

Генетика, геномика, генетическая инженерия

УДК 636.2:637.043:577.21

doi: 10.15389/agrobiology.2022.6.1083rus

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПОЛНОГЕНОМНЫХ АССОЦИАЦИЙ С ЖИРНОКИСЛОТНЫМ И КОМПОНЕНТНЫМ СОСТАВОМ МОЛОКА У КОРОВ (*Bos taurus*)*А.А. СЕРМЯГИН[✉], Л.П. ИГНАТЬЕВА, И.А. ЛАШНЕВА, А.А. КОСИЦИН, О.В. КОСИЦИНА, А.С. АБДЕЛЬМАНОВА, Н.А. ЗИНОВЬЕВА

Количество жира в молоке коров относится к признакам, наиболее подверженным высокой изменчивости, и зависит как от условий среды (кормление, технология содержания), так и от генетических факторов (порода, генотип). Особый интерес представляет содержание жирных кислот (ЖК) как биомаркера контроля физиологического состояния животных и критерия оценки показателей качества сырого молока, в части его пригодности к переработке (выход сыра, масла и сливок). Соотношение ЖК в молоке по числу атомов углерода, а также длине цепи, степени ее насыщения различается между особями и на популяционном уровне. Поэтому изучение генетической и геномной изменчивости признаков молочной продуктивности для повышения эффективности управления отбором животных остается актуальной задачей. Цель наших исследований заключалась в поиске полногеномных ассоциаций и полиморфизмов в генах, детерминирующих жирнокислотный состав молока, на основе инфракрасной спектроскопии как одного из наиболее быстрых и точных экспресс-методов физико-химического анализа состава молока. Популяционно-генетические параметры и изменчивость содержания жирных кислот в молоке изучали на популяции голштинизированного черно-пестрого и голштинского скота 14 племенных стад из Московской области (2017-2018 годы). Всего для оценки суточных показателей молочной продуктивности использовали 36982 образца. Расчет коэффициентов наследуемости (h^2) и корреляции (r_g) показателей состава молока коров проводили на основе метода REML (residual maximum likelihood) с использованием семейства программ BLUPF90. Поиск SNP проводили в выборке коров из экспериментального стада голштинизированного черно-пестрого скота (ПЗ «Ладожский» — филиал ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2020-2021 годы). Фракционный состав молока определяли с помощью автоматического анализатора MilkScan 7 DC («FOSS», Дания), принцип действия которого основан на экспресс-оценке методом инфракрасной спектроскопии. При индивидуальной оценке была сформирована группа из 144 генотипированных с помощью биочипа Bovine GGP 150K («Neogen», США) коров с полным фенотипическим описанием спектра жирных кислот и компонентов молока. Контроль качества генотипирования (110884 SNP), анализ полногеномных ассоциаций (GWAS, genome-wide association study) и многомерное шкалирование (MDS, multidimensional scaling) выполняли с помощью программы Plink 1.9. Поиск генов по выявленным значимым полиморфизмам проводили в браузере Ensembl по сборке генома крупного рогатого скота *Bos taurus* UMD 3.1.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>). Аннотацию генов для определения локусов количественных признаков на хромосомах животных осуществляли по международной базе данных Animal QTLdb. Наследуемость показателей жирных кислот молока варьировала от низкой для полиненасыщенных ЖК ($h^2 = 0,018$) до умеренных для средне- ($h^2 = 0,125$), длинноцепочечных ($h^2 = 0,155$) и миристиновой кислоты ($h^2 = 0,155$), мононенасыщенных ЖК ($h^2 = 0,176$) и олеиновой кислоты ($h^2 = 0,196$). Методом многомерного шкалирования оценили генетическую структуру экспериментальной группы животных, где мы наблюдали умеренный размах вариабельности по первой ($PC1 = 7,82\%$) и по второй ($PC2 = 4,65\%$) компонентам изменчивости. Для миристиновой и пальмитиновой ЖК выявлены общие кластеры (QTL) на хромосомах BTA5, BTA10, BTA14, BTA18 и BTA27; для стеариновой и олеиновой ЖК (как входящих в группу длинноцепочечные ЖК) показана схожая локализация QTL на хромосомах BTA9, BTA10, BTA11, BTA14, BTA17, BTA18, BTA19, BTA20 и BTA29. Для коротко- и среднецепочечных ЖК обнаружены ассоциации на хромосомах BTA1, BTA5, BTA10, BTA11, BTA14, BTA18, BTA19 и BTA24, для длинноцепочечных ЖК детектированы QTL на BTA6, BTA7, BTA9, BTA10, BTA11, BTA17, BTA18 и BTA29. Для коротко- и среднецепочечных ЖК, насыщенных ЖК, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0} и C_{18:1} установлены гены, образующие QTL на хромосомах BTA10, BTA11 и BTA14, — *SACNA1C*, *GCHI*, *ATG14*, *KCNH5*, *PRKCE*, *CTNNA2*, *CYHR1*, *VPS28*, *DGAT1*, *ZC3H3*, *RHPN1*, *TSNARE1*. Коротко- и среднецепочечные ЖК, миристиновая и пальмитиновая ЖК, насыщенные ЖК показали связь с полиморфизмами в генах *MED12L*, *EPHB1*, *GRIN2B*, *PRMT8*, *ERC1*, *PELI2*, *ARHGAP39*, *MROH1*, *MAF1*, *GSDMD*, *LY6D*. Для длинноцепочечных и мононенасыщенных ЖК, стеариновой и олеиновой ЖК в результате аннотации получены селекционно значимые гены *RPS6KA2*, *CPQ*, *CPE*, *FTO*, *FAT3*, *LUZP2*. Продолжение изучения генетических механизмов наследования содержания жирных кислот и компонентов молока

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-76-20046).

необходимо для формирования стратегии селекции молочного скота с лучшим жирнокислотным профилем и составом компонентов.

Ключевые слова: корова, жирные кислоты, компоненты молока, коэффициент наследуемости, GWAS, SNP, QTL, гены.

Молочный жир обладает наибольшей энергетической ценностью и широким спектром биологической активности. Он необходим для усвоения различных витаминов, токоферолов, фосфатов и других важных нутриентов. В молоке молочный жир находится в виде суспензии, состоящей из мелких жировых шариков размером от 0,1 до 20 мкм. По химическому составу он представляет собой производное спирта глицерина и жирных кислот (ЖК), на долю которых приходится 93-95 % массы жира. Содержание жирных кислот в молоке может значительно изменяться в зависимости от условий кормления животных, сезона года, стадии лактации и других факторов. Жирные кислоты подразделяются на две категории — насыщенные и ненасыщенные. Последние, в свою очередь, делятся на мононенасыщенные и полиненасыщенные. Содержание насыщенных кислот в коровьем молоке колеблется от 50,3 до 73,8 %, ненасыщенных — от 49,3 до 26,2 %. Из ненасыщенных ЖК в молоке больше всего содержится мононенасыщенных и меньше — полиненасыщенных (1).

Жирные кислоты представляют собой органические соединения, которые отличаются количеством атомов углерода и положением, а также количеством в них двойных связей. Коровье молоко в среднем содержит от 3,6 до 4,8% массовой доли жира. В молоко жирные кислоты поступают как свободными, так и в связанной форме глицеридов или других липидов. На триацилглицериды, которые состоят из глицерола и трех жирных кислот, приходится от 96 до 99 % молочного жира, на свободные жирные кислоты — лишь от 0,1 до 0,4 % (2).

Набор жирных кислот различается в зависимости от породы, времени года и применяемых зоотехнологий, немаловажную роль играют условия кормления коров. Состав жира молока изменяется в течение лактации. В ранний период при раздое организм животного преимущественно использует жирные кислоты C₁₆ (пальмитиновая) и C₁₈ (стеариновая) из жирового депо тканей. В течение лактации повышается доля вновь синтезированных (de novo) жирных кислот (C_{4:0}-C_{14:0}), в то время как доля жирных кислот с 17 и более атомами углерода снижается (3).

В составе молочного жира обнаружено около 140 жирных кислот, однако лишь 13 главных ЖК с четным числом атомов углерода (C_{4:0}-C_{18:3}) встречаются в количестве, которое для каждой составляет более 1 %. Остальные кислоты (например, C_{10:1}, C_{12:1}), присутствующие в количестве менее 1 % и в виде следов, относятся к так называемым минорным ЖК (2-4). У минорных ЖК доля в триглицеридах липидов молока составляет для масляной кислоты — 2,0-4,2 %, для капроновой — 1,5-3,0 %, каприловой — 1,0-2,0 %, каприновой — 2,0-3,5 %, деценовой — 0,2-0,4 %, лауриновой — 2,0-4,0%, миристинолеиновой — 0,6-1,5 %, пальмитолеиновой — 1,5-2,0 %, линолевой — 3,0-5,5 %, линоленовой — до 1,5 %, арахидиновой — до 0,3 %, бегеновой — до 0,1 %. У главных ЖК этот показатель для миристиновой кислоты составляет 8,0-13,0 %, для пальмитиновой — 22,0-33,0 %, стеариновой — 9,0-13,0 %, олеиновой — 22,0-32,0 % (4-7).

Жирные кислоты действуют на организм человека неодинаково: миристиновая оказывает негативное влияние на сердечно-сосудистую систему, вызывая заболевания, а стеариновая не имеет такого эффекта. Отмечено, что присутствие жирных кислот в организме животного в большей степени

определяется их генетически детерминированным синтезом, нежели поступлением с кормом либо мобилизацией из жировых тканей организма. Для образования жирных кислот C_{6:0}-C_{16:0}, согласно данным литературы, характерна высокая наследуемость ($h^2 = 0,41-0,43$), и это повышает эффективность селекции. Образование важных для здоровья человека ЖК (C_{18:2} cis-9,12) характеризуется относительно низкой наследуемостью ($h^2 = 0,17-0,33$), но так как их продукция отрицательно коррелирует с синтезом коротких и средних по длине цепи ЖК, то селекция по этому признаку также может быть успешной (2).

Известно, что соединения с молекулярной массой по углероду C_{18:0}-C_{18:1} влияют на фертильность на ранней стадии лактации, а количество C_{18:1} cis-9 опосредованно указывает на энергетический статус коровы и может служить для раннего прогнозирования кетозов. C_{16:0} и C_{17:1} cis-9 представляют собой удобный инструмент для оценки продукции метана и конверсии корма у коров (чем ниже выделение метана, тем лучше переваривается корм) (8, 9).

Для повышения эффективности отбора животных и поиска информативных ДНК маркеров продуктивности большой интерес представляет анализ функции каждого из компонентов молока в связи с тем или иным биологическим признаком и изучение генетической и геномной изменчивости признаков. Так, ведутся исследования по идентификации каузальных нуклеотидов (точечных мутаций) для количественных признаков (QTL), которые наравне со множеством известных некодирующих полиморфных замов (SNP) могут повысить точность детекции соответствующих мутаций и прогноза племенной ценности животного. Ведутся работы по оптимизации числа SNP с высокой долей изменчивости каузальных вариантов, достаточного для построения геномной матрицы родства при учете информации по большому числу генотипов и повышения точности оценок (10). Так, каузальные SNP, достоверно ассоциированные с хозяйственно полезными признаками у молочного скота, были детектированы на 5-й, 6-й, 9-й, 14-й, 15-й и 20-й хромосомах. Наибольшую генетическую дисперсию по показателям молочной продуктивности имели полиморфизмы, расположенные близко либо внутри генов *DGATI* (BTA14), *GHR* (BTA20), *ABCG2* (BTA6) (11-15).

Увеличение плотности SNP (уменьшение расстояния между ними) повысит вероятность выявления QTL и (до некоторой степени) точность картирования. Полногеномные ассоциации были использованы для анализа состава жира в молоке коров голштинской и джерсейской пород датского происхождения (16). Помимо стандартной процедуры генотипирования на чипах высокой плотности (777K), в этом исследовании использовалась база метаболических путей KEGG PATHWAY Database (биоинформатический ресурс для анализа геномов, <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Отмечено, что ген-кандидат *DGATI*, который очень часто фигурирует в исследованиях молочной продуктивности крупного рогатого скота, не определялся как играющий заметную роль в жировом составе молока, что еще раз указывает на сложность наследования этого признака. Однако для гена *SCD*, участвующего в катализируемом превращении кислот C_{10:0} в C_{18:0}, и *ACSS3*, вовлеченного в активацию и внутриклеточный перенос жирных кислот, были найдены значимые ассоциации с жирнокислотным составом молока.

В работе F. Kawaguchi (17) у японского черного крупного рогатого скота на основе аллельных различий между группами с высоким и низким содержанием олеиновой кислоты C_{18:1} с помощью полногеномного исследования ассоциации (GWAS) обнаружены 1993 полиморфизма в 23 генах. Среди этих 23 генов на основе анализа их функции в метаболизме жирных кислот определены три гена-кандидата, влияющие на изменчивость со-

держания олеиновой ЖК — *CYB5R4*, *MED23* и *VNN1*.

На итальянской популяции симменталов и голштинов по результатам GWAS для жирных кислот молока выявили значимые сигналы на хромосомах ВТА19 и ВТА26. Дальнейший анализ идентифицировал не только некоторые хорошо известные гены (*FASN*, *SCD* и *DGATI*) локусов количественных признаков для компонентов молочных ЖК, но и другие значимые гены-кандидаты, которые были связаны с функциональными ролями в путях липидного метаболизма. Выявленные мутации, которые связаны с профилем жирных кислот, находятся в генах *ECI2*, *PCYT2*, *DCXR*, *G6PC3*, *PYCRI*, *ALGI2*, *CYP17A1*, *ACO2*, *PI4K2A*, *GOT1*, *GPT*, *NT5C2*, *PDE6G*, *POLR3H* и *COX15* (18).

Обнаружение локусов количественных признаков и входящих в них генов, связанных с составом молочного жира, может дать ценную информацию о сложных метаболических сетях, лежащих в основе изменений в синтезе жирных кислот, и указать на возможные «точки воздействия» для улучшения состава молочного жира посредством селекции. С. Li с соавт. (19) провели GWAS анализ по 22 жирным кислотам молока у 784 коров голштинской породы китайской популяции. Всего обнаружили 83 значимых SNP и 314 предполагаемых суггестивных SNP для 18 признаков, связанных с метаболизмом жирных кислот молока. Участки хромосом, влияющие на свойства ЖК молока, в основном локализовались на ВТА1, ВТА2, ВТА5, ВТА6, ВТА7, ВТА9, ВТА13, ВТА14, ВТА18, ВТА19, ВТА20, ВТА21, ВТА23, ВТА26 и ВТА27. Из них 146 SNP оказались связаны более чем с одним признаком в метаболизме жирных кислот молока; большинство были статистически значимо связаны с несколькими SNP, особенно содержание ЖК C_{18:0} (105 SNP), C₁₈ (93 SNP) и C₁₄ (84 SNP). Некоторые SNP находятся рядом или внутри генов *DGATI*, *SCD1* и *FASN*, которые, как известно, влияют на состав молока у молочного скота. Кроме того, выявлены 20 новых высокодостоверных полиморфизмов-кандидатов для C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0}, C_{14:1}, индекса C₁₄, C_{18:0}, C_{18:1n9c}, индекса C₁₈, включая мутации в генах *HTR1B*, *CPM*, *PRKG1*, *MINPP1*, *LIPJ*, *LIPK*, *EHHADH*, *MOGAT1*, *ECHS1*, *STAT1*, *SORBS1*, *NFKB2*, *AGPAT3*, *CHUK*, *OSBPL8*, *PRLR*, *IGF1R*, *ACSL3*, *GHR* и *OXCT1* (19).

Особое место в анализе химического состава молока занимает концентрация жирных кислот, так как характеристики качества этого продукта (выход сыра, масла и сливок) в значительной степени зависят от липидного обмена в организме животного. В исследованиях Р. Gottardo (20) на 2977 голштинских, бурых швицких и симментальских коровах было установлено, что лучшим соотношением доли насыщенных и ненасыщенных жирных кислот от общего содержания жира в молоке характеризовались животные голштинской породы. Симментальские коровы по этому показателю занимали промежуточное положение, далее следовали животные бурой швицкой породы (20).

Исследования жирнокислотного состава молока коров с использованием метода инфракрасной спектроскопии широко применяются во многих странах на местных популяциях крупного рогатого скота разных пород. На содержание жирных кислот молока оказывает влияние множество факторов, поэтому для более точного ответа об эффективности селекции по таким признакам требуется изучение показателей изменчивости и наследуемости. Для нашей страны ЖК являются сравнительно новыми признаками для отбора животных и повышения качества молока. Однако в ряде западноевропейских стран жирнокислотный состав молока применяется в селек-

ции не только как критерий оценки фракций насыщенных и ненасыщенных ЖК, но также для контроля за физиологическим состоянием животных и полноценностью их кормления. В этой связи накопление информации, полученной на уровне популяции в стадах, а также в экспериментальных исследованиях, позволит уточнить перспективы отбора животных по ЖК. Валидация генетических полиморфизмов, связанных с изменчивостью жирнокислотного состава молока коров наряду с другими компонентами, даст новые знания по геномной архитектуре показателей молочной продуктивности.

В настоящей работе на российской популяции коров голштинизированной черно-пестрой и голштинской пород впервые определены параметры генетической вариабельности фракционного состава жирных кислот в молоке для использования этих данных в селекционном процессе и генетическом улучшении животных. С помощью инфракрасной спектromетрии молока и высокопроизводительного геномного сканирования в условиях экспериментальных исследований создана база данных прямых фенотипов и генотипов коров, которая позволила определить локусы количественных признаков и функциональные мутации, регулирующие синтез липидов молока в организме животных.

Цель исследований состояла в поиске полногеномных ассоциаций и полиморфизмов в генах, детерминирующих жирнокислотный состав молока коров. Для его определения применяли инфракрасную спектromетрию как один из наиболее быстрых и точных экспресс-методов физико-химического анализа состава молока.

Методика. Для формирования баз данных использовали результаты межпопуляционных наблюдений и исследований в экспериментальной популяции. На первом этапе были проведены популяционно-генетические исследования содержания жирных кислот (на основе ИК-спектров) в периоды контрольных доений (общее число образцов молока 36982) в течение 9 мес 2017-2018 годов. В исследуемую базу вошли 14 племенных стад голштинизированного черно-пестрого и голштинского скота из Московской области (размер выборки животных $n = 11529$). Созданная база данных компонентного состава молока стала основой для изучения популяционно-генетических параметров и определения изменчивости содержания в молоке следующих жирных кислот и компонентов: миристиновой (C_{14:0}), пальмитиновой (C_{16:0}), стеариновой (C_{18:0}), олеиновой (C_{18:1}) кислот, насыщенных ЖК (НЖК), мононенасыщенных ЖК (МНЖК), полиненасыщенных ЖК (ПНЖК), короткоцепочечных ЖК (КЦЖК), среднецепочечных ЖК (СЦЖК), длинноцепочечных ЖК (ДЦЖК) и транс-изомеров ЖК (ТЖК), массовой доли жира (МДЖ), белка (МДБ), казеина (МДК), лактозы (МДЛ), сухого вещества (СВ), СОМО (сухого обезжиренного молочного остатка), следов ацетона и бета-гидроксипутирата (БГБ), концентрации мочевины, точки замерзания и кислотности.

Для расчета наследуемости показателей жирнокислотного состава молока и генетических корреляций использовали следующее уравнение смешанной модели:

$$y = \mu + \text{HFMTD}_j + \text{Age}_k + \text{Lact}_l + \text{sire}_m + e_{jklm},$$

где y — исследуемый показатель молока коров-дочерей; μ — средняя популяционная константа по выборке из 14 стад; HFMTD_j — эффект хозяйства, месяца и даты контрольной дойки; Age_k — возраст 1-го отела; Lact_l — эффект номера последней завершённой лактации; sire_m — эффект быка-отца; e_{jklm} — случайная ошибка (нераспределённая дисперсия). Расчет по 14 стадам проводили на основе метода REML (residual maximum likelihood), суть которого состоит в максимизации правдоподобия получаемых значения дисперсий

через множественную процедуру итераций с использованием семейства программ BLUPF90 (21, 22).

Первичные данные по составу жирных кислот молока в экспериментальном стаде голштинизированных черно-пестрых коров получили в ПЗ «Ладожский» (филиал ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Краснодарский край, 2020-2021 годы). Сформировали группу из 144 коров, у которых было предварительно получено полное фенотипическое описание спектра ЖК и компонентов молока, а также выполнено генотипирование с помощью биочипа Bovine GGP 150K («Neogen», США). Выделение ДНК из ушных выщипов животных, SNP генотипирование и анализ проб молока проводили на базе объекта научной инфраструктуры «Биотехнология животных» (ОНИС БиоТехЖ) при ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста по стандартным протоколам.

Компонентный состав и жирные кислоты молока коров для популяционного анализа в стадах и в экспериментальной группе животных определяли на автоматическом анализаторе MilkoScan 7 DC («FOSS», Дания) по показателям, аналогичным для популяционных исследований (см. выше). В основе действия прибора лежит инфракрасная спектроскопия (применялся протокол, рекомендованный производителем). Продуктивность животного учитывали индивидуально при числе контрольных доений от 5 до 12 (в среднем 8,9 на одно животное). Пробы молока отбирали в стаканчики объемом 50 мл (использовался консервант «Microtabs», США) в момент доения животных утром, в обед и вечером.

Контроль качества генотипирования (110884 SNP), анализ полногеномных ассоциаций (GWAS, genome-wide association study) и многомерного шкалирования (MDS, multidimensional scaling) выполняли с помощью программы Plink 1.9 (23). В результате сформирована выборка генотипов из 143 геномных SNP-профиля коров экспериментальной группы с уровнем генотипирования от 99,3 до 99,7 %.

Поиск генов по выявленным значимым полиморфизмам по результатам GWAS проводили в браузере Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) по сборке генома крупного рогатого скота версии UMD 3.1. Аннотацию генов для определения локусов количественных признаков на хромосомах животных осуществляли по международной базе данных Animal QTLdb (24).

С использованием пакета «Анализ данных» в среде MS Excel 2013 рассчитывали средние значения (M) и их стандартные ошибки ($\pm SEM$), а также среднеквадратическое отклонение (SD) для изученных показателей. Степень изменчивости признаков оценивали по коэффициенту фенотипической вариации (C_{vp}). Для расчета наследуемости (h^2) использовали отношение генетической вариации к сумме генетической и остаточной вариации.

Результаты. У коров из всех компонентов молока жирные кислоты по количественному составу наиболее подвержены высокой изменчивости под влиянием как условий среды (например, кормление, технология содержания), так и генетических факторов (порода, предки, генотип). Соотношение жирных кислот в зависимости от числа атомов углерода, длины цепи и степени ее насыщения различается как между особями, так и на популяционном уровне. Понимание механизмов синтеза молочных ЖК важно для определения детерминирующих их локусов количественных признаков (QTL). Мы изучили генетическую изменчивость содержания жирных кислот в молоке коров из популяций голштинизированной черно-пестрой и голштинской пород на примере нескольких стад Подмосковья, чтобы уточнить перспективность этих признаков для селекции (табл. 1).

Наследуемость количественного состава жирных кислот молока варьировала от низких значений для полиненасыщенных ЖК ($h^2 = 0,018$) до

умеренных для средне- ($h^2 = 0,125$), длинноцепочечных ($h^2 = 0,155$) и миристиновой кислоты ($h^2 = 0,155$), мононенасыщенных ЖК ($h^2 = 0,176$) и олеиновой кислоты ($h^2 = 0,196$).

1. Фенотипические и генетические параметры состава жирных кислот в молоке коров (*Bos taurus*) из 14 племенных стад голштинизированного черно-пестрого и голштинского скота по данным контрольных доений (Московская обл., 2017-2018 годы)

Жирная кислота, группа жирных кислот	г/100 г молока		C _{вр} , %	h ²
	M±SEM	SD		
Миристиновая	0,680±0,001	0,148	21,8	0,155
Пальмитиновая	1,845±0,003	0,633	34,3	0,071
Стеариновая	0,585±0,001	0,195	33,4	0,125
Олеиновая	0,875±0,001	0,281	32,2	0,196
Насыщенные	3,600±0,004	0,861	23,9	0,083
Мононенасыщенные	1,002±0,001	0,213	23,0	0,176
Полиненасыщенные	0,005±0,000	0,011	238,8	0,018
Короткоцепочечные	0,538±0,001	0,113	21,1	0,114
Среднецепочечные	2,206±0,003	0,652	29,6	0,125
Длинноцепочечные	1,486±0,002	0,463	31,2	0,155

Примечание. Общее число образцов $n = 36982$. C_{вр} — коэффициент фенотипической вариации, h² — коэффициент наследуемости.

2. Генетические корреляции (r_g) между суточным удоем, массовой долей жира и количественным составом жирных кислот в молоке коров (*Bos taurus*) из 14 племенных стад голштинизированного черно-пестрого и голштинского скота по данным контрольных доений ($n = 11529$, Московская обл., 2017-2018 годы)

Признак	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
МДЖ	-0,032											
C14:0	-0,110	0,634										
C16:0	-0,101	0,801	0,874									
C18:0	-0,023	0,615	-0,122	0,300								
C18:1	0,053	0,393	-0,427	-0,160	0,764							
НЖК	-0,031	0,955	0,781	0,905	0,485	0,150						
МНЖК	-0,008	0,463	-0,337	-0,072	0,767	0,983	0,211					
ПНЖК	0,075	-0,465	-0,554	-0,584	-0,037	0,113	-0,569	0,097				
КЦЖК	0,045	0,815	0,551	0,608	0,482	0,264	0,852	0,255	-0,455			
СЦЖК	-0,106	0,684	0,980	0,920	-0,033	-0,384	0,818	-0,293	-0,596	0,554		
ДЦЖК	0,053	0,499	-0,325	-0,030	0,831	0,979	0,276	0,970	0,038	0,350	-0,276	
ТЖК	-0,129	-0,286	-0,637	-0,469	0,282	0,384	-0,383	0,355	0,469	-0,300	-0,643	0,396

Примечание. Общее число образцов молока 36982; 1 — суточный удой, 2 — массовая доля жира (МДЖ), 3 — C14:0, 4 C16:0, 5 — C18:0, 6 — C18:1, 7 — насыщенные жирные кислоты (НЖК), 8 — мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК), 9 — полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), 10 — короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), 11 — среднецепочечные жирные кислоты (СЦЖК), 12 — длинноцепочечные жирные кислоты (ДЦЖК). Если $r_g > 0,050$, корреляции достоверны при $p < 0,001$.

Генетические корреляции между показателями удоя, массовой долей жира (МДЖ) и жирнокислотным составом молока представлены в таблице 2 (если $r_g > 0,050$, полученные коэффициенты достоверны при $p < 0,001$). Установлено, что генетическая связь суточного удоя и МДЖ практически отсутствовала ($r_g = -0,032$), при этом наблюдалась более тесная отрицательная корреляция с содержанием транс-изомеров ЖК ($r_g = -0,129$), миристиновой кислоты ($r_g = -0,110$) и СЦЖК ($r_g = -0,106$). Взаимосвязь МДЖ и содержания различных ЖК колебалась в пределах значений r_g от 0,393 для олеиновой до 0,955 для НЖК, для ТЖК ($r_g = -0,286$) и более желательным ПНЖК ($r_g = -0,465$) значения были отрицательными. Содержание насыщенных ЖК миристиновой и пальмитиновой отрицательно коррелировало с количеством ненасыщенной олеиновой (r_g от $-0,160$ до $-0,427$), МНЖК (r_g от $-0,072$ до $-0,337$), ПНЖК (r_g от $-0,554$ до $-0,584$) и с содержанием кислот из более сложной группы с высокой молекулярной массой — ДЦЖК (r_g от $-0,030$ до $-0,325$). Связь между количеством ЖК C14:0, C16:0, с одной стороны, и ТЖК — с другой показывала, что при увеличении содержания насыщенных ЖК в молоке снижались следовые количества изомеров, бло-

кирующих синтез молочного жира (r_g соответственно от $-0,469$ до $-0,637$).

Количество ПНЖК отрицательно коррелировало с количеством КЦЖК ($r_g = -0,455$) и СЦЖК ($r_g = -0,596$), но взаимосвязь между продукцией ПНЖК и ТЖК была наиболее высокой и положительной ($r_g = 0,469$), что в сочетании с коэффициентом наследуемости свидетельствует о сложном селекционном процессе повышения этих показателей в молоке коров. Однако необходимо отметить, что проблема улучшения соотношения насыщенных и ненасыщенных ЖК в молоке в пользу последних остается нерешенной. Увеличение доли олеиновой кислоты, МНЖК, ПНЖК, ДЦЖК в молоке при отборе животных одновременно приводит к изменению жирно-кислотного состава по транс-изомерам, ЖК с короткой и средней длиной углеродной цепи.

Суммируя полученные данные (см. табл. 1, 2), можно заключить, что выявленные корреляции и показатели генетической изменчивости жирных кислот в молоке коров перспективны для дальнейшего GWAS анализа с целью корректировки программ селекции крупного рогатого скота.

Результаты анализа полученных в контрольных дойках образцов молока коров из экспериментальной группы приведены в таблице 3. Было установлено, что 50,5 % суточного удоя приходилось на утро, остальное количество распределялось между дневной и вечерней дойками примерно поровну — соответственно 23,5 и 26,0 %. Прослеживалась явная обратная линейная зависимость между величиной суточного удоя и компонентным составом молока. При меньшем объеме молока за обеденное доение в 6,1 кг повышалось процентное содержание жировой фракции (до 4,15 %, включая жирные кислоты) и сухого вещества (13,33 %).

Для белка и казеина молока, лактозы, СОМО, БГБ и мочевины не установлено значительных количественных различий при отборе образцов в разное время. Значения молярной массы ацетона, выявляемого в следовых количествах, были выше в утренних и вечерних пробах молока (соответственно 0,047 и 0,040 ммоль/л), тогда как точка замерзания — ниже (соответственно $-536,5 \times 10^{-3}$ и $-537,2 \times 10^{-3}$ °C). Коэффициент фенотипической вариации (C_{vp}) вне зависимости от времени (утро, обед, вечер) отбора проб молока (20,0-24,2 %) был выше для массовой доли жира, чем для других селекционно значимых признаков качества молока. Исходя из фенотипической изменчивости, можно полагать, что потенциальная эффективность отбора по жирным кислотам будет выше для пальмитиновой ($C_{vp} = 22,0-25,0$ %), стеариновой ($C_{vp} = 24,6-32,1$ %) кислот, длинноцепочечных ЖК ($C_{vp} = 20,2-27,8$ %), короткоцепочечных ЖК ($C_{vp} = 23,0-27,5$ %), а также суммы насыщенных ЖК ($C_{vp} = 21,5-25,8$ %).

Повторяемость (repeatability, r) между смежными контрольными доениями (утро и вечер) по изученным показателям состава молока была достаточно высокой, исключение касалось следов метаболитов — ацетона, БГБ и мочевины ($r = 0,565-0,630$) и точки замерзания молока ($r = 0,505$). Сравнительно умеренные значения были получены для олеиновой кислоты ($r = 0,625$) и полиненасыщенных ЖК ($r = 0,590$). В целом можно заключить, что контроль компонентного состава молока коров вполне целесообразно осуществлять либо по средней пробе, либо по отдельности утром и вечером, тогда как учет объема надоенного молока от коровы должен быть равен кратности доений в сутки. Полагаем, что при анализе полногеномных ассоциаций не будет значительного смещения в выявленных QTL при использовании данных, полученных при 2-кратном контроле продуктивности в сутки, то есть такого контроля достаточно.

3. Результаты расширенного анализа компонентного состава молока коров в зависимости от времени отбора проб (n = 144, экспериментальное стадо голштинизированных черно-пестрых коров, ПЗ «Ладожский», Краснодарский край, 2020–2021 годы)

Показатель	Контрольное доение												Повторяемость		
	утро				обед				вечер						
	M	±SEM	SD	C _{yp} , %	M	±SEM	SD	C _{yp} , %	M	±SEM	SD	C _{yp} , %	y/o	o/v	y/v
Удой, кг	13,0	0,1	3,6	27,3	6,1	0,1	1,8	30,1	6,70	0,10	1,90	27,8	0,750	0,724	0,762
МДЖ, %	3,22	0,03	0,78	24,2	4,15	0,03	0,80	19,3	3,81	0,03	0,76	20,0	0,596	0,740	0,652
МДБ (истинный), %	3,24	0,02	0,43	13,3	3,25	0,02	0,42	12,8	3,26	0,02	0,44	13,6	0,869	0,915	0,867
МДБ (сырой), %	3,44	0,02	0,44	12,7	3,46	0,02	0,42	12,2	3,46	0,02	0,45	12,9	0,868	0,914	0,866
МДК, %	2,71	0,01	0,36	13,4	2,76	0,01	0,35	12,8	2,75	0,01	0,38	13,7	0,868	0,914	0,862
МДЛ, %	4,78	0,01	0,20	4,2	4,80	0,01	0,20	4,1	4,79	0,01	0,20	4,1	0,765	0,855	0,751
СВ, %	12,33	0,04	1,11	9,0	13,33	0,04	1,09	8,1	12,97	0,04	1,12	8,7	0,734	0,835	0,764
СОМО, %	9,06	0,02	0,49	5,4	9,11	0,02	0,49	5,4	9,10	0,02	0,52	5,8	0,835	0,886	0,826
Ацетон, ммоль/л	0,047	0,002	0,049	105,1	0,036	0,002	0,040	111,5	0,040	0,002	0,056	139,0	0,608	0,681	0,569
Ацетон, логарифм	-1,758	0,028	0,794	45,2	-1,930	0,030	0,817	42,3	-1,827	0,027	0,775	42,4	0,581	0,623	0,630
БГБ, ммоль/л	0,017	0,001	0,024	137,7	0,017	0,001	0,024	136,7	0,017	0,001	0,027	156,5	0,631	0,717	0,570
БГБ, логарифм	-2,279	0,026	0,739	32,4	-2,282	0,027	0,738	32,3	-2,291	0,026	0,733	32,0	0,644	0,685	0,600
Мочевина, мг · 100 мл ⁻¹	41,3	0,2	4,9	12,0	42,1	0,2	4,8	11,5	39,9	0,2	4,8	12,1	0,617	0,746	0,565
Точка замерзания, × 10 ⁻³ °С	-536,5	0,3	8,1	1,5	-538,5	0,4	9,5	1,8	-537,2	0,3	9,6	1,8	0,561	0,669	0,505
Кислотность, рН	6,57	0,00	0,06	0,9	6,56	0,00	0,06	0,9	6,56	0,00	0,06	0,9	0,647	0,758	0,658
С14:0, г/100 г	0,307	0,003	0,074	24,1	0,374	0,003	0,082	21,8	0,357	0,003	0,084	23,5	0,685	0,797	0,711
С16:0, г/100 г	0,794	0,007	0,198	25,0	0,969	0,008	0,225	23,2	0,923	0,008	0,220	23,8	0,684	0,806	0,718
С18:0, г/100 г	0,295	0,003	0,095	32,1	0,383	0,003	0,094	24,6	0,352	0,003	0,091	25,8	0,658	0,775	0,709
С18:1, г/100 г	1,016	0,009	0,247	24,3	1,327	0,009	0,247	18,6	1,194	0,008	0,231	19,3	0,577	0,692	0,625
ДЦЖК, г/100 г	1,243	0,012	0,345	27,8	1,664	0,012	0,336	20,2	1,494	0,011	0,315	21,1	0,590	0,705	0,633
СЦЖК, г/100 г	1,241	0,011	0,316	25,4	1,489	0,013	0,339	22,8	1,432	0,012	0,345	24,1	0,712	0,825	0,735
КЦЖК, г/100 г	0,437	0,004	0,120	27,5	0,576	0,005	0,133	23,0	0,524	0,004	0,125	23,8	0,609	0,758	0,637
МНЖК, г/100 г	0,931	0,008	0,229	24,6	1,223	0,009	0,232	19,0	1,103	0,008	0,215	19,5	0,577	0,687	0,633
ПНЖК, г/100 г	0,124	0,001	0,025	20,3	0,150	0,001	0,026	17,3	0,135	0,001	0,024	18,0	0,545	0,656	0,590
НЖК, г/100 г	2,139	0,019	0,551	25,8	2,730	0,022	0,587	21,5	2,542	0,020	0,571	22,5	0,636	0,775	0,676

Примечание. Общее число образцов молока 2340. МДЖ — массовая доля жира, МДБ — массовая доля белка, МДК — массовая доля казеина, МДЛ — массовая доля лактозы, СВ — сухое вещество, СОМО — сухой обезжиренный молочный остаток, БГБ — бета-гидроксibuтират, ДЦЖК — длинноцепочечные жирные кислоты, СЦЖК — среднецепочечные жирные кислоты, КЦЖК — короткоцепочечные жирные кислоты, МНЖК — мононенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты, НЖК — насыщенные жирные кислоты; y/o — повторяемость между показателями контрольных доек утром и днем, o/v — днем и вечером, y/v — утром и вечером.

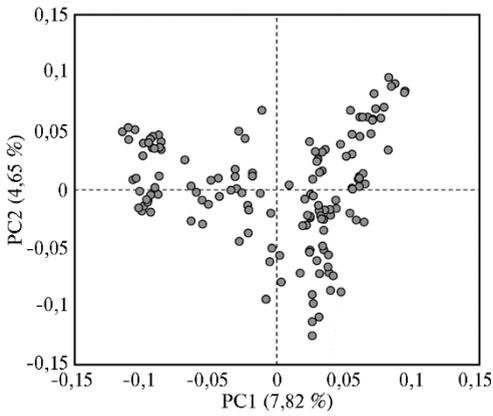


Рис. 1. Результаты анализа генетической структуры группы коров с применением метода многомерного шкалирования ($n = 144$, экспериментальное стадо голштинизированных черно-пестрых коров, ПЗ «Ладожский», Краснодарский край, 2020-2021 годы).

Мы также определили генетическую структуру экспериментальной группы животных с помощью метода многомерного шкалирования (MDS) (рис. 1). Так как стадо представлено голштинизированной черно-пестрой породой молочного крупного рогатого скота, наблюдался умеренный

размах вариабельности по компонентам изменчивости ($PC1 = 7,82 \%$, $PC2 = 4,65 \%$). В настоящее время в экспериментальном стаде проводится консолидация поголовья посредством индивидуального подбора родительских пар (коров и голштинских быков-производителей), чтобы получить как можно более однородных в генетическом отношении особей для изучения наследования количественных признаков, включая компонентный состав молока. По нашему мнению, это позволит с более высокой точностью вести оценку генотипа коров на основе фенотипирования хозяйственно полезных качеств каждого животного. Результаты MDS анализа выборки использованы нами как коварианты по осям $PC1/PC2$ для корректировки влияния генетической изменчивости на популяционную структуру экспериментального стада и снижения вероятности получения ложноположительных значений GWAS ассоциаций с прямыми фенотипическими данными по ряду компонентов молока и содержанию в нем жирных кислот.

Ранее в одном из исследований мы детектировали 32 ($p < 0.001-0.00001$) каузальные SNP мутации, ассоциированные с оценкой племенной ценности быков по содержанию ЖК в молоке коров-дочерей (наиболее значимые находились на хромосомах *ВТА1*, *ВТА5*, *ВТА6*, *ВТА10*, *ВТА11*, *ВТА14*, *ВТА19*, *ВТА22* и *ВТА26*) (25). Гены *CHST11*, *ACO2*, *PPARGC1A*, *NRXN1*, *LPIN1*, *ASIC2*, *PCDH15*, *PRKG1* оказались напрямую связаны с синтезом ЖК C_{14} , C_{16} , C_{18} , конъюгированной линолевой кислоты, с индексом насыщенных и ненасыщенных ЖК. Также были обнаружены гены, входящие в QTL, которые ассоциированы с показателями фертильности животных, линейными промерами вымени и конечностей (*NCAM2*, *FGD4*, *KCNIP4*, *SFXN1*, *NBAS*, *PGR*, *MON1B*, *GPLD1*, *PRKG1*). Анализ международной базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) по выявленным полиморфизмам показал, что выявленные гены часто проявляют плейотропное действие. Это еще раз подтверждает сложный характер наследуемости количественного состава ЖК и одновременно указывает на возможность использовать содержание ЖК в молоке для управления показателями здоровья и фертильности молочных коров (25).

Для дальнейшего поиска полногеномных ассоциаций с количественным составом ЖК молока мы соотнесли данные GWAS анализа с результатами прямого фенотипирования коров экспериментального стада по этому признаку и выявленными SNP, которые ассоциированы с собственной продуктивности дочерей быков-отцов, оцененных на популяции из Подмосковья (14 стад). Для показателей племенной ценности этих быков-отцов по ЖК ранее были получены первые результаты поиска ассоциаций.

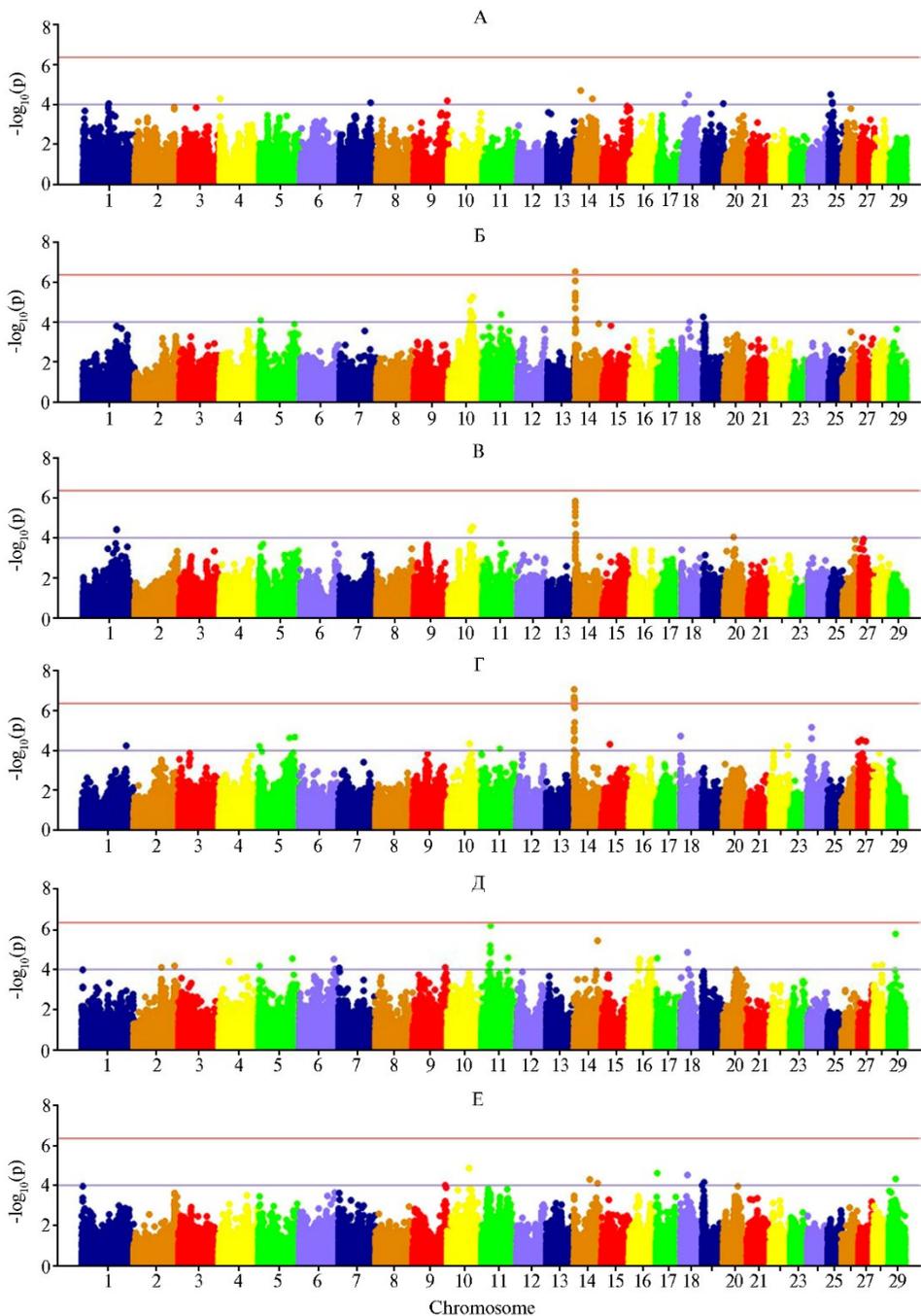


Рис. 2. Результаты GWAS анализа для суточного удоя (А), массовой доли жира (Б) и основных жирных кислот в молоке — миристиновой кислоты (В), пальмитиновой кислоты (Г), стеариновой кислоты (Д) и олеиновой кислоты (Е) на основе прямых фенотипических показателей ($n = 144$, экспериментальное стадо голштинизированных черно-пестрых коров, ПЗ «Ладожский», Краснодарский край, 2020-2021 годы).

Установлено, что для всех изученных признаков молочной продуктивности коров был характерен полигенный характер наследования и множественное действие генов, вовлеченных в контроль показателей количественного состава жирных кислот молока с разной селекционной значимостью. Так, для суточного удоя молока мы обнаружили локусы количественных признаков (QTL) на хромосомах ВТА1, ВТА4, ВТА7, ВТА9, ВТА14,

ВТА15, ВТА18 и ВТА25 (рис. 2). Изменчивость массовой доли жира (МДЖ) при GWAS анализе послужила индикатором достоверности фенотипирования остальных изученных признаков: спектры основных жирных кислот и МДЖ определяли в одних и тех же образцах, поэтому выявленные ассоциации можно считать значимыми. На хромосоме ВТА14 мы обнаружили кластеры, связанные с процентом молочного жира, в которых находится ген-кандидат жирномолочности *DGATI* (SNP мутация ARS-BFGL-NGS-4939) и ряд других сцепленных с ним генов. Также были детектированы QTL по массовой доле жира на хромосомах ВТА5, ВТА10, ВТА11 и ВТА19.

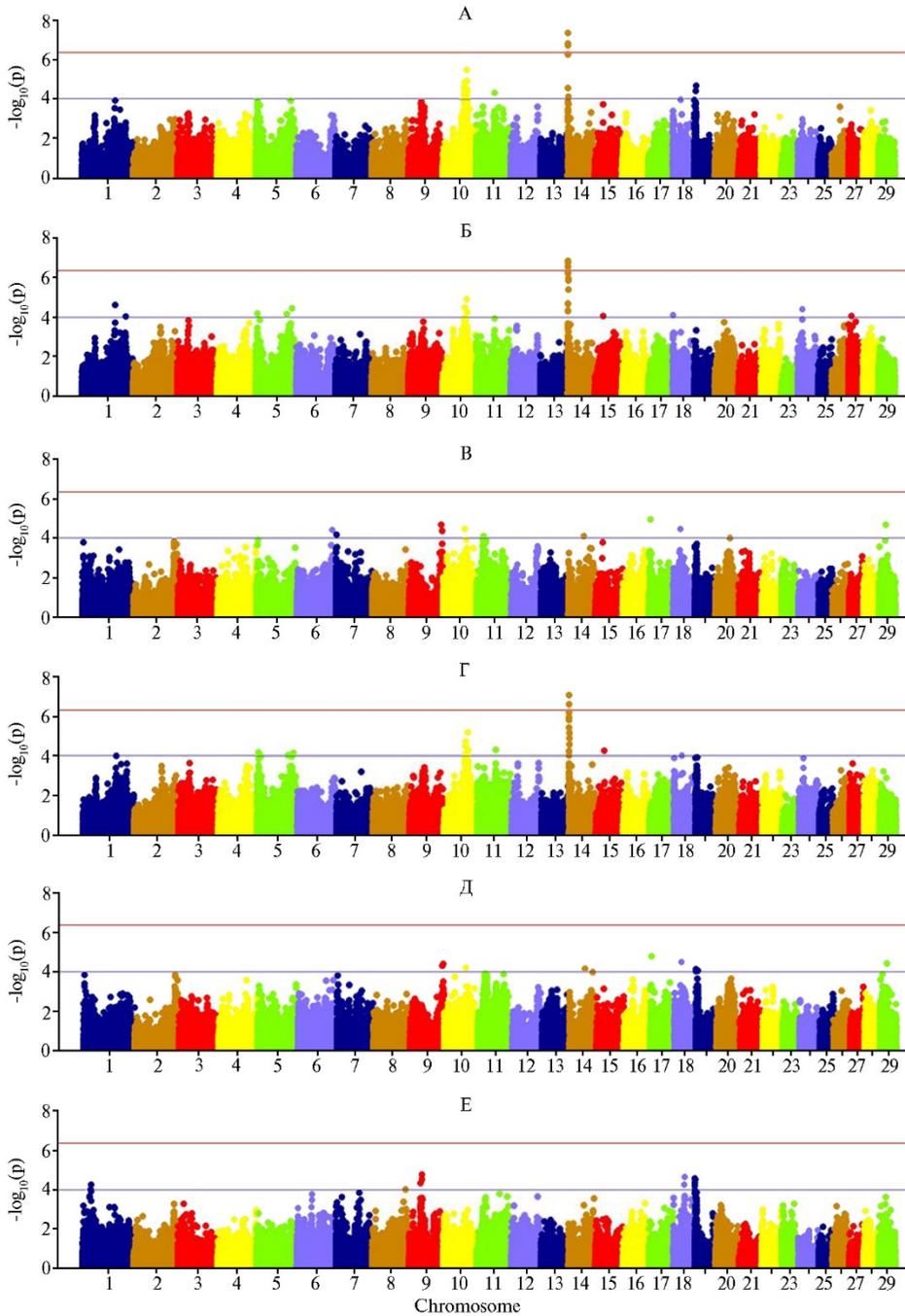


Рис. 3. Результаты GWAS анализа для короткоцепочечных жирных кислот (А), среднецепочечных

жирных кислот (Б), длинноцепочечных жирные жирных кислот (В), насыщенных жирных кислот (Г), мононенасыщенных жирных кислот (Д) и полиненасыщенных жирных кислот (Е) на основе прямых фенотипических показателей ($n = 144$, экспериментальное стадо голштинизированных черно-пестрых коров, ПЗ «Ладожский», Краснодарский край, 2020-2021 годы).

Для миристиновой и пальмитиновой ЖК мы выявили общие кластеры на ВТА5, ВТА10, ВТА14, ВТА18 и ВТА27, что в значительной степени согласовывалось с профилем ассоциаций для МДЖ молока. Стеариновая и олеиновая ЖК как длинноцепочечные ЖК показали схожую локализацию на хромосомах ВТА9, ВТА10, ВТА11, ВТА14, ВТА17, ВТА18, ВТА19, ВТА20 и ВТА29 (см. рис. 2). Для коротко- и среднецепочечных ЖК детектировались ассоциации на хромосомах ВТА1, ВТА5, ВТА10, ВТА11, ВТА14, ВТА18, ВТА19 и ВТА24. В этом отношении КЦЖК и СЦЖК оказались в большей степени схожими с миристиновой и пальмитиновой кислотами, по содержанию которых в молоке отмечались тесные генетические корреляции: для КЦЖК — соответственно $r_g = 0,551$ и $r_g = 0,608$, для СЦЖК — $r_g = 0,920$ и $r_g = 0,980$. Для длинноцепочечных ЖК были детектированы QTL на ВТА6, ВТА7, ВТА9, ВТА10, ВТА11, ВТА17, ВТА18 и ВТА29 (см. рис. 2), что в целом согласовывалось с данными для стеариновой и олеиновой кислот, имеющими схожий профиль ассоциаций, и с выявленной генетической взаимосвязью между этими признаками ($r_g = 0,831$ для стеариновой кислоты, $r_g = 0,979$ — для олеиновой).

Группа насыщенных и ненасыщенных ЖК по выявленным ассоциациям показала разный характер локализации QTL, что, по нашему мнению, преимущественно связано с особенностями их синтеза и метаболическими путями (рис. 3). Моно- и полиненасыщенные ЖК (как наиболее значимые с точки зрения питательной ценности молока) показывали общие QTL на ВТА1, ВТА2, ВТА9, ВТА11, ВТА18 и ВТА19 (см. рис. 3). Наличие разных локусов, контролирующих образование и секрецию ЖК молока, и их расположение на разных хромосомах могут быть также связаны с давлением искусственного отбора.

Для транс-изомеров ЖК не были детектированы значимые QTL, за исключением выявленных на ВТА1, ВТА6, ВТА18, ВТА22 и ВТА27, что, вероятно, связано с малой дисперсией по этому показателю (данные на рисунках не приведены).

Мы аннотировали выявленные полиморфизмы в генах, связанных с величиной суточного удоя, массовой долей жира и жирнокислотным составом молока у коров из экспериментальной группы (табл. 4). Сравнение проводили по международной базе Animal QTLdb (<https://animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>).

При картировании локусов количественных признаков для суточного удоя мы выявили наличие трех высокодостоверных ассоциаций с полиморфизмами в генах *CDH13* и *AKTIP* (ВТА18) и *ABCC1* (ВТА25) (см. табл. 4). Они также связаны с содержанием холестерина в молоке, фертильностью животных, долголетним использованием и числом соматических клеток в молоке (24). Для МДЖ, коротко-, среднецепочечных, насыщенных ЖК, С_{14:0}, С_{16:0}, С_{18:0} и С_{18:1} были установлены гены *SACNA1C*, *GCH1*, *ATG14*, *KCNH5*, *PRKCE*, *CTNNA2*, *CYHR1*, *VPS28*, *DGAT1*, *ZC3H3*, *RHPN1*, *TSNARE1*, образующие QTL на хромосомах ВТА10, ВТА11 и ВТА14. Следует отметить, что все перечисленные гены обладали плейотропным действием в отношении ряда жирных кислот. При аннотировании были обнаружены гены, сопряженные с энергетическим метаболизмом, определяющим устойчивость к кетозу (26), содержанием конъюгированной линолевой кислоты в молоке, процентом и выходом молочного жира и белка, содержанием холестерина

в молоке, содержанием пальмитиновой и пальмитолеиновой жирных кислот, удоеном за лактацию, воспроизводительными качествами животных. С помощью GWAS анализа мы выявили ген диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 1, который может служить маркером полиморфизма при изучении показателей жирномолочности и позволяет опосредованно оценить точность полученных результатов (14, 27). Мы выявили 70 различных QTL, преимущественно ассоциированных с профилем жирных кислот в молоке коров, содержанием казеинов, энергетическим статусом животных, содержанием кальция, калия и фосфора в молоке (24, 28).

4. Результаты аннотации выявленных значимых полиморфизмов ($p < 0,0001$) на хромосомах крупного рогатого скота (ВТА) ($n = 144$, экспериментальное стадо голштинизированных черно-пестрых коров, ПЗ «Ладожский», Краснодарский край, 2020-2021 годы)

Ген	Набор признаков	ВТА	Позиция, bp	
			начало	конец
<i>MED12L</i>	СЦЖК, C14:0	1	117548538	117917463
<i>EPHB1</i>	СЦЖК	1	135191077	135518801
<i>GRIN2B</i>	СЦЖК, НЖК, C16:0	5	96408804	96761516
<i>PRMT8</i>	СЦЖК, НЖК, C16:0	5	106812249	106812249
<i>ERC1</i>	СЦЖК, C16:0	5	108308618	108549124
<i>SACNA1C</i>	НЖК, C16:0	5	109152548	109417890
<i>ARFGEF3</i>	ТЖК	9	77035587	77158234
<i>RPS6KA2</i>	ДЦЖК, МНЖК	9	102918982	103074109
<i>GCH1</i>	МДЖ, ДЦЖК, СЦЖК, КЦЖК, НЖК, C14:0, C18:1	10	67576390	67631089
<i>ATG14</i>	МДЖ, СЦЖК, КЦЖК, НЖК	10	68073407	68110299
<i>PELI2</i>	КЦЖК	10	68778347	68974093
<i>KCNH5</i>	МДЖ, ДЦЖК, СЦЖК, КЦЖК, НЖК, C14:0, C18:1	10	75235434	75637242
<i>PRKCE</i>	МДЖ, C18:0	11	27935104	28472632
<i>CTNNA2</i>	МДЖ	11	54723190	55906462
<i>ARHGAP39</i>	КЦЖК	14	1563866	1600378
<i>CYHR1</i>	МДЖ, СЦЖК, КЦЖК, НЖК, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1	14	1663923	1677519
<i>VPS28</i>	МДЖ, СЦЖК, КЦЖК, НЖК, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1	14	1693641	1698490
<i>DGAT1</i>	МДЖ, СЦЖК, КЦЖК, НЖК, C14:0, C16:0	14	1795351	1804562
<i>MROH1</i>	СЦЖК, КЦЖК, НЖК, C14:0, C16:0	14	1844664	1894424
<i>MAF1</i>	СЦЖК, КЦЖК, НЖК	14	1921784	1924818
<i>GSDMD</i>	СЦЖК, C16:0	14	2341290	2346302
<i>ZC3H3</i>	МДЖ, СЦЖК, КЦЖК, НЖК, C14:0, C16:0	14	2354390	2418557
<i>RHPN1</i>	C14:0	14	2462544	2471434
<i>LY6D</i>	СЦЖК, C16:0	14	2801383	2803020
<i>TSNARE1</i>	МДЖ, СЦЖК, КЦЖК, НЖК, C14:0, C16:0	14	3054763	3171546
<i>CPQ</i>	C18:0, C18:1	14	69287302	69893052
<i>CPE</i>	ДЦЖК, МНЖК	17	546398	697915
<i>CDH13</i>	Суточный удой	18	9512739	10162782
<i>AKTIP</i>	Суточный удой	18	21926577	21937955
<i>FTO</i>	МНЖК, C18:0, C18:1	18	22118201	22541532
<i>ABCC1</i>	Суточный удой	25	14469282	14570639
<i>TNKS</i>	ТЖК, C16:0	27	24632930	24789416
<i>FAT3</i>	ДЦЖК, МНЖК, C18:0, C18:1	29	1965869	2605125
<i>LUZP2</i>	ДЦЖК, МНЖК, C18:0, C18:1	29	20259769	20557376

Примечание. МДЖ — массовая доля жира, ДЦЖК — длинноцепочечные жирные кислоты, СЦЖК — среднецепочечные жирные кислоты, КЦЖК — короткоцепочечные жирные кислоты, МНЖК — мононенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты, НЖК — насыщенные жирные кислоты, ТЖК — транс-изомеры жирных кислот.

Коротко- и среднецепочечные ЖК, миристиновая и пальмитиновая кислоты, насыщенные ЖК показали связь с полиморфизмами в генах *MED12L*, *EPHB1*, *GRIN2B*, *PRMT8*, *ERC1*, *PELI2*, *ARHGAP39*, *MROH1*, *MAF1*, *GSDMD*, *LY6D* (см. табл. 4), которые были ассоциированы с количеством плодотворных осеменений, легкостью отела, коэффициентом стельности

дочерей быков, процентным содержанием жира и белка в молоке, пальмитиновой ЖК, прикреплением и глубиной вымени коров, маститом и числом соматических клеток в молоке (24).

Для длинноцепочечных, мононенасыщенных ЖК, стеариновой и олеиновой кислот в результате аннотации выявлены следующие селекционно значимые гены: *RPS6KA2*, *CPQ*, *CPE*, *FTO*, *FAT3*, *LUZP2* (см. табл. 4). Их полиморфизмы также сопряжены с изменчивостью предрасположенности коров к маститу, линейными промерами экстерьеря животных (конечности и вымя), фертильностью, выходом молочного жира и числом соматических клеток в молоке (29). Транс-изомеры ЖК, несмотря на низкую вариабельность по сравнению с другими фракциями жирных кислот молока, в нашем исследовании показали связь с полиморфизмами в генах *ARFGEF3* и *TNKS*, о которых известно, что они ассоциировались с удоем молока коров (30).

Таким образом, на основе изучения генетической и фенотипической вариабельности состава молока на популяционном уровне в 14 стадах молочного скота (Московская область) и затем в экспериментальном стаде коров голштинизированной черно-пестрой породы (Краснодарский край) установлены селекционные константы и ряд достоверных ассоциаций между выявленными полиморфизмами генов и образованием жирных кислот молока. С использованием популяционно-генетического анализа по соотношению межгрупповой и общегрупповой вариантов показана наибольшая наследуемость содержания олеиновой ($h^2 = 0,196$) кислоты, мононенасыщенных жирных кислот (ЖК) ($h^2 = 0,176$), длинно- и среднецепочечных ЖК ($h^2 = 0,125-0,55$), стеариновой ($h^2 = 0,125$) кислоты. Эти признаки могут быть рекомендованы при оценке быков-производителей по качеству потомства. Исследования, проведенные на группе коров, генотипированных и фенотипированных по расширенному компонентному составу молока, позволили получить новые данные о локализации QTL жирнокислотного состава в геномах животных российского происхождения. В результате аннотации в генах *CACNA1C*, *ARFGEF3*, *RPS6KA2*, *GCH1*, *ATG14*, *PELI2*, *KCNH5*, *PRKCE*, *CTNNA2*, *ARHGAP39*, *CYHR1*, *VPS28*, *DGAT1*, *MROH1*, *MAF1*, *GSDMD*, *ZC3H3*, *RHPN1*, *LY6D*, *TSNARE1*, *CPQ*, *CPE*, *FTO*, *TNKS*, *FAT3* и *LUZP2* установлены полиморфизмы, достоверно ассоциированные с изменчивостью содержания ЖК в молоке. Насыщенные жирные кислоты в сравнении с ненасыщенными показали большую вариабельность результатов GWAS, что, вероятно, связано с более сильным селекционным давлением. Дальнейшее изучение генетических механизмов наследования жирнокислотного состава молока позволит разработать основу стратегии селекции по этому признаку.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр
животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: alex_sermyagin85@mail.ru ✉, ignatieva-lp@mail.ru,
lashnevaira@gmail.com, kscins@gmail.com, ok.kositsina@mail.ru,
preevetic@mail.ru, n_zinovieva@mail.ru

Поступила в редакцию
30 сентября 2022 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2022, V. 57, № 6, pp. 1083-1100

USING OF INFRARED HIGH-PERFORMANCE SPECTROMETRY DATA FOR GENOME-WIDE ASSOCIATIONS STUDY OF FATTY ACID COMPOSITION AND MILK COMPONENTS IN DAIRY CATTLE (*Bos taurus*)

A.A. Sermyagin✉, L.P. Ignatieva, I.A. Lashneva, A.A. Kositsin, O.V. Kositsina,

Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail alex_sermyagin85@mail.ru (✉ corresponding author), ignatieva-lp@mail.ru, lashnevair@gmail.com, kscicins@gmail.com, ok.kositsina@mail.ru, preevetic@mail.ru, n_zinovieva@mail.ru

ORCID:

Sermyagin A.A. orcid.org/0000-0002-1799-6014

Kositsina O.V. orcid.org/0000-0002-3637-4202

Ignatieva L.P. orcid.org/0000-0003-2625-6912

Abdelmanova A.S. orcid.org/0000-0003-4752-0727

Lashneva I.A. orcid.org/0000-0009-4276-8782

Zinovieva N.A. orcid.org/0000-0003-4017-6863

Kositsin A.A. orcid.org/0000-0001-8484-4902

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation, project No. 21-76-20046

Received September 30, 2022

doi: 10.15389/agrobiol.2022.6.1083eng

Abstract

Milk fat percentage is highly variable and depends on environmental conditions which include feeding and farm technology, and on genetic factors such as breed and genotype features. The content of fatty acids (FA) is a biomarker for the physiological state of animals and a parameter of raw milk suitability for processing (yield of cheese, butter and cream). FA profile of milk in terms of C number, the chain length and saturation degree differs between individuals and at the population level. Therefore, the study of genetic and genomic variability of milk production traits to improve the efficiency of animal selection remains relevant. This study aimed at searching for genome-wide associations and polymorphisms in genes involved in milk fatty acid production. In the study, infrared spectrometry was used as an accurate and rapid method to analyze milk composition. Population variability of milk fatty acid profiles was studied using 36982 milk samples from Holsteinized Black-and-White and Holstein cows of 14 breeding herds from the Moscow region in 2017–2018. The heritability (h^2) and correlation (r_g) coefficients for cows' milk components were calculated using REML (residual maximum likelihood) method with BLUPF90 family software. SNPs were detected for a dataset of Holsteinized Black-and-White cows from an experimental herd (the breeding farm Ladozhsky, branch of Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Krasnodar Territory, 2020–2021). Milk composition was determined using an infrared spectroscopy-based automatic MilkoScan 7 DC analyzer (FOSS, Denmark). A group of 144 cows subjected to phenotyping for fatty acids and milk components were individually genotyped (Bovine GGP 150K biochip, Neogen, USA). Plink 1.9 software was applied to control genotyping quality (110884 SNPs) and to perform GWAS (genome-wide association study) analysis and multidimensional scaling (MDS). Searching genes by identified significant polymorphisms was performed using the bovine genome assembly *Bos taurus* UMD 3.1.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>) and the Ensembl genome browser. QTL annotation was carried out using the Animal QTLdb database. In general, milk fatty acids showed a heritability level that ranged from low to moderate, varying from $h^2 = 0.018$ for polyunsaturated fatty acids to $h^2 = 0.125$ for medium-chain FAs, $h^2 = 0.155$ for long-chain FAs, $h^2 = 0.155$ for myristic acid, $h^2 = 0.176$ for monounsaturated FAs, and $h^2 = 0.196$ for oleic acid. Visualizing experimental cows' population structure by multidimensional scaling showed a moderate range of variability (PC1 = 7.82 %, PC2 = 4.65 %). For myristic and palmitic acids, common QTL clusters are identified on BTA5, BTA10, BTA14, BTA18, and BTA27. For stearic and oleic acids (as members of the long-chain FA family), similar location of QTLs is found on BTA9, BTA10, BTA11, BTA14, BTA17, BTA18, BTA19, BTA20, and BTA29. For short- and medium-chain FAs, there are associations revealed on BTA1, BTA5, BTA10, BTA11, BTA14, BTA18, BTA19, and BTA24. For long-chain FAs, QTLs are detected on BTA6, BTA7, BTA9, BTA10, BTA11, BTA17, BTA18, and BTA29. For short- and medium-chain FAs, saturated FAs, C14:0, C16:0, C18:0 and C18:1, the genes *CACNA1C*, *GCHI*, *ATG14*, *KCNH5*, *PRKCE*, *CTNNA2*, *CYHR1*, *VPS28*, *DGAT1*, *ZC3H3*, *RHPN1*, *TSNARE1* are identified which form QTLs on BTA10, BTA11 and BTA14. Short- and medium-chain FAs, myristic and palmitic acids and saturated FAs show associations with polymorphisms in the *MED12L*, *EPHB1*, *GRIN2B*, *PRMT8*, *ERC1*, *PELI2*, *ARHGAP39*, *MROH1*, *MAF1*, *GSDMD*, and *LY6D* genes. For long-chain, monounsaturated fatty acids, stearic and oleic acids, there are significant associations with genes *RPS6KA2*, *CPQ*, *CPE*, *FTO*, *FAT3*, and *LUZP2* which may be valuable for **genetic improvement** of dairy cattle. Continued study of the inheritance of cows' milk fatty acids and other components is necessary to develop a strategy for breeding dairy cattle with a better fatty acid profile and milk composition.

Keywords: cow, fatty acids, milk components, heritability, GWAS, SNP, QTL, genes.

REFERENCES

1. Sermyagin A., Zinov'eva N., Ermilov A., Yanchukov I. *Zhivotnovodstvo Rossii*, 2019, S1: 65–68 (doi: 10.25701/ZZR.2019.17.64.008) (in Russ.).

2. Appolonova I.A., Smirnova E.A., Nikanorova N.P. *Pishcheyaya promyshlennost'*, 2012, 11: 72-45 (in Russ.).
3. Lashneva I.A., Sermyagin A.A. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2020, 3: 46-50 (doi: 10.24411/0235-2451-2020-10309).
4. Soyeurt H. Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(12): 4858-4865 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72534-6).
5. DePeters E.J. Fatty acid and triglyceride composition of milk fat from lactating Holstein cows in response to supplemental canola oil. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84(4): 929-936 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74550-X).
6. Collomb M. Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *International Dairy Journal*, 2004, 14(6): 549-559 (doi: 10.1016/j.idairyj.2003.11.004).
7. *GOST R 52253-2004 «Maslo i pasta maslyanaya iz korov'ego moloka. Obshchie tekhnicheskie usloviya»* [GOST R 52253-2004 Butter and butter paste from cow's milk. General technical conditions]. Moscow, 2005 (in Russ.).
8. Vanlierde A., Vanrobays M.-L., Dehareng F., Froidmon E., Soyeurt H., McParland S., Lewis E., Deighton M.H., Grandl F., Kreuzer M., Gredler B., Dardenne P., Gengler N. Hot topic: Innovative lactation-stage-dependent prediction of methane emissions from milk mid-infrared spectra. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(8): 5740-5747 (doi: 10.3168/jds.2014-8436).
9. Shetty N., Difford G., Lassen J., Luvvendahl P., Buitenhuis A.J. Predicting methane emissions of lactating Danish Holstein cows using Fourier transform mid-infrared spectroscopy of milk. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(11): 9052-9060 (doi: 10.3168/jds.2017-13014).
10. Fragomeni B.O., Lourenco D.A.L., Masuda Y., Legarra A., Misztal I. Incorporation of causative quantitative trait nucleotides in single-step GBLUP. *Genetic Selection Evolution*, 2017, 49: 59 (doi: 10.1186/s12711-017-0335-0).
11. Smaragdov M.G. *Genetika*, 2008, 44(6): 829-834 (in Russ.).
12. Smaragdov M.G. *Genetika*, 2011, 47(1): 126-132 (in Russ.).
13. Smaragdov M.G. *Genetika*, 2012, 48(9): 1085-1090 (in Russ.).
14. 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. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, 51(2): 182-193 (doi:10.15389/agrobiol.2016.2.182eng).
15. Weller J.I., Ezra E., Ron M. Invited review: A perspective on the future of genomic selection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(11): 8633-8644 (doi: 10.3168/jds.2017-12879).
16. Buitenhuis B, Janss LL, Poulsen NA, Larsen LB, Larsen MK, Sørensen P. Genome-wide association and biological pathway analysis for milk-fat composition in Danish Holstein and Danish Jersey cattle. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1112 (doi: 10.1186/1471-2164-15-1112).
17. Kawaguchi F., Kigoshi H., Fukushima M., Iwamoto E., Kobayashi E., Oyama K., Mannen H., Sasazaki S. Whole-genome resequencing to identify candidate genes for the QTL for oleic acid percentage in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, 2019, 90(4): 467-472 (doi: 10.1111/asj.13179).
18. Palombo V., Milanese M., Sgorlon S., Capomaccio S., Melel M., Nicolazzi E., Ajmone-Marsan P., Pilla F., Stefanon B., D'Andrea D. Genome-wide association study of milk fatty acid composition in Italian Simmental and Italian Holstein cows using single nucleotide polymorphism arrays. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(12): 11004-11019 (doi: 10.3168/jds.2018-14413).
19. LI C., Sun D., Zhang S., Wang S., Wu X., Zhang Q., Liu L., Li Y., Qiao L. Genome wide association study identifies 20 novel promising genes associated with milk fatty acid traits in Chinese Holstein. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e96186 (doi: 10.1371/journal.pone.0096186)
20. Gottardo P., Tiezzi F., Penasa M., Toffanin V., Cassandro M., De Marchi M. Milk fatty acids predicted by midinfrared spectroscopy in mixed dairy herds. *Agricultural Conspectus Scientificus*, 2013, 78(3): 263-266.
21. Misztal I., Tsuruta S., Lourenço D., Aguilar I., Legarra A., Vitezica Z. *Manual for BLUPF90 family of programs*. Athens, University of Georgia, 2014.
22. Masuda Y. *Introduction to BLUPF90 suite programs. Standard Edition*. University of Georgia, 2019.
23. Chang C.C., Chow C.C., Tellier L.C.A.M., Vattikuti S., Purcell S.M., Lee J.J. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 2015, 4(1): s13742-015-0047-8 (doi: 10.1186/s13742-015-0047-8).
24. Hu Z.L., Park C.A., Reecy J.M. Bringing the Animal QTLdb and CorrDB into the future: meeting new challenges and providing updated services. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D956-D961 (doi: 10.1093/nar/gkab1116).
25. Sermyagin A.A., Lashneva I., Ignatieva L.P., Kositsin A., Gladyr E., Ermilov A., Yanchukov I., Zinovieva N.A. PSXI-3 genome-wide association study for MIR-predicted milk fatty acids composition in Russian Holstein cattle population. *Journal of Animal Science*, 2021, 99(Suppl_3): 245-246 (doi: 10.1093/jas/skab235.448).
26. Huang H., Cao J., Hanif Q., Wang Y., Yu Y., Zhang S., Zhang Y. Genome-wide association

- study identifies energy metabolism genes for resistance to ketosis in Chinese Holstein cattle. *Animal Genetics*, 2019, 50(4): 376-380 (doi: 10.1111/age.12802).
27. Schennink A., Stoop W.M., Visker M.H.P.W., Heck J.M.L., Bovenhuis H., Van Der Poel J.J., Van Valenberg H.J.F., Van Arendonk J.A.M. DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Animal Genetics*, 2007, 38(5): 467-473 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2007.01635.x).
 28. Bovenhuis H., Visker M.H.P.W., Poulsen N.A., Sehested J., Van Valenberg H.J.F., Van Arendonk J.A.M., Larsen L.B., Buitenhuis A.J. Effects of the diacylglycerol o-acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism on fatty acid, protein, and mineral composition of dairy cattle milk. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(4): 3113-3123 (doi: 10.3168/jds.2015-10462).
 29. Ilie D.E., Mizeranschi A.E., Mihali C.V., Neamț R.I., Goilean G.V., Georgescu O.I., Zaharie D., Carabaș M., Huțu I. Genome-wide association studies for milk somatic cell score in Romanian dairy cattle. *Genes (Basel)*, 2021, 12(10): 1495 (doi: 10.3390/genes12101495).
 30. Tiplady K.M., Lopdell T.J., Sherlock R.G., Johnson T.J.J., Spelman R.J., Harris B.L., Davis S.R., Littlejohn M.D., Garrick D.J. Comparison of the genetic characteristics of directly measured and Fourier-transform mid-infrared-predicted bovine milk fatty acids and proteins. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(12): 9763-9791 (doi: 10.3168/jds.2022-22089).