров для локальных программ отбора.

В данной научной работе мы рассматриваем результаты как диагностическую основу для последующих, более широких исследований с независимыми выборками, учитывающими родственные связи и фиксированные эффекты. Такой двухэтапный подход - от описательной оценки и чувствительности к валидации - минимизирует риск ложных выводов и повышает полезность маркерных данных для селекционной практики.

MATERIALS AND METHODS / МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетическое исследование коров красной степной породы по локусам PИТ-1 и PRL выполнено в условиях хозяйства КХ «Агрофирма Чох» (Республика Дагестан). Генотипирование проводили методом ПЦР-ПДРФ (полимеразной цепной реакции - полиморфизма длин рестрикционных фрагментов) [7-9] на четырёхканальном программируемом термоциклере «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия) с использованием специфических праймеров, синтезированных в НПЛ «СИНТОЛ» (Москва). В исследование включены 48 коров первой лактации, но для расчёта частот аллелей и генотипов использованы 47 валидно типированных образцов (одна проба исключена из-за отсутствия валидного генотипа по одному из локусов). Описательные сводки частот

генотипов (аллелей) и средних по группам соответствуют ранее представленным для этой же статьи данным [6] и приведены здесь только как исходная база для новых расчётов (HWE-интерпретация и анализ чувствительности). Кровь отбирали из яремной вены в пробирки с ЭДТА. ДНК выделяли набором Diatom™ DNA Prep 100 (IsoGeneLab, Москва) согласно инструкции производителя. Выход ДНК составлял - 3-5 мкг/100 мкл элюата; отношение OD_(260/280) для большинства образцов было 1,8, что соответствовало удовлетворительному качеству ДНК.

Для локуса PИТ-1 использовали праймеры F: 5'-CAATGAGAAAAGTTGGTGC-3' и R: 5'-TCTGCATTCGAGATGCTC-3' с последующей рестрикцией HinfI по оригинальному протоколу Moody et al., 1995 [10,11]. Для локуса PRL амплифицировали фрагмент 156 п.н. (экзон 3) праймерами F: 5'-CGAGTCCTTATGAGCTTGATTCTT-3' и R: 5'-GCCTTCCAGAAGTCGTTTTGTTTTTC-3' с последующей рестрикцией RsaI по первоначальному Mitra et al., 1995 [12]. Ожидаемые паттерны фрагментов: PRL - AA: 156 п.н.; AB: 156/82/74 п.н.; BB: 82/74 п.н.; PИТ-1 - характерные фрагменты для AA/AB/BB согласно [10,11]. Реакции ставили в объёме 25 мкл: 1× буфер GenePak PCR Core (IsoGeneLab), MgCl₂ по инструкции набора, 200 мкМ каждого dNTP, 0,2 мкМ каждого праймера, 1 U термостабильной ДНК-полимеразы и 50 нг геномной ДНК. Режим термоциклирования на «Терцик»: предварительная денатурация 95 °С, 3 мин; 30-35 циклов: 94 °С, 30 с; отжиг при 55 °С (PИТ-1) или 63 °С (PRL), 30-45 с; удлинение 72 °С, 60-120 с (с учётом длины ампликона); финальное удлинение 72 °С, 7-10 мин. Параметры согласованы с опубликованными протоколами PCR-RFLP для соответствующих локусов [8-10]. По 10 мкл ПЦР-продукта инкубировали с соответствующей эндонуклеазой (HinfI для PИТ-1; RsaI для PRL) в 1× буфере производителя при 37 °С в течение 1,5-2 ч; инактивацию фермента проводили по паспорту производителя. Рестрикцию

проводили в 20 мкл с добавлением 5 U HinfI (PIT-1) или 5 U RsaI (PRL) в 1× буфере; 37 °C, 2 ч; инактивация по паспорту. Контроль частичной рестрикции осуществляли повторной постановкой реакции и сравнением паттернов. Рестрикционные фрагменты разделяли в 2,0-2,5 % агарозном геле (ТАЕ- или ТВЕ-буфер), 90-120 В, 30-60 мин, с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете. В качестве маркера молекулярных масс использовали GenePak DNA Markers (IsoGeneLab; 50/100 bp ladder). Для PRL использовали гели >2,0 % для уверенного разрешения полос. В статью включается иллюстрация типичной электрофореграммы по каждому локусу (AA, AB и BB) с указанием размеров фрагментов. Для оценки ошибок типирования повторно анализировали не менее 10-15 % образцов (повторная ПЦР и рестрикция). Генотип присваивали по паттерну полос, строго соответствующему ожидаемым размерам фрагментов для AA, AB и BB; при сомнительном паттерне образец повторяли. Частоты аллелей и генотипов рассчитывали прямым подсчётом. Соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга проверяли χ^2 -критерием (df=1). Наблюдаемую и ожидаемую гетерозиготность (Ho, He) вычисляли стандартным образом.

Агрегированные n и средние по генотипическим группам приведены в Приложении, Табл. А1; перекрёстная сводка PIT-1×PRL — в Табл. А1а–А1б.

Группы формировали по каждому локусу отдельно - PIT-1 (AA, AB и BB) и PRL (AA, AB и BB). В данной статье приводятся описательные средние по группам; формальные тесты не выполнялись из-за ограничения индивидуальных наблюдений. Для интерпретации различий выполнен анализ чувствительности.

Анализ чувствительности. Для каждого парного контраста групп рассчитывали пороговые значения стандартного отклонения (SD), при которых достигаются статистическая значимость (*двусторонний t-критерий*, $\alpha=0,05$; предположение о равенстве дисперсий), и *мощность* - 80% по нормальной аппроксимации (использовали сумму квантилей $z: z_{(1-\alpha/2)} + z_{(0.80)} = 2,80$. Степени свободы для критерия *t*: $df = n_1+n_2-2$. Для сопоставимости между признаками дополнительно вычисляли коэффициент вариации (CV, %) относительно среднего двух сравниваемых групп: $CV\% = SD / ((\mu_1+\mu_2)/2) \times 100$.

Расчёты носят оценочный характер и служат для интерпретации достижимости эффектов при заданных объёмах групп.

Организационно-технический протокол (тип метода ПЦР-ПДРФ, термоциклер «Терцик», производители реагентов) идентичен применённому нами ранее при типировании овец дагестанской горной породы по генам CAST, GH, GDF9 [13], с адаптацией праймеров и ферментов под локусы PIT-1 и PRL.

Таблица 1 – Праймеры, условия ПЦР и параметры рестрикционного анализа локусов PIT-1 и PRL у коров красной степной породы

Ген	Праймер F (5'-3')	Праймер R (5'-3')	T° отжига, °C	Ампликон, п.н.	Эндонуклеаза / замена	Генотипы	Источник праймеров
PIT-1 (POUIF1)	CAATGA-GAAAGTTG GTGC	TCTG-CATTCGA GATGCTC	55	660	HinfI / A-G	AA / AB / BB	Moody et al., 1995 (Anim Genet)
PRL	CGAG-TCCTTATG AGCTTGAT TCTT	GCCTTCCA GAAGTCG TTTGTTTT C	63	156	RsaI / A-G	AA / AB / BB	Mitra et al., 1995 (J Anim Breed Genet)

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Базовое распределение генотипов и аллелей *PIT-1* и *PRL* в настоящей выборке соответствует ранее опубликованным для этой же популяции данным [6] (см. Приложение (табл. A1)). На этой основе мы оценили соответствие распределений равновесию Харди-Вайнберга (HWE) и выполнили анализ чувствительности (пороговые SD и CV) для парных контрастов генотипов.

Проведённый анализ распределения генотипов и аллелей локусов *PIT-1* и *PRL* у коров красной степной породы ($n = 47$) выявил умеренный дефицит гетерозигот по *PIT-1* ($H_o = 0,35$; $H_e = 0,48$; $\chi^2 = 4,02$; $p = 0,045$). Проверка на соответствие HWE приведена справочно (из-за семейной структуры выборки её значения не подлежат строгой интерпретации и не используются для биологических выводов). Для локуса *PRL* отклонение от равновесия незначимо ($H_o = 0,23$; $H_e = 0,27$; $\chi^2 = 0,76$; $p = 0,383$), однако доля гомозигот (AA + BB) здесь выше (77 %) по сравнению с *PIT-1* (65 %), что отражает относительно большую генетическую упорядоченность по данному локусу. Такая структура аллелей согласуется с литературными данными, где для молочных пород часто наблюдается смещение в сторону аллеля A пролактинного гена, ассоциированного с повышенной молочной продуктивностью и устойчивостью лактации.

Для оценки связи генотипов с продуктивными признаками сформированы независимые группы по каждому локусу:

PIT-1: AA ($n = 11$), AB ($n = 16$), BB ($n = 20$)

PRL: AA ($n = 34$), AB ($n = 11$), BB ($n = 2$)

Перекрытое распределение генотипов *PIT-1* × *PRL* см. Табл. A1a–A1b (Приложение). Разреженность ячеек (в т.ч. *PRL* BB, $n=2$) обосновывает отдельный анализ локусов. Показатели удоя, массовой доли жира и белка приведены как средние по группам (без вариационных характеристик, поскольку на данном этапе индивидуальные наблюдения ограничены). На описательном уровне более высокие средние значения удоя отмечены

у *PIT-1* AA и *PRL* AA, жирномолочности - у *PIT-1* BB и *PRL* BB, причем, различия по белку малы. Значения средних приведены в таблицах 2-4. Крайне малая численность *PRL* BB ($n=2$) ограничивает достоверность выводов для этого генотипа, с учетом этого, данные приводятся описательно.

Для оценки условий, при которых различия средних могли бы быть статистически значимыми, выполнен анализ чувствительности. Для каждого парного сравнения рассчитаны пороговые значения стандартного отклонения (SD) и коэффициента вариации (CV%), обеспечивающие достижение уровня значимости $p < 0,05$ (двусторонний t-критерий, равенство дисперсий) и мощности $\approx 80\%$ (нормальная аппроксимация).

Наблюдаемые контрасты по удою различаются при заданных объёмах групп. Наиболее реалистичными выглядят сравнения *PIT-1* AA в сравнении с AB и *PIT-1* AA в сравнении с BB: для достижения $p < 0,05$ требуются $CV < 15,5\%$ и $CV < 12,4\%$, соответственно; для мощности - 80% - $CV < 11,4\%$ и $CV < 9,0\%$. Контраст *PRL* AA в сравнении с AB предъявляет более жёсткие требования ($CV < 20,1\%$ для $p < 0,05$; 14,5% для мощности). Сравнение *PIT-1* AB в сравнении с BB характеризуется малой амплитудой ($\Delta - 94$ кг) и требует очень низкого CV (4,4% / 3,2%), что на практике достижимо лишь при крайне стабильных условиях. Сравнения, включающие *PRL* BB ($n=2$), интерпретируются с осторожностью из-за малой численности.

Для жирномолочного признака контрасты средней величины выглядят подтвержденными при умеренной дисперсии. В частности, для *PIT-1* AA в сравнении с BB требуемые пороги составляют CV - 10,7% и 8,0% ($p < 0,05$, мощность - 80%), для *PIT-1* AB в сравнении с BB и *PRL* AA в сравнении с AB - 7,8% и 5,7%. Контрасты малой амплитуды ($\Delta - 0,10$ п.п.) - например, *PRL* AB в сравнении с BB - требуют очень низкого CV (1,6% и 1,3%); это возможно лишь при высоком контроле вариабельности. Сравнение *PRL* AA в сравнении с BB выглядит наиболее чув-

ствительным (5,3% и 4,0%), однако выводы ограничены редким генотипом PRL BB (n=2).

Различия по белку малы (Δ 0,02-0,06 п.п.) и статистически достижимы только при очень низких уровнях вариабельности: для $p < 0,05$ требуются CV порядка 0,3-2,3%, для мощности - 80% - 0,3-1,6%.

При уровнях вариабельности, типичных для производственных стад, столь низкие значения CV встречаются редко; поэтому результаты по белку трактуются преимущественно описательно и требуют расширения выборки или повторных измерений для убедительного подтверждения.

Таблица 2 – Удой-пороги SD и CV для достижения статистической значимости ($p < 0,05$) и мощности ~80% по локусам PIT-1 и PRL

Ген	Сравниваемые генотипы	n1/n2	Средние (1; 2) (305-дн. лактации)	Δ (абс)	SD ($p < 0,05$; мощн. ~80%)	CV% ($p < 0,05$; мощн. ~80%)
PIT-1	AA vs AB	11/16	3506,0; 3094,0	412,0	510,63; 375,68	15,47; 11,38
PIT-1	AA vs BB	11/20	3506,0; 3188,0	318,0	414,25; 302,55	12,38; 9,04
PIT-1	AB vs BB	16/20	3094,0; 3188,0	94,0	137,81; 100,09	4,39; 3,19
PRL	AA vs AB	34/11	3528,0; 3064,0	464,0	662,92; 477,74	20,11; 14,49
PRL	AA vs BB	34/2	3528,0; 3282,0	246,0	166,25; 120,75	4,88; 3,55
PRL	AB vs BB	11/2	3064,0; 3282,0	218,0	128,85; 101,28	4,06; 3,19

Примечание (для таблиц 2-4): SD - стандартное отклонение; CV - ($SD / \text{среднее}$) $\cdot 100\%$, где среднее = $(\mu_1 + \mu_2)/2$; Δ - абсолютная разница средних; n1/n2 - численности сравниваемых групп; пороги рассчитаны для двустороннего t-критерия при $\alpha = 0,05$ и мощности - 80%. Сравнения с участием PRL BB (n = 2) требуют осторожной интерпретации.

Таблица 3 – Массовая доля жира (%) - пороги SD и CV для $p < 0,05$ и мощности ~80% по локусам PIT-1 и PRL

Ген	Сравниваемые генотипы	n1/n2	Средние (1; 2)	Δ (абс)	SD ($p < 0,05$; мощн. ~80%)	CV% ($p < 0,05$; мощн. ~80%)
PIT-1	AA vs AB	11/16	3,5; 3,6	0,1	0,12; 0,09	3,38; 2,54
PIT-1	AA vs BB	11/20	3,5; 3,8	0,3	0,39; 0,29	10,68; 7,95
PIT-1	AB vs BB	16/20	3,6; 3,8	0,2	0,29; 0,21	7,84; 5,68
PRL	AA vs AB	34/11	3,6; 3,8	0,2	0,29; 0,21	7,84; 5,68
PRL	AA vs BB	34/2	3,6; 3,9	0,3	0,20; 0,15	5,33; 4,0
PRL	AB vs BB	11/2	3,8; 3,9	0,1	0,06; 0,05	1,56; 1,30

Таблица 4 – Массовая доля белка (%) - пороги SD и CV для $p < 0,05$ и мощности $\approx 80\%$ по локусам PIT-1 и PRL

Ген	Сравниваемые генотипы	n1/n2	Средние (1; 2)	Δ (абс)	SD ($p < 0,05$; мощн. $\approx 80\%$)	CV% ($p < 0,05$; мощн. $\approx 80\%$)
PIT-1	AA vs AB	11/16	3,08; 3,14	0,06	0,07; 0,05	2,25; 1,61
PIT-1	AA vs BB	11/20	3,08; 3,12	0,04	0,05; 0,04	1,61; 1,29
PIT-1	AB vs BB	16/20	3,14; 3,12	0,02	0,03; 0,02	0,96; 0,64
PRL	AA vs AB	34/11	3,10; 3,15	0,05	0,07; 0,05	2,24; 1,60
PRL	AA vs BB	34/2	3,10; 3,12	0,02	0,01; 0,01	0,32; 0,32
PRL	AB vs BB	11/2	3,15; 3,12	0,03	0,02; 0,01	0,64; 0,32

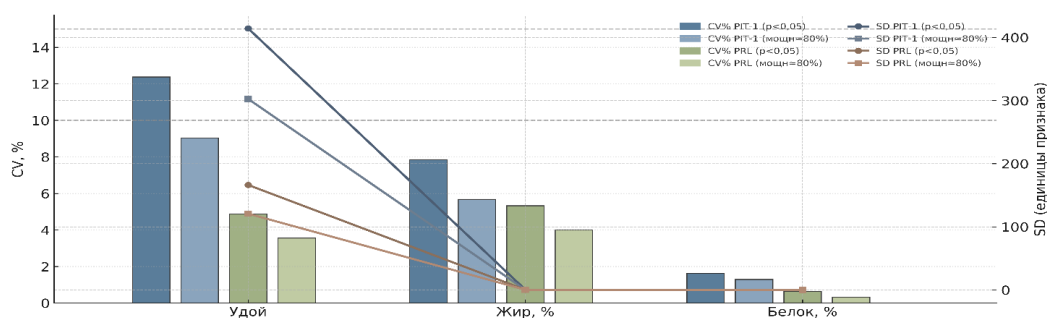


Рисунок 1 – Сводная оценка требуемой варибельности по локусам PIT-1 и PRL (медианные CV и SD для подтверждаемости различий по удою, жирности и белку).

Примечание: график показывает по каждому признаку медианные пороговые значения CV и SD, вычисленные по всем парным сравнениям генотипов внутри локусов PIT-1 и PRL ($p < 0,05$; мощн. $\approx 80\%$) по всем парным контрастам генотипов внутри локуса (AA-AB, AA-BB, AB-BB). Столбцы отображают требуемые CV, % (левая ось) отдельно для PIT-1 и PRL, линии с маркерами - соответствующие SD в единицах признака (правая ось). Пунктирные уровни 10% и 15% служат визуальными ориентирами «умеренной» варибельности.

По результатам проведенного анализа чувствительности можно отметить, что выявленные различия по удою и массовой доле жира потенциально достижимы для статистического подтверждения при умеренной варибельности, тогда как различия по массовой доле белка требуют маловероятных в производственных условиях уровней стабильности.

Визуальная оценка достижимости эффектов по признакам молочной продуктивности приведена на рис. 1.

По удою пороговые значения для PIT-

1 выше (CV - 12,4% для $p < 0,05$ и 9,0% для мощности; SD - 414 и 303), чем для PRL (CV - 4,9% и 3,6%; SD - 166 и 121). Это указывает на различие в требуемом уровне варибельности: для PIT-1 допустим больший разброс (пороги выше), тогда как для PRL подтверждение эффектов требует более жёсткого контроля дисперсии (пороги ниже). Для массовой доли жира требования умеренные: PIT-1 - CV-7,8% и 5,7% (SD-0,29 и 0,21), PRL - CV-5,3% и 4,0% (SD-0,20 и 0,15). По массовой доле белка требуемые уровни вари-

бельности минимальны: PIT-1 - CV-1,6% и 1,3% (SD-0,05 и 0,04), PRL - CV-0,64% и 0,32% (SD-0,02 и 0,01), что указывает на ограниченную статистическую достижимость эффектов при типичной производственной дисперсии и необходимость либо увеличения выборок, либо многократных измерений.

Важно отметить, что применение медианы по трём контрастам в рамках локуса снижает влияние экстремальных сочетаний (например, редких генотипов), но может занижать требования для «тяжёлых» сравнений (в частности, PRL AA по сравнению с АВ). Поэтому график предназначен как сводный ориентир по признаку и локусу, а детальные пороги для конкретных пар генотипов следует интерпретировать по соответствующим

таблицам.

Нами включена типичная электрофореграмма ПЦП-ПДРФ по локусам PIT-1 (HinfI) и PRL(RsaI) с обозначением размеров фрагментов и генотипов AA, АВ и ВВ (рис. 2).

PIT-1 - AA - 660 п.н.; АВ - 660, 390, 270; ВВ - 390, 270. PRL - AA - 156 п.н.; АВ -- 156, 82, 74; ВВ - 82, 74.

Схематически показаны эталонные полосы, соответствующие длинам рестриционных фрагментов (bp) для трёх генотипов каждого локуса; шкала размеров приведена сбоку у каждой панели. Положение полос отражает относительные длины продуктов рестрикции (чем больше фрагмент, тем выше его положение на схеме).



Рисунок 2 – ПЦП-ПДРФ-типирование по локусам PIT-1(HinfI) и PRL(RsaI) (схема ожидаемых фрагментов). Примечание: рисунок носит схематический характер и служит для чтения генотипов по диагностическим полосам.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Выполненный анализ полиморфизмов PIT-1 и PRL у коров красной степной породы подтвердил наличие варибельности по обоим локусам. Так, для PIT-1 выявлены аллели А и В с преобладанием В (q-0,59), а для PRL - доминирование аллеля А (p-0,84). По PIT-1 зафиксирован умеренный дефицит гетерозигот относительно равновесия Харди-Вайнберга, тогда как по PRL признаки консолидации выражены сильнее. Такая структура согласуется с общими наблюдениями по молочным породам, где пролактиновый локус нередко демонстрирует смещение в сторону аллеля, ассоциированного с повышенным удоем и стабильностью лактации. Описа-

тельные сравнения «генотип - продуктивность» показывают ожидаемые биологические тенденции. PIT-1 (POU1F1) - транскрипционный фактор гипофиза, соответственно, его вариации логично связывать с уровнем секреции гормонов и, как следствие, с лактационными признаками. В нашей выборке более высокие средние значения удоя отмечены у PIT-1 AA, тогда как PIT-1 ВВ характеризуется большей жирномолочностью. Аналогично этому, генотип PRL AA демонстрирует наибольший средний удой, а PRL ВВ - наибольшую массовую долю жира. Различия по массовой доле белка малы и, по-видимому, менее чувствительны к вариациям в указанных локусах, что согласуется

ся с литературными данными о более сложной, полигенной структуре белково-молочности.

Важным элементом интерпретации является анализ чувствительности, выполненный вместо формальной проверки гипотез (индивидуальные наблюдения на текущем этапе недоступны). Эта оценка показывает, при каких реалистичных уровнях варибельности различия средних были бы статистически подтверждаемы. Наиболее перспективными к последующей верификации выглядят контрасты PRL AA в сравнении с AB по удою (Δ -0,46 т) и PIT-1 AA в сравнении с AB и BB (Δ -0,32-0,41 т). При умеренной дисперсии (CV порядка 10-15%) такие эффекты ожидаемы по значимости и мощности. Напротив, контраст PIT-1 AB в сравнении с BB имеет небольшую амплитуду и потребовал бы нереалистично низкого разброса; вероятность его подтверждения невысока. Отдельно подчеркнём, что интерпретация PRL BB ограничена крайне малой численностью ($n=2$), в соответствии с этим, любые выводы по этому генотипу должны рассматриваться как предварительные. На результаты мог повлиять ряд методических и биологических факторов. Здесь важно уточнить, что все животные - дочери одного быка-производителя. Генотип отца по PIT-1 и PRL не определён, вследствие этого вклад отцовских аллелей оценить невозможно. Анализ выполнен раздельно по каждому локусу, тогда как двухлокусная модель (PIT-1×PRL) потребует большей выборки и более равномерного распределения генотипов, особенно для редких классов (PRL BB). Нужно также отметить, что учёт дополнительных факторов (возраст, масса к отёлу, длительность лактации, кормление, сезон) позволит снять часть фоновой варибельности и уточнить эффекты генотипов. Без такого учёта эффекты могут быть занижены либо смещены. С практической точки зрения полученные закономерности поддерживают целесообразность использования PIT-1 и PRL как маркеров в предварительном отборе коров, особенно при работе с районированными популяциями,

где важно сочетать продуктивность и адаптационную устойчивость. При этом тактика селекции должна быть многокритериальной, например, на хозяйства, ориентированные на объём удоя, предпочтительны генотипы PIT-1 AA и PRL AA, но при акценте на жирномолочность — генотипы PIT-1 BB и, потенциально, PRL BB (только после расширенной верификации из-за малой n). Внедрение генотипирования по указанным локусам в практику племенной работы рационально сочетать с стандартными оценками по продуктивности и показателям здоровья и репродукции.

Необходимо отметить такие ограничения проведенных исследований, как отсутствие индивидуального уровня данных. Это не позволило представить показатели вариации и формальные значения. Далее - единый отец у всей группы смещает аллельные частоты и сужает генетическую независимость выборки. Следующее ограничение это - крайне малая численность PRL BB, что не позволяет проводить надёжные выводы для этого генотипа и, последнее - эффекты двух локусов оценены по отдельности, без двухфакторного анализа и учёта дополнительных факторов (ковариат). Указанные ограничения мы учли при интерпретации, а их влияние может быть нивелировано в будущей работе расширением выборки, тестированием генотипа отца, сбором индивидуальных лактационных данных и применением моделей ANOVA, GLM. В целом наблюдаемые ассоциации согласуются с биологической ролью PIT-1 и PRL в регуляции лактации и подтверждают их прикладную значимость для локальных программ племенной работы. Для окончательной количественной верификации эффектов потребуется расширенная выборка с индивидуальными записями, после чего уместно переходить к многофакторным моделям и, при возможности, к более детальной маркерной, геномной селекции.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

1. У коров красной степной породы выявлен полиморфизм по локусам PIT

-1 и PRL, причем по PIT-1 отмечен умеренный дефицит гетерозигот, по PRL - признаки консолидации аллелей.

2. По описательным данным удои выше у генотипов PIT-1 AA и PRL AA, тогда как жирномолочность выше у PIT-1 BB и, вероятно, PRL BB (последний вывод ограничен малой n). Различия по белку при этом незначительны.

3. Анализ чувствительности показывает, что контрасты PRL AA в сравнении с AB, а также PIT-1 AA в сравнении с AB и BB по удою реалистично подтверждаемы при умеренной вариабельности, при этом PIT-1 AB в сравнении с BB - маловероятен по значимости, тогда как PRL BB статистически неинформативен из-за малой выборки (n=2).

4. Единый отец у всей выборки и отсутствие индивидуальных наблюдений ограничивают формальную статистическую проверку и результаты интерпретируются как предварительные.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ / PRACTICAL RECOMMENDATIONS

Необходимо использовать результаты генотипирования по PIT-1 и PRL в составе комплексной племенной оценки и соотносить целевые генотипы с производственной целью (объём удою в сравнении с жирномолочностью), а также подтвердить эффекты на расширенной выборке.

EVALUATION OF ASSOCIATIONS OF PIT-1 AND PRL GENES WITH MILK PRODUCTIVITY AND ANALYSIS OF STATISTICAL SIGNIFICANCE OF DIFFERENCES IN RED STEPPE COWS

Ozdemirov A.A.¹ * – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Genomic Research, Selection and Breeding (ORCID 0000-0003-2150-2192); **Krupin E.O.**² – Doctor of Veterinary Sciences, Leading Researcher of the Department of Physiology, Biochemistry, Genetics and Animal Nutrition (ORCID 0000-0002-8086-1788).

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Scientific Center of the Republic of Dagestan"

² Federal State Budgetary Institution of Science "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences"

*alim72@mail.ru

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the polymorphism of the PIT-1 and PRL loci in Red Steppe cattle herds of the Republic of Dagestan and to assess the levels of variability in production traits at which differences between genotypes could be statistically confirmed. Genotyping of 48 cows was performed using the PCR-RFLP method (PIT-1/HinfI; PRL/RsaI) with a reproducible thermocycling and restriction protocol. For PIT-1, the following genotype groups were formed: AA (n = 11), AB (n = 16), BB (n = 20); for PRL: AA (n = 34), AB (n = 11), BB (n = 2). Considering the family structure (daughters of the same sire) and the absence of individual productivity records, formal comparisons were replaced by a sensitivity analysis: thresholds of SD and CV (for $p < 0.05$ and power ~80%) were calculated for milk yield, fat percentage, and protein percentage for all pairwise genotype contrasts within each locus, as well as their medians per locus. Genotyping results indicate that for milk yield, confirmation of differences is possible under moderate variability, with lower CV and SD requirements for PRL than for PIT-1; for fat percentage, the requirements are also moderate. For milk protein percentage, given typical production variance, significant differences are unlikely and would require larger sample sizes. The obtained thresholds can serve as practical guidelines for planning statistical power in future studies and for integrating these markers into breeding programs at the farm level.

Доступность данных

Агрегированные таблицы средних значений, разниц и расчётных порогов SD/CV ($p < 0,05$; мощн. ~ 80%), а также формулы для воспроизводимости анализа чувствительности предоставляются по обоснованному запросу.

Дополнительные материалы - Табл. A1 (сводка по группам) и Табл. A1a–A1b (PIT-1×PRL).

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Таблица А1 – Сводка по генотипическим группам (PIT-1, PRL) (n и средние по удою (кг), жиру (%) и белку (%))

Локус	Генотип	n	Удой, кг	Жир, %	Белок, %
PIT-1	AA	11	3506,0	3,5	3,08
PIT-1	AB	16	3094,0	3,6	3,14
PIT-1	BB	20	3188,0	3,8	3,12
PRL	AA	34	3528,0	3,6	3,1
PRL	AB	11	3064,0	3,8	3,15
PRL	BB	2	3282,0	3,9	3,12

Таблица А1а – Перекрёстная таблица PIT-1 × PRL: ожидаемые частоты при независимости (дробные) с итогами по строкам и столбцам

Генотипы	PRL AA	PRL AB	PRL BB
PIT-1 AA	7,96	2,57	0,47
PIT-1 AB	11,57	3,74	0,68
PIT-1 BB	14,47	4,68	0,85

Таблица А1б – Перекрёстная таблица PIT-1 × PRL: целочисленная раскладка, согласованная с маргиналиями

Генотипы	PRL AA	PRL AB	PRL BB
PIT-1 AA	8	3	0
PIT-1 AB	12	3	1
PIT-1 BB	14	5	1

Примечание: N = 47; маргинальные суммы: PIT-1 = (11; 16; 20), PRL = (34; 11; 2).
Формула ожидаемых частот: $E_{ij} = (\Sigma \text{ по строке}_i \times \Sigma \text{ по столбцу}_j) / N$.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Суржикова, Е. С. Особенности полиморфизма генов PIT-1, PRL у коров кавказской бурой породы, разводимой в республике Дагестан / Е. С. Суржикова, Т. Н. Михайленко Д. М. Елагина // Сборник научных трудов КНИЗВ. – 2022. - № 11 (1). – С. 32-36. - DOI: 10.48612/sbornik-2022-1-7
2. 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.
3. Крупин Е. О. Биохимические показатели белкового и углеводного обмена у коров различных генотипов / Е. О. Крупин, М. Ш. Тагиров // Ученые записки Казан-

ской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2018. – Т.233(1). – С. 83-88.
4. Krupin E. O. Influence of CSN3, LGB, PRL, GH, TG5 genes alleles on dairy productivity and energy value of cow's milk / E. O. Krupin, S. K. Shakirov // Carpathian Journal of Food Science and Technology. – 2019. - № 11(4). – С. 104-115.
5. Оздемиров А. А. Полиморфизм генов PIT-1, PRL, GH молочного скота кавказской бурой породы, разводимого в различных природно-экологических зонах Республики Дагестан / А. А. Оздемиров, М. И. Селионова, Л. Н. Чижова, А. А. Хожоков, Е. С. Суржикова, Д. М. Рамазанова // Юг-России: экология, развитие. – 2020. - №15. (2). – С. 165-171.
6. Othman E. Othman. Genetic polymorphism of three genes associated with milk

- trait in Egyptian buffalo / Othman E. Othman, Fawzia A. Zayed, Ali A. El Gawead, Medhat R.A. El-Rahman // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2011. – V. 9, № 2, Pp. 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2011.09.002>
7. Abbas Doosti. Molecular study of PIT1 gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle September / Abbas Doosti, Islamic Azad, Asghar Arshi, Behnam Momeni // *African Journal of Agricultural Research*. – 2011. – № 6(19). – С. 4467-4470.
8. Daniela Elena Ilie. Polymorphism of the Prolactin (PRL) Gene and Its Effect on Milk Production Traits in Romanian Cattle Breeds / Daniela Elena Ilie, Alexandru Eugeniu Mizeranschi, Ciprian Valentin Mihali, Radu Ionel Neamț, Ludovic Toma Czișter, Mihai Carabaș, Andrei Cristian Grădinaru // *Veterinary Sciences*. – 2023. – № 10(4). P. 275. doi: 10.3390/vetsci10040275
9. Moody D. E. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine PIT1 gene and assignment of PIT1 to bovine chromosome 1 / Moody D. E, Pomp D, Barendse W // *Anim Genet*. – 1995. – №26(1) P. 45–47. doi:10.1111/j.1365-2052.1995.tb02620.x.
10. Woollard J. HinfI polymorphism at the bovine PIT1 locus. / J. Woollard, C. B. Schmitz, A. E. Freeman, C. K. Tuggle // *Anim Sci*. – 1994. – № 72(12):3267. doi:10.2527/1994.72123267x.
11. Mitra A. Polymorphisms at growth-hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo / Mitra A, Schlee P, Balakrishnan CR, Pirchner F // *Anim Breed Genet*. – 1995. – № 112(1-6). – P. 71–74. doi:10.1111/j.1439-0388.1995.tb00543.x.
12. Оздемиров А. А. Полиморфизм генов CAST, GH, GDF9 овец дагестанской горной породы / А. А. Оздемиров, Л. Н. Чижова, А. А. Хождоков, Е. С. Суржикова, Г. Д. Догеев, С. Ш. Абдулмагомедов // *Юг России: экология, развитие*. – 2021. – № 16 (2). – С. 39-44.
13. Оздемиров А. А. Анализ полиморфизмов в генах, ассоциируемых с молочной продуктивностью у районированных пород крупного рогатого скота, выращиваемых в условиях республики Дагестан / А. А. Оздемиров, А. А. Хождоков, З. М. Гусейнова, М. А. Даветеева // *Юг России: экология, развитие*. – 2022. – № 3 (68). С. 196-200.
- ### REFERENCES
1. Surzhikova, E. S. Features of the polymorphism of the PIT-1, PRL genes in Caucasian Brown cows bred in the Republic of Dagestan / E. S. Surzhikova, T. N. Mikhailenko, D. M. Elagina // *Collection of scientific papers of the Kursk Scientific Center of Veterinary Medicine*.2022:11(1):32-36. – DOI: 10.48612/sbornik-2022-1-7 (In Russ.)
 2. Chizhova, L. N. Evaluation of the genetic potential of young dairy cattle by the marker genes CSN3, GH, PIT-1, PRL / L. N. Chizhova, E. S. Surzhikova, T. N. Mikhailenko // *Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy*.2020:6:40-46. (In Russ.)
 3. Krupin E. O. Biochemical indicators of protein and carbohydrate metabolism in cows of different genotypes / E. O. Krupin, M. Sh. Tagirov // *Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman*.2018:233:83-88. (In Russ.)
 4. Krupin E. O. Influence of CSN3, LGB, PRL, GH, TG5 gene alleles on dairy productivity and energy value of cow's milk / E. O. Krupin, S. K. Shakirov // *Carpathian Journal of Food Science and Technology*.2019:11(4):104-115. (In Russ.)
 5. Ozdemirov A. A. Polymorphism of the PIT-1, PRL, GH genes in Caucasian Brown dairy cattle bred in different natural and ecological zones of the Republic of Dagestan / A. A. Ozdemirov, M. I. Selionova, L. N. Chizhova, A. A. Khozhokov, E. S. Surzhikova, D. M. Ramazanova // *South of Russia: ecology, development*.2020:15. (2):165-171. (In Russ.)
 6. Othman E. Othman. Genetic polymorphism of three genes associated with milk trait in Egyptian buffalo / Othman E. Othman, Fawzia A. Zayed, Ali A. El Gawead, Medhat R.A. El-Rahman // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.2011:9:97-102. – DOI 10.1016/j.jgeb.2011.09.002
 7. Abbas Doosti. Molecular study of PIT1 gene polymorphism in Holstein and Iranian

- native cattle September / Abbas Doosti, Islam Azad, Asghar Arshi, Behnam Momeni // African Journal of Agricultural Research.2011:6(19):4467-4470.
8. Daniela Elena Ilie. Polymorphism of the Prolactin (PRL) Gene and Its Effect on Milk Production Traits in Romanian Cattle Breeds / Daniela Elena Ilie, Alexandru Eugeniu Mizeranschi, Ciprian Valentin Mihali, Radu Ionel Neamț, Ludovic Toma Cziszter, Mihai Carabaș, Andrei Cristian Grădinaru // Veterinary Sciences.2023:10(4):275. DOI 10.3390/vetsci10040275
9. Moody D. E. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine PIT1 gene and assignment of PIT1 to bovine chromosome 1 / Moody D. E, Pomp D, Barendse W // Anim Genet.1995:26(1):45–47. DOI -10.1111/j.1365-2052.1995.tb02620.x
10. Woollard J. HinfI polymorphism at the bovine PIT1 locus. / J. Woollard, C. B. Schmitz, A. E. Freeman, C. K. Tuggle // Anim Sci.1994:72(12):3267. DOI -10.2527/1994.72123267x
11. Mitra A. Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo / Mitra A, Schlee P, Balakrishnan CR, Pirchner F // Anim Breed Genet. 1995:112(1-6):71–74. DOI 10.1111/j.1439-0388.1995.tb00543.x
12. Ozdemirov A. A. Polymorphism of the CAST, GH, GDF9 genes in Dagestan mountain sheep / A. A. Ozdemirov, L. N. Chizhova, A. A. Khozhokov, E. S. Surzhikova, G. D. Dogeev, S. Sh. Abdulmagomedov // South of Russia: ecology, development.2021:16 (2):39-44. (In Russ.)
13. Ozdemirov A. A. Analysis of polymorphisms in genes associated with milk productivity in zoned cattle breeds raised in the Republic of Dagestan / A. A. Ozdemirov, A. A. Khozhkov, Z. M. Guseynova, M. A. Daveteeva // South of Russia: ecology, development.2022: 3(68):196-200. (In Russ.)