

ANIMAL HUSBANDRY

DOI: <https://doi.org/10.23649/jae.2022.27.7.008>

Gainutdinova E.R.¹, Safina N.Yu.^{2*}, Fattakhova Z.F.³, Shakirov S.K.⁴

^{1, 2, 3, 4} Tatar Scientific Research Institute of Agriculture of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

* Corresponding author (natysafina[at]gmail.com)

Received: 13.10.2022; Accepted: 24.10.2022; Published: 18.11.2022

THE IDENTIFICATION OF OSTEOPONTIN GENE POLYMORPHISM (*OPN*) IN THE POPULATION OF HOLSTEIN CATTLE OF THE REPUBLIC OF TATARSTAN

Research article

Abstract

The detection of polyphen candidate gene variants affecting a variety of traits is of paramount importance for increasing milk productivity without harming reproductive ability. In dairy cattle, the *OPN* gene has been identified as a positional candidate gene for many QTL (quantitative trait locus). The work was aimed at studying the polymorphism (c.8514C > T) of the *OPN – Bsel I* gene by PCR-RELP in the population of Holstein cattle of the Republic of Tatarstan, the genetic balance and structure of the population were evaluated. During DNA diagnostics of 258 cows, alleles C (0.432) and T (0.568) and genotypes CC (14.3%), CT (57.8%) and TT (27.9%) were detected, which indicates polymorphism with a high level of genetic biodiversity. The variability between the observed and expected genotype distribution was 8.06. Chi-square testing method has established that the genetic balance in the studied population is not distorted. It was found that, depending on the habitat and breed, the frequency of occurrence of alleles and genotypes of the *OPN* gene varies. Since the *OPN* gene was previously associated with embryonic development, pregnancy course, multiple births, as well as milk productivity and milk quality, the inclusion of DNA diagnostics in the breeding process will help to stabilize milk productivity without harming the reproductive ability of dairy cows.

Keywords: gene, allele, genotype, polymorphism, PCR-RELP, *OPN*, osteopontin, cattle.

Гайнутдинова Э.Р.¹, Сафина Н.Ю.^{2*}, Фаттахова З.Ф.³, Шакиров Ш.К.⁴

^{1, 2, 3, 4} Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

* Корреспондирующий автор (natysafina[at]gmail.com)

Получена: 13.10.2022; Доработана: 24.10.2022; Опубликована: 18.11.2022

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ОСТЕОПОНТИН (*OPN*) В ПОПУЛЯЦИИ ГОЛШТИНСКОГО КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Научная статья

Аннотация

Обнаружение плейотропных вариантов генов-кандидатов, влияющих на множество признаков, имеет первостепенное значение для повышения молочной продуктивности без ущерба воспроизводительной способности. У молочного скота ген *OPN* был идентифицирован, как позиционный ген-кандидат для многих QTL (локусов количественных признаков). Работа была направлена на изучение полиморфизма (с.8514C > T) гена *OPN – Bsel I* методом ПЦР-ПДРФ в популяции голштинского скота Республики Татарстан, оценено генетическое равновесие и структура популяции. В ходе ДНК-диагностики 258 голов коров идентифицированы аллели С (0,432) и Т (0,568) и генотипы – СС (14,3%), СТ (57,8%) и ТТ (27,9%), что свидетельствует о полиморфности с высоким уровнем генетического биоразнообразия. Вариабельность между наблюдаемым и ожидаемым распределением генотипов составила 8,06. Тестирование методом хи-квадрат установило, что генетическое равновесие в исследуемой популяции не нарушено. Установлено, что в зависимости от ареала обитания и породы частота встречаемости аллелей и генотипов гена *OPN* варьируется. Так как ген *OPN* ранее был ассоциирован с эмбриональным развитием, поддержанием беременности, многоплодием, а также молочной продуктивностью и качественным составом молока, включение ДНК-диагностики в селекционный процесс поможет стабилизировать молочную продуктивность без ущерба для воспроизводительной способности дойных коров.

Ключевые слова: ген, аллель, генотип, полиморфизм, ПЦР-ПДРФ, *OPN*, остеопонтин, крупный рогатый скот.

1. Введение

Генетический отбор крупного рогатого скота по продуктивным признакам (особенно по удою), согласно современным программам разведения, негативно повлиял на фертильность и репродуктивную функцию за счет их отрицательных генетических корреляций [1]. Многообещающим подходом для устранения сложившейся ситуации является генотипирование и использование тесно связанных вариантов в известных локусах количественных признаков (QTL) с признаками фертильности и репродукции в селекционно-племенных планах, что позволит повысить точность прогнозирования таких показателей [2]. Обнаружение плеiotропных вариантов генов-кандидатов, влияющих на множество признаков, имеет первостепенное значение для увеличения молочной продуктивности без ущерба воспроизводительной способности.

Остеопонтин (OPN) известен как секретируемый фосфопротеин 1 (SPP1). Этот термин происходит от двух латинских слов: *osteo* — кость и *pontin* — мост, что связано с жизненно важной ролью OPN в организме: связывание кальция и формирование скелетной структуры [3]. OPN представляет собой хемокиноподобный гликопротеин, который экспрессируется главным образом на остеокластах, остеобластах и зубах, а также на эпителиальных клетках молочных желез, почек и кожи, на нейронах и эндотелиальных клетках сосудов, а также на границе раздела матери и плода [4]. Этот белок содержится в крови, молоке, моче, желчи и сперме [5].

Ген *bovine OPN* (остеопонтин) картирован на ВТА6 (NC 007304.2), состоит из 6961 п.н. общей длины: 1331 п.н. обработанной длины и 278 п.н. длины белкового продукта [6]. У молочного скота ген *OPN* был идентифицирован, как позиционный ген-кандидат для многих QTL (локусов количественных признаков). Большинство исследований гена *OPN* было направлено на изучение полиморфизма в интроне 4 SNP с.8514 C→T (GenBank: NW_255516) [5], [6], [7].

Зарубежными авторами установлены ассоциации полиморфизма гена *OPN* с признаками молочной и мясной продуктивности [8], качественным составом молока [9], количеством соматических клеток в молоке [10] и стойкостью лактации [11].

Имеются сведения о влиянии остеопонтина на рост телят после отъема и общий рост тканей организма животных [12]. Ранее сообщалось, что ген *OPN* участвует в таких процессах, как ангиогенез, клеточная адгезия, апоптоз, регуляция воспаления и заживления ран [13], поддержание беременности в течение всего срока [9], [14], многоплодие, эмбриональный рост, а также развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* [6], [15].

Принимая во внимание широкий спектр влияния полиморфизма гена *OPN* на хозяйственно-полезные признаки, изучение его в популяции крупного рогатого скота Республики Татарстан представляет теоретический и практический интерес.

2. Методы

Исследования проводились на 258 полновозрастных коровах голштинской породы в СХПК «Племенной завод им. Ленина» Атнинского района Республика Татарстан. ДНК экстрагировали набором «АплиПрайм» ДНК-сорб-В (Некст БИО, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Полиморфизм гена *OPN* (с.8514 C→T) выявляли по методу ПЦР-ПДРФ с применением следующих олигонуклеотидных праймеров (СибЭнзим, Россия):

F: 5'-GCAAATCAGAAGTGTGATAGAC-3'

R: 5'-CCAAGCCAAACGTATGAGTT-3' [14].

Реакционную смесь амплифицировали при помощи термоциклера «Thermal Cycler 100» (BIO RAD, США), с модифицированными температурно-временными режимами: денатурация в течение 5 мин. при температуре 93 °С, затем 33 цикла отжига 94 °С - 30 сек., 61 °С - 30 сек., 72 °С - 30 сек. и элонгация 72 °С - 5 мин. Полиморфизм длин фрагментов определяли при помощи эндонуклеазы рестрикции *BseI I* (СибЭнзим, Россия) при температуре 65 °С в течение 2 ч.

Электрофоретическое разделение проводилось в 2,6 % агарозном геле, содержащий бромид этидиума и 1*ТБЕ, в течение 25 минут. Визуализацию и документирование идентифицированных фрагментов реакции выполняли на оборудовании «GelDoc Go» с программным обеспечением «Image Lab Touch» V. 3.0 (BIO RAD, США).

Частоту встречаемости аллелей и генотипов, и генетическое равновесие в исследуемой популяции согласно закону Харди-Вайнберга рассчитывали согласно методическим рекомендациям по биометрии в селекции и генетике [16].

3. Результаты и обсуждение

Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза в агарозном геле показало сочетание фрагментов в зависимости от генотипа животного. Различные генотипы представлены следующим количеством оснований: СС – 200 и 90 п.о.; СТ – 290, 200 и 90 п.о.; ТТ – 290 п.о. (рис 1).

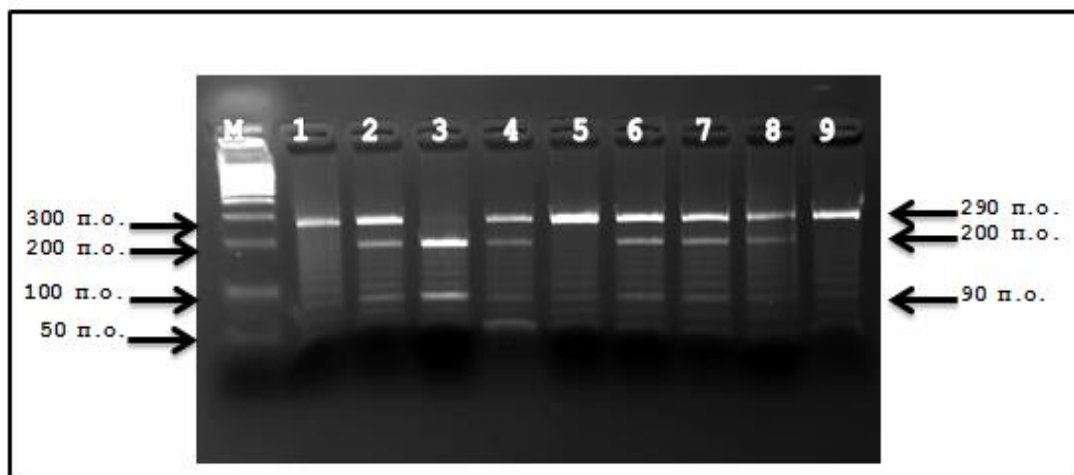


Рис. 1 – Электрофореграмма результатов детекции ПЦР-ПДРФ анализа по гену *OPN*:
M – ДНК маркер; *CC* – 3; *CT* – 2, 4, 6, 7, 8; *TT* – 1, 5, 9

В результате ДНК-тестирования образцов биологического материала и последующей визуализации продуктов ПЦР-ПДРФ анализа было выявлено 2 аллеля и 3 генотипа (рис. 2).

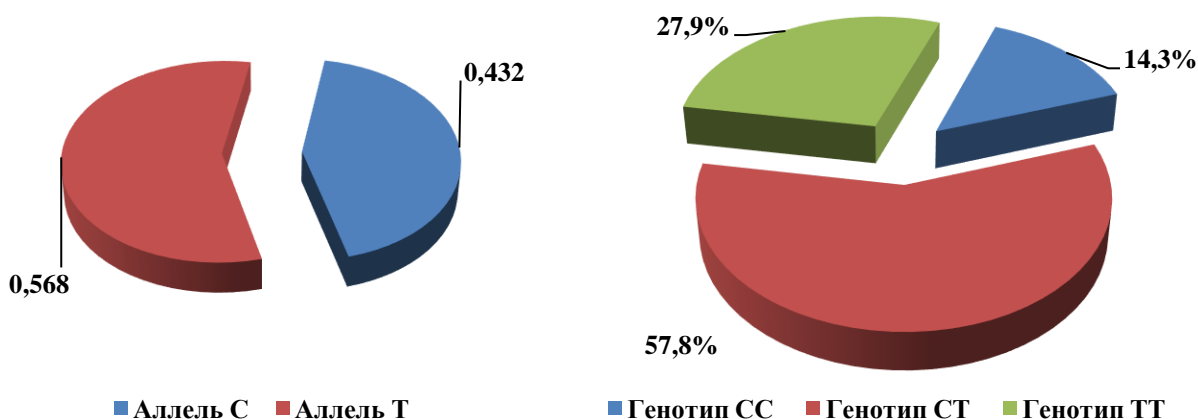


Рис. 2 – Генетическая структура популяции по гену *OPN*

Выделенный полиморфизм гена *OPN* (с.8514 С→Т) в 4 интроне оказался полиморфным в нашей группе животных. Оба аллеля показали относительно одинаковую частоту: С – 0,432 и Т – 0,568. Частота встречаемости генотипов получила следующее соотношение: *CC* - 14,3, *CT* – 57,8 и *TT* – 27,9 % (табл.1).

Таблица 1 – Частота встречаемости генотипов гена *OPN*, n = 258

Распределение	Генотипы						Аллели		χ^2
	CC		CT		TT		С	Т	
	n	%	n	%	n	%			
Наблюдаемое	37,0	14,3	149,0	57,8	72,0	27,9	0,432	0,568	8,06
Ожидаемое	48,2	18,7	126,6	49,1	83,2	32,2			

Вариабельность между наблюдаемым и ожидаемым распределением генотипов установлена на уровне $\chi^2=8,06$ ($\chi^2_{крит(0,01)} = 9,2$). Отмечается незначительное смещение в сторону наращивания гомозиготности. Вероятно, что смещение генетического равновесия образуется вследствие того, что исследуемая популяция не является панмиктической, и осеменение коров производят закупной спермопродукцией от быков-производителей как Республики Татарстан, так и других субъектов Российской Федерации, а также у зарубежных фирм-поставщиков биологического материала. Установлено, что тестируемая популяция находится в состоянии генетического равновесия согласно закону Харди-Вайнберга.

Высокая частота Т-аллеля, по сравнению с аллелем С у крупного рогатого скота, была обнаружена во многих исследованиях. По данным ряда авторов частота аллеля Т варьирует от 0,503 до 0,830. Встречаемость аллеля Т в работах исследователей голштинского скота составила: 0,590 и 0,530 у иранских популяций [5], [17], 0,503 у польской популяции [6], 0,760 у индийской популяции [18] и 0,719 у бразильской [19]. Также преобладание аллеля Т над С гена *OPN* отмечалось в результатах, описывающих скот породы чешский Флекви – 0,820 [20], аборигенный турецкий скот – 0,820 [21] и поместный аборигенный скот Индонезии – 0,830 [4].

Однако в одном источнике зафиксирована мономорфная по гену *OPN* популяция скота с отсутствием аллеля С [22].

В исследованиях других ученых прослеживается преобладание аллеля С над аллелем Т. Частота встречаемости аллеля С гена *OPN* колеблется от 0,528 до 0,780. Так распространенность аллеля С по данным литературных источников составила: 0,528 у турецкой популяции [21], 0,596 в американской популяции [8], 0,529 и 0,780 у польских животных двух популяций [7], [10].

В целом, анализ аллельного полиморфизма гена *OPN* в работах зарубежных исследователей, направленных на изучение голштинского скота, согласуется с данными, полученными в нашем эксперименте. Средняя частота аллеля С в протестированных группах составляет 0,463, а в нашем случае – 0,432.

Изучение гена *OPN* в популяциях крупного рогатого скота различного ареала обитания и породных групп показало, что генотип ТТ является высокочастотным, по сравнению с генотипами СС и СТ. В отдельных группах животных частота встречаемости генотипа ТТ имела свыше 52,5–68,3 % [4], [18], [19], [20], [21] и достигала до полного 100%-ого доминирования [22]. Генотип СС проявил свое численное превосходство у особей лишь в одном стаде коров джерсейской породы в Польше, и составил 57,8% от общего количества голов [10]. В трех популяциях голштинского скота установлено преобладание более 50,0% животных-носителей гетерозиготного генотипа СТ [6], [17], [23].

По итогам мониторинга генетического полиморфизма гена *OPN* крупного рогатого скота голштинской породы разных стран было установлено, что в большинстве популяций наблюдается схожая картина с генетической структурой, оцененного нами поголовья. Частота встречаемости генотипов имеет следующую последовательность распределения СТ > ТТ > СС, что в процентном виде составляет в среднем по группам животных 53,0% > 27,0% > 20,0%. Однако, в одной работе у индийских особей голштинской породы генотип ТТ принимает максимальное значение – 60,0% [18].

Изучение взаимосвязей полиморфных вариантов гена *OPN* с продуктивными и репродуктивными качествами крупного рогатого скота позволит определить какой из аллелей оказывает двойственное положительное влияние на эти хозяйственно-полезные признаки. Использование метода ПЦР-ПДРФ, как доступного, простого и недорогого способа диагностики, ускорит программу селекции крупного рогатого скота по заданным характеристикам, и получение потомства желаемого фенотипа.

4. Заключение

В настоящем исследовании проведена идентификация аллелей и генотипов гена *OPN* методом ПЦР-ПДРФ. Были установлены 2 аллеля и 3 генотипа, что свидетельствует о полиморфизме гена в исследуемой популяции. Изучена генетическая структура и проведен мониторинг генетического биоразнообразия крупного рогатого скота различного ареала обитания и породных групп, что позволило сделать вывод о схожести частоты встречаемости аллелей и генотипов в различных популяциях голштинского скота. Дальнейшие исследования будут направлены на поиск взаимосвязей полиморфных форм гена *OPN* с хозяйственно-полезными признаками голштинского крупного рогатого скота Республики Татарстан. Так как ген *OPN* ранее был ассоциирован с эмбриональным развитием, поддержанием беременности, многоплодием, а также молочной продуктивностью и качественным составом молока, включение ДНК-диагностики в селекционный процесс поможет стабилизировать молочную продуктивность без ущерба для воспроизводительной способности дойных коров.

Funding

This work was supported by the State Task of the Ministry of Science and Education of the Russian Federation FITC KazNC RAS: Ecological and genetic approaches to the creation and conservation of plant and animal resources, the expansion of their adaptive potential and biodiversity, the development of conservation agrotechnologies to increase the sustainability of high-quality products, achieve safety for human health and the environment. Registration number: 122011800138-7.

Финансирование

Данная работа была поддержана Государственным заданием Министерства науки и образования РФ ФИЦ КазНЦ РАН: Эколого-генетические подходы к созданию и сохранению ресурсов растений и животных, расширению их адаптивного потенциала и биоразнообразия, разработка сберегающих агротехнологий с целью повышения устойчивости производства высококачественной продукции, достижения безопасности для здоровья человека и окружающей среды. Номер регистрации: 122011800138-7.

Conflict of Interest

None declared.

Конфликт интересов

Не указан.

References

1. Гайнутдинова Э.Р. Совместимость молочной продуктивности и воспроизводительной способности коров-первотелок голштинской породы / Э.Р. Гайнутдинова, Н.Ю. Сафина, Ш.К. Шакиров // Вестник Казанского ГАУ. – 2020. – № 2(54). – С. 5–9. DOI 10.12737/2073-0462-2020-5-9
2. Сафина Н.Ю. Идентификация полиморфизма гена *APAF1* у голштинского скота / Н.Ю. Сафина, З.Ф. Фаттахова, Э.Р. Гайнутдинова и др. // Международный вестник ветеринарии. – 2022. – № 2. – С. 134–139. DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.2.134
3. Oldberg A. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence/ A. Oldberg, A. Franzen, D. Heinegård et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1986. – Vol. 83. – P. 8819–8823.

4. Anggraeni A. Polimerfisme genetik dari gen IGF1, GH dan OPN pada persilangan sapi PO berdasarkan tipe kelahiran di Jawa Tengah / A. Anggraeni, C. Talib, S.A. Asmarasari et al. // *JITV*. – 2017. – Vol. 22(4). – P. 165–172. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v22i4.1625>
5. Salehi A. The Association of Bovine Osteopontin (OPN) Gene with Milk Production Traits in Iranian Holstein Bulls / A. Salehi, K. Nasiri, M. Aminafshar et al. // *Iran J Biotech*. – 2015. – Vol. 13(1): e1092 – P. 43–48. DOI:10.15171/ijb.1092
6. Pareek Ch.S. An association between the C>T single nucleotide polymorphism within intron IV of osteopontin encoding gene (SPP1) and body weight of growing Polish Holstein-Friesian cattle / Ch.S. Pareek, U. Czarnik, M. Pierzchała et al. // *Animal Science Papers and Reports*. – 2008. – Vol. 26, No.4. – P. 251–257.
7. Kułaj D. Effects of the c.8514C > T polymorphism in the osteopontin gene (OPN) on milk production, milk composition and disease susceptibility in Holstein-Friesian cattle / D. Kułaj, J. Pokorska, A. Ochrem et al. // *Italian Journal of Animal Science Italian Journal of Animal Science*. – 2019. – Vol. 18. Is. 1. – P. 546–553. DOI: 10.1080/1828051X.2018.1547129
8. Khatib H. The Association of Bovine PPARGC1A and OPN Genes with Milk Composition in Two Independent Holstein Cattle Populations / H. Khatib, I. Zaitoun, J. Wiebelhaus-Finger et al. // *American Dairy Science Association*. – 2007. – Vol. 90(6). – P. 2966–2970. DOI:10.3168/jds.2006-812
9. Khatib H. Short communication: Validation of in vitro fertility genes in a Holstein bull population / H. Khatib, R.L. Monson, W. Huang et al. // *J. Dairy Sci*. – 2010. – Vol. 93. – P. 2244–2249. DOI: 10.3168/jds.2009-2805
10. Kowlewska-Łuczak I. Genetic polymorphisms of FAM13A1, OPN, LAP3, and HCAP-G genes in Jersey cattle / I. Kowlewska-Łuczak, H. Kulig // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. – 2013. – Vol. 37. – P. 631–635. DOI:10.3906/vet-1105-3
11. Bissonnette, N. Short communication: Genetic association of variations in the osteopontin gene (SPP1) with lactation persistency in dairy cattle / N. Bissonnette // *J. Dairy Sci*. – 2017. – Vol. 101. – P.456–461. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13129>
12. Rangaswami H. Nuclear factor inducing kinase: a key regulator in osteopontin-induced MAPK/Ikappa kinase dependent NF-kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation / H. Rangaswami, A. Bulbule, G.C. Kundu // *Trends in Cell Biology*. – 2006. – Vol. 16. – P. 79–87.
13. Denhardt D.T. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival / D.T. Denhardt, M. Noda, A.W. Oregon et al. // *J Clin Invest*. – 2001. – Vol. 107. – P. 1055–1061.
14. Leonard S. Effects of the Osteopontin Gene Variants on Milk Production Traits in Dairy Cattle / S. Leonard, H. Khatib, V. Schutzkus et al. // *J. Dairy Sci*. – 2005. – Vol. 88. – P. 4083–4086.
15. Monaco E. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle / E. Monaco // *Theriogenology*. – 2009. – Vol. 71. – P. 450–457.
16. Меркурьева Е.А. Генетика с основами биометрии / Е.А. Меркурьева, Г.Н. Шангин-Березовский // М.: Колос. – 1983. – С. 400.
17. Pasandideh M. Association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk production and composition in Holstein cattle / M. Pasandideh, M.R. Mohammadabadi, A.K. Esmailzadeh et al. // *Czech J. Anim. Sci*. – 2015 (3). – Vol. 60. – P. 97–104. DOI: 10.17221/8074-CJAS
18. Lali F. A. Effect of Osteopontin gene variants on milk production traits in Holstein Friesian crossbred cattle of Kerala / F.A. Lali, K. Anilkumar, T. Aravindakshan et al. // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. – 2020. – Vol. 44. – P. 695–701. DOI:10.3906/vet-1812-4
19. De Mello F. Análise de diversidade genética do gene da osteopontina em bovinos da raça girolando / F. de Mello, M.F.M. Guimarães R, J.A. Cobuci et al. // *R.Bras. Zootec*. – 2011. – Vol.40 (11). – P. 2374–2377.
20. Boleckova J. The association of five polymorphisms with milk production traits in Czech Fleckvieh cattle / J. Boleckova // *Czech J. Anim. Sci*. – 2012. – Vol. 57(2). – P. 45–53.
21. Kormaz Agaoglu Ö. Genetic polymorphism of five genes associated with meat production traits in five cattle breeds in Turkey / Ö. Kormaz Agaoglu, B. Akyuz, B. Cinar Kul et al. // *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. – 2015. – Vol. 21 (4). – P. 489–497. DOI: 10.9775/kvfd.2014.12722
22. Sharma M. Fixation of T Allele in C>T Polymorphism in Intron IV Region of Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1) Gene in Indian Cattle Breeds / M. Sharma, S.P. Singh, M. Tiwari et al. // *International Journal of Livestock Research*. – 2019. – Vol. 9 (9). – P. 116–121. DOI 10.5455/ijlr.20190202104646
23. Koopae H.Kh. Joint Analysis of the DGAT1, OPN and PPARGC1A Genes Effects on Variation of Milk Production and Composition in Holstein Cattle Population // H.Kh. Koopae, M. Pasandideh, M. Dadpasand et al. // *Iranian Journal of Applied Animal Science*. – 2016. – Vol. 6(4). – P. 127–133.

References in English

1. Gainutdinova E.R. Sovmestimost' molochnoj produktivnosti i vosproizvoditel'noj sposobnosti korov-pervotelok golshhtinskoj porody [Compatibility of milk productivity and reproductive ability of Holstein cows] / E.R. Gainutdinova, N.Yu. Safina, Sh.K. Shakirov // *Vestnik Kazanskogo GAU [Bulletin of the Kazan State Agrarian University]*. – 2020. – № 2(54). – Pp. 5-9. DOI 10.12737/2073-0462-2020-5-9 [in Russian]
2. Safina N.Yu. Identifikacija polimorfizma gena APAF1 u golshhtinskogo skota [Identification of PAI 1 gene polymorphism in Holstein cattle] / N.Yu. Safina, Z.F. Fattakhova, E.R. Gainutdinova et al. // *Mezhdunarodnyj vestnik veterinarii [International Bulletin of Veterinary Medicine]*. – 2022. – No. 2. – pp. 134-139. DOI: 10.52419/issn 2072-2419.2022.2.134 [in Russian]
3. Oldberg A. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence/ A. Oldberg, A. Franzen, D. Heinegård et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1986. – Vol. 83. – P. 8819–8823.

4. Anggraeni A. Polimerfisme genetik dari gen IGF1, GH dan OPN pada persilangan sapi PO berdasarkan tipe kelahiran di Jawa Tengah / A. Anggraeni, C. Talib, S.A. Asmarasari et al. // *JITV*. – 2017. – Vol. 22(4). – P. 165–172. DOI: <http://dx.DOI.org/10.14334/jitv.v22i4.1625>
5. Salehi A. The Association of Bovine Osteopontin (OPN) Gene with Milk Production Traits in Iranian Holstein Bulls / A. Salehi, K. Nasiri, M. Aminafshar et al. // *Iran J Biotech*. – 2015. – Vol. 13(1): e1092 – P. 43–48. DOI:10.15171/ijb.1092
6. Pareek Ch.S. An association between the C>T single nucleotide polymorphism within intron IV of osteopontin encoding gene (SPP1) and body weight of growing Polish Holstein-Friesian cattle / Ch.S. Pareek, U. Czarnik, M. Pierzchała et al. // *Animal Science Papers and Reports*. – 2008. – Vol. 26, No.4. – P. 251–257.
7. Kułaj D. Effects of the c.8514C > T polymorphism in the osteopontin gene (OPN) on milk production, milk composition and disease susceptibility in Holstein-Friesian cattle / D. Kułaj, J. Pokorska, A. Ochrem et al. // *Italian Journal of Animal Science Italian Journal of Animal Science*. – 2019. – Vol. 18. Is. 1. – P. 546–553. DOI: 10.1080/1828051X.2018.1547129
8. Khatib H. The Association of Bovine PPARGC1A and OPN Genes with Milk Composition in Two Independent Holstein Cattle Populations / H. Khatib, I. Zaitoun, J. Wiebelhaus-Finger et al. // *American Dairy Science Association*. – 2007. – Vol. 90(6). – P. 2966–2970. DOI:10.3168/jds.2006-812
9. Khatib H. Short communication: Validation of in vitro fertility genes in a Holstein bull population / H. Khatib, R.L. Monson, W. Huang et al. // *J. Dairy Sci*. – 2010. – Vol. 93. – P. 2244–2249. DOI: 10.3168/jds.2009-2805
10. Kowlewska-Luczak I. Genetic polymorphisms of FAM13A1, OPN, LAP3, and HCAP-G genes in Jersey cattle / I. Kowlewska-Luczak, H. Kulig // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. – 2013. – Vol. 37. – P. 631–635. DOI:10.3906/vet-1105-3
11. Bissonnette, N. Short communication: Genetic association of variations in the osteopontin gene (SPP1) with lactation persistency in dairy cattle / N. Bissonnette // *J. Dairy Sci*. – 2017. – Vol. 101. – P.456–461. <https://DOI.org/10.3168/jds.2017-13129>
12. Rangaswami H. Nuclear factor inducing kinase: a key regulator in osteopontin-induced MAPK/Ikappa kinase dependent NF-kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation / H. Rangaswami, A. Bulbule, G.C. Kundu // *Trends in Cell Biology*. – 2006. – Vol. 16. – P. 79–87.
13. Denhardt D.T. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival / D.T. Denhardt, M. Noda, A.W. Oregon et al. // *J Clin Invest*. – 2001. – Vol. 107. – P. 1055–1061.
14. Leonard S. Effects of the Osteopontin Gene Variants on Milk Production Traits in Dairy Cattle / S. Leonard, H. Khatib, V. Schutzkus et al. // *J. Dairy Sci*. – 2005. – Vol. 88. – P. 4083–4086.
15. Monaco E. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle / E. Monaco // *Theriogenology*. – 2009. – Vol. 71. – P. 450–457.
16. Merkuryeva E.A. Genetika s osnovami biometrii [Genetics with the basics of biometrics] / E.A. Merkuryeva, G.N. Shangin-Berezovsky // M.: Kolos.– 1983. – P. 400. [in Russian]
17. Pasandideh M. Association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk production and composition in Holstein cattle / M. Pasandideh, M.R. Mohammadabadi, A.K. Esmailzadeh et al. // *Czech J. Anim. Sci*. – 2015 (3). – Vol. 60. – P. 97–104. DOI: 10.17221/8074-CJAS
18. Lali F. A. Effect of Osteopontin gene variants on milk production traits in Holstein Friesian crossbred cattle of Kerala / F.A. Lali, K. Anilkumar, T. Aravindakshan et al. // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. – 2020. – Vol. 44. – P. 695–701. DOI:10.3906/vet-1812-4
19. De Mello F. Análise de diversidade genética do gene da osteopontina em bovinos da raça girolando / F. de Mello, M.F.M. Guimarães R, J.A. Cobuci et al. // *R.Bras. Zootec*. – 2011. – Vol.40 (11). – P. 2374–2377.
20. Boleckova J. The association of five polymorphisms with milk production traits in Czech Fleckvieh cattle / J. Boleckova // *Czech J. Anim. Sci*. – 2012. – Vol. 57(2). – P. 45–53.
21. Kormaz Agaoglu Ö. Genetic polymorphism of five genes associated with meat production traits in five cattle breeds in Turkey / Ö. Kormaz Agaoglu, B. Akyuz, B. Cinar Kul et al. // *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. – 2015. – Vol. 21 (4). – P. 489–497. DOI: 10.9775/kvfd.2014.12722
22. Sharma M. Fixation of T Allele in C>T Polymorphism in Intron IV Region of Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1) Gene in Indian Cattle Breeds / M. Sharma, S.P. Singh, M. Tiwari et al. // *International Journal of Livestock Research*. – 2019. – Vol. 9 (9). – P. 116–121. DOI 10.5455/ijlr.20190202104646
23. Koopae H.Kh. Joint Analysis of the DGAT1, OPN and PPARGC1A Genes Effects on Variation of Milk Production and Composition in Holstein Cattle Population // H.Kh. Koopae, M. Pasandideh, M. Dadpasand et al. // *Iranian Journal of Applied Animal Science*. – 2016. – Vol. 6(4). – P. 127–133.