



УДК 636.2;575.113.2(477)

DOI <https://doi.org/10.32782/naturaljournal.6.2023.3>

ОЦІНКА АЛЕЛЬНОЇ ТА ГЕНОТИПОВОЇ РІЗНОМАНІТНОСТІ КОРІВ ЗНИКАЮЧОЇ БУРОЇ КАРПАТСЬКОЇ ПОРОДИ ЗА ДЕЯКИМИ ГЕНАМИ ПРОДУКТИВНОСТІ

Н.Б. Мохначова¹

Розвиток сучасної молекулярної генетики дозволяє визначати гени, які контролюють кількісні та якісні продуктивні ознаки сільськогосподарських тварин. В статті наведені результати аналізу частот алелей та генотипів за генами-кандидатами м'ясної продуктивності: тиреоглобуліну (TG5) та соматотропіну (GH) у тварин бруї карпатської породи, яка за даними ФАО знаходиться під загрозою зникнення. На сьогодні маточне поголів'я бруї карпатської породи розводять лише у особистих селянських господарствах. Ген тиреоглобуліну (TG5) розглядали як функціональний і позиційний ген – кандидат мармуру м'яса через вплив його на жировий метаболізм. Гормон росту регулює зростання та розвиток, ініціює та підтримує м'ясну продуктивність, якість м'яса. Для дослідження використали 30 зразків ДНК, виділеної із венозної крові корів бруї карпатської породи за допомогою набору «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens). Генотипування проводили використовуючи аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПАР-ПДРФ). В результаті проведеного дослідження виявлено, що поліморфізм генів TG5 та GH представлений алелями TG5^T, TG5^C та GH^L, GH^V і відповідно генотипами TG5^{TT}, TG5^{TC}, TG5^{CC} та GH^{LL}, GH^{LV}, GH^{VV}. Для гена TG5 ампліфікований фрагмент розміром 548 п.н. обробляли рестриктазою PstI. Встановлено висока частота алелю TG5^T – 0,665 і децю нижча частота алелю TG5^C – 0,335. При дослідженні гена GH продукт ампліфікації (223 п.н.) обробляли ферментом рестрикції AluI. Виявлено, що частіше зустрічався алель GH^L (0,64) та гомозиготний генотип GH^{LL} (0,50). Доля гомозиготних генотипів за обома генами була істотно високою і склала за геном TG5 – 90%, а за геном GH – 73%. Буря карпатська порода є однією із локальних малочисельних вітчизняних порід ВРХ, тому наголос на носійство нею селекційно-цінних генотипів може привернути увагу та дасть можливість зберегти цю цінну українську породу. Вона може бути ефективно використана для розведення в господарствах як молочного, так і м'ясного напрямків. Генетичний потенціал бруї карпатської не вичерпаний.

Ключові слова: корови, гени, тиреоглобулін, гормон росту, алель.

¹ кандидат сільськогосподарських наук, старший дослідник, провідний науковий співробітник (Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця Національної академії аграрних наук України, Київська область)
e-mail: nataliia.mokhnachova82@gmail.com,
ORCID: 0000-0001-5982-6542

ASSESSMENT OF ALLELIC AND GENOTYPE DIVERSITY OF COWS OF THE ENDANGERED BROWN CARPATHIAN BREED BY SOME PRODUCTIVITY GENES

N. B. Mokhnachova

The development of modern molecular genetics makes it possible to identify genes that control quantitative and qualitative productive traits of farm animals. The article presents the results of the analysis of allele frequencies and genotypes for candidate genes for meat productivity: thyroglobulin (TG5) and somatotropin (GH) in animals of the Brown Carpathian breed, which, according to FAO, is under threat of extinction. Today, the mother stock of the Brown Carpathian breed is bred only in private peasant farms. The thyroglobulin gene (TG5) was considered as a functional and positional gene – a candidate for meat marbling due to its influence on fat metabolism. Growth hormone regulates growth and development, initiates and maintains meat production, meat quality. The study used 30 samples of DNA isolated from the venous blood of brown Carpathian cows using the «DNA Sorb-B kit» (AmpliSens). Genotyping was performed using polymerase chain reaction (PCR-RFLP) polymorphism analysis of restriction fragment lengths. As a result of the research, it was found that the polymorphism of the TG5 and GH genes is represented by alleles TG5^T, TG5^C and GH^F, GH^V and, respectively, by the genotypes TG5^{TT}, TG5^{TC}, TG5^{CC} and GH^{LL}, GH^{LV}, GH^{VV}. For the TG5 gene, an amplified fragment of 548 bp. treated with PstI restriction enzyme. The high frequency of the TG5^T allele was 0.665 and the slightly lower frequency of the TG5^C allele was 0.335. When studying the GH gene, the amplification product (223 bp) was treated with the restriction enzyme AluI. It was found that the GH^F allele (0.64) and the GH^{LL} homozygous genotype (0.50) were more frequent. The share of homozygous genotypes for both genes was significantly high and amounted to 90% for the TG5 gene, and 73% for the GH gene. The Brown Carpathian breed is one of the few local breeds of domestic cattle, so the emphasis on its carrying of selection-valuable genotypes can attract attention and provide an opportunity to preserve this valuable Ukrainian breed. It can be effectively used for breeding in both dairy and meat farms. The genetic potential of the Brown Carpathian is not exhausted.

Key words: cows, genes, thyroglobulin, growth hormone, allele.

Вступ

Важливу роль у виробництві продуктів харчування та соціальному житті населення Карпат відіграє бура карпатська порода великої рогатої худоби. Тварини даної породи володіють унікальними біологічними особливостями та мають добрі параметри для реалізації генетичного потенціалу (FAO, 2011).

Сучасний розвиток тваринництва передбачає розробку нових біотехнологічних та молекулярно-генетичних методів оцінки ознак продуктивності сільськогосподарських тварин, що базуються безпосередньо на аналізі спадкової інформації. Наявні молекулярно-генетичні методи дозволяють визначати наявність цінних варіантів генів, які асоційовані з ознаками продуктивності. Локуси якісних ознак (Quantative Trait Loci – QTL), які контролюють гени господарсько-корисних властивостей «розкидані» по всьому геномі. Визначення таких генів, які з погляду селекції необхідні при розведенні тварин дозволить до традиційних методів відбору тварин, додатково проводити маркер-залежну селекцію (Мохначова, 2023).

В якості генів-кандидатів м'ясної продуктивності розглядається ген гормону росту

соматотропін (GH) та тиреоглобулін (TG). Ці гормони регулюють зростання та розвиток, ініціюють та підтримують м'ясну продуктивність, якість м'яса (Bennett et al., 2013). GH (соматотропін) – ген гормону росту, розташований на ділянці хромосоми 19 великої рогатої худоби і складається з п'яти екзонів та чотирьох інтронів. Соматотропін продукується передньою часткою гіпофіза, є одним з найважливіших регуляторів соматичного росту тварин. Встановлено, що ген, який контролює синтез соматотропіну, регулює зростання тварини, а також відіграє ключову роль в обмінних процесах (вуглеводному, жировому) (Lee et al., 2013). Ген гормону тиреоглобуліну (TG5) контролює обмінні процеси в організмі та позначений як маркер ранньої діагностики мармуровості м'яса, оскільки він впливає на ліпідний обмін, бере участь у утворенні жирових клітин та формує так звану «мармуровість» м'язової тканини (Barendse et al., 2004).

Метою даної роботи було встановлення генотипів та визначення генетичної структури тварин бруї карпатської породи за генами соматотропіну (GH) та тиреоглобуліну (TG5) з визначенням їх генетичного потенціалу.

Матеріал і методи

Матеріалом для дослідження були 30 зразків ДНК, виділені з крові дійних корів бурої карпатської породи з приватних домогосподарств с. Нижні ворота Воловецького району Закарпатської області, Україна (рис. 1).

Під час дослідження було відібрано кров у стерильні пробірки з антикоагулянтом. Виділення ДНК із зразків цільної крові виконували за допомогою набору «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens), який забезпечив достатньо високу концентрацію і чистоту виділе-

ної ДНК. Концентрацію ДНК доводили до 50 нг/мкл. Методом ПАР-ПДРФ (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів) проводили генотипування досліджуваних тварин за генами *GH* та *TG5*. Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації та назви рестриктаз для рестрикції продуктів ампліфікації показано в таблиці 1.

Підібрані оптимальні температурно-часові режими та схеми рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації поліморфних ділянок досліджуваних генів в таблиці 2.

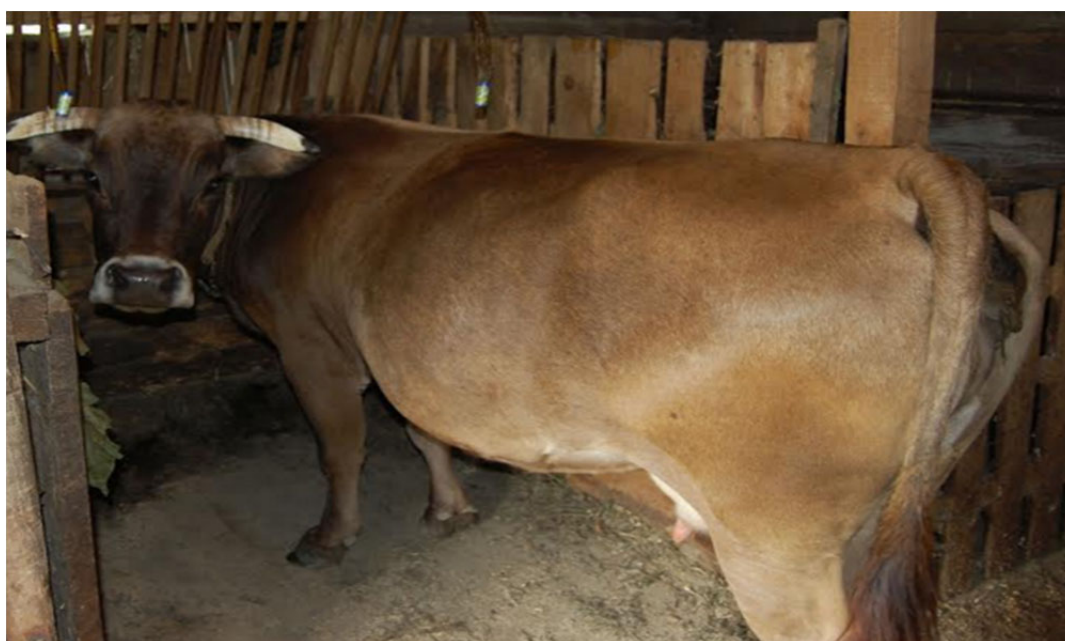


Рис. 1. Буро карпатська порода, Закарпатська обл., Україна

Таблиця 1

Синтезовані нуклеотидні послідовності та рестриктази

| Послідовність праймера | Ампліфікат, (п.н.) | Рестриктаза | Посилання |
|--|--------------------|-------------|---------------------|
| GH | | | |
| F: 5'-GCTGCTCCTGAGGGCCCTTC-3' R: 5'-GCGGCGGCACTTCATGACCC-3' | 223 | AluI | Lucy et al., 1993 |
| TG5 | | | |
| 5'-GGGGATGACTACGAGTATGACTG-3', 5'-GTGAAAATCTGTGGAGGCTGT-3' | 548 | PsuI | Alison, V. E., 2007 |

Таблиця 2

Індивідуальні характеристики умов ПАР та схеми ПДРФ-аналізу продуктів ампліфікації

| Поліморфізм | Умови ампліфікації | Генотипи та відповідні довжини рестрикційних фрагментів |
|-------------|---|---|
| GH- AluI | 94 °C – 4 хв; (95 °C – 15 с; 61 °C – 15 с; 72 °C – 60 с) x 35; 72 °C – 5 хв | GH- Alu ^{IV} :223; GH- Alu ^{LL} :171+52; GH- Alu ^{LV} :223+171+52; |
| TG5-Hinfi | 95 °C – 4 хв; (95 °C – 45 с; 62 °C – 30 с; 72 °C – 60 с) x 35; 72 °C – 10 хв | TG5-PsuI ^{CC} :75+178+295; TG5- PsuI ^{TT} :473; TG5-PsuI ^{CT} :75+178+295+473; |

На програмованому термоциклері «Терцик» (ДНК-технологія) здійснювалася полімеразна ланцюгова реакція в об'ємі 10 мкл.:

H₂O – 4,5 мкл, 5x буфер (67 мМ Трис-НС1 (рН 8,3), 17 мМ (NH₄)₂ SO₂, 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 % Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8 % гліцерин) – 2,0 мкл; 10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл; праймер (70 нг) – 0,4 мкл; Таq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл; ДНК 50-100 нг – 1,5 мкл.

Продукти ПАР обробляли специфічними рестрикційними ферментами: до 10 мкл ПАР-продукту додавали 5 од./мкл рестриктази та 1,5 мкл рестрикційного буферу, інкубували при 37 °С 12 год. в сухоповітряному термостаті. Електрофоретичним методом в 2–3% агарозному гелі при УФ-світлі 312 нм. після фарбування бромистим етидієм визначалася кількість і довжина фрагментів рестрикції.

В якості маркерів молекулярних мас використовували *GeneRuler TM 50 bp DNA Ladder* та *Thermo Scientific™ Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder*. Аналіз результатів проводили, фотографуючи гелі цифровою камерою.

Отримані результати експериментальних досліджень, опрацьовували методом популяційно-генетичного і біометричного аналізу з використанням «GEN Alex 6», «Statistica».

Частоту генотипів розраховували за формулою:

$$p = n / N,$$

де p – Частота генотипу;

n – Кількість особин, певного генотипу,

N – Загальна кількість особин.

Частоту алелів розраховували за формулою:

$$p = \frac{2nAA+nAB}{2N} \text{ та } q = \frac{2nBB+nAB}{2N}$$

де p – Частота алелів А, q – Частота алелів В, nAA, nAB, nBB – Кількість особин з певним генотипом, N – Загальна кількість особин.

Фактичну гетерозиготність обчислювали за формулою:

$$H_0 = N_2 / n$$

де N₂ – Кількість гетерозигот за досліджуваним алелем;

n – Об'єм вибірки.

Фактичну гетерозиготність обчислювали за формулою:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

де p₁, p₂, ..., p_n – Частоти алелів.

Для оцінки генетичної диференціації досліджуваних популяцій використовували індивідуальний індекс фіксації Райта (F_{IS}), який кількісно відображає відхилення від панміксії:

$$F_{IS} = (H_e - H_o) / H_e$$

де H_o – Фактична гетерозиготність в популяції;

H_e – Очікувана гетерозиготність в популяції (H_o ≠ H_e).

Відповідність між фактичним та очікуваним розподілом генотипів перевіряли за значенням проби Пірсона (χ²) за формулою:

$$\chi^2 = \frac{\sum (\Phi - T)^2}{T}$$

де Φ – Фактична кількість генотипів;

T – Теоретична кількість генотипів.

Результати та обговорення

Тиреоглобулін (TG5), як попередник гормону трийодтироніну щитовидної залози (T3) і тироксину (T4), відіграє важливу роль в зростанні організму та бере участь в регуляції обміну речовин. В результаті дослідження за локусом TG5, були виявлені 3 генотипи: TG5^{TT}, TG5^{CT} та TG5^{CC} (рис. 2).

Більше 60% досліджених корів бурої карпатської породи з приватних домогосподарств с. Нижні ворота Воловецького району Закарпатської області є носіями генотипу TG^{TT}. Генотип TG^{CC} проявляється рідше, ніж TG^{TC}, ним володіють 28% корів.

Рівень очікуваної гетерозиготності склав 0,446, що в 4 рази перевищує фактичний показник. Ці результати є наслідком недостатньої кількості гетерозигот серед протестованої худоби, яка склала лише 11%.

Для поліморфізму гена соматотропіну (GH), представленого двома алелями L та V (рис. 3), характерний нерівномірний внутрішньопородний розподіл, який склав для алеля L-0,64, а для алеля V-0,36 серед корів бурої карпатської породи (табл. 4).

Виявлені відмінності в частоті гомозиготних GH^{LL}, GH^{VV} та гетерозиготного GH^{LV} генотипів: частота гомозиготного GH^{LL} генотипу виявилася найбільшою та склала 50%, тоді як другий результат у GH^{LV}-28%. Гомозиготний GH^{VV} – генотип проявився лише у 22% досліджених тварин.

Ступінь гомозиготності по аналізованим генам (табл. 5) свідчить про істотно високий показник за обома генами.

В практиці тваринництва подібні дослідження одиничні, в огляді літератури

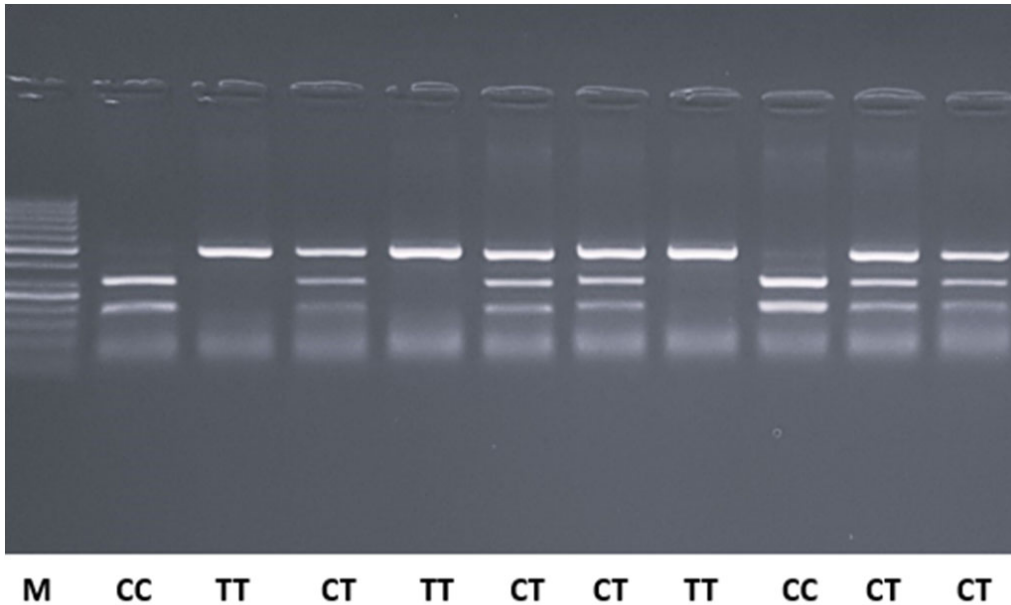


Рис. 2. Продукти рестрикції гена TG. М – маркер молекулярних мас *DNA Ladder*, СС-генотип (75, 178, 295 п.н.); СТ-генотип (75, 178, 295,473 п.н.); ТТ-генотип (473 п.н.)

Таблиця 3

Особливості генетичної структури бурої карпатської породи ВРХ за геном тиреоглобуліну

| Порода | Розмір вибірки | Частота генотипів | | Частота алеля | | Гетерозиготність | | χ^2 | F_{IS} |
|-----------------|----------------|-------------------|------|-------------------|-------------------|------------------|-------|----------|----------|
| | | | | С | Т | H_o | H_e | | |
| Бура карпатська | 30 | СС | 0,28 | $0,335 \pm 0,026$ | $0,665 \pm 0,026$ | 0,110 | 0,446 | 17,02 | 0,753 |
| | | СТ | 0,11 | | | | | | |
| | | ТТ | 0,61 | | | | | | |

Примітка. H_o – фактична гетерозиготність; H_e – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності, F_{IS} – індекс фіксації Райта.

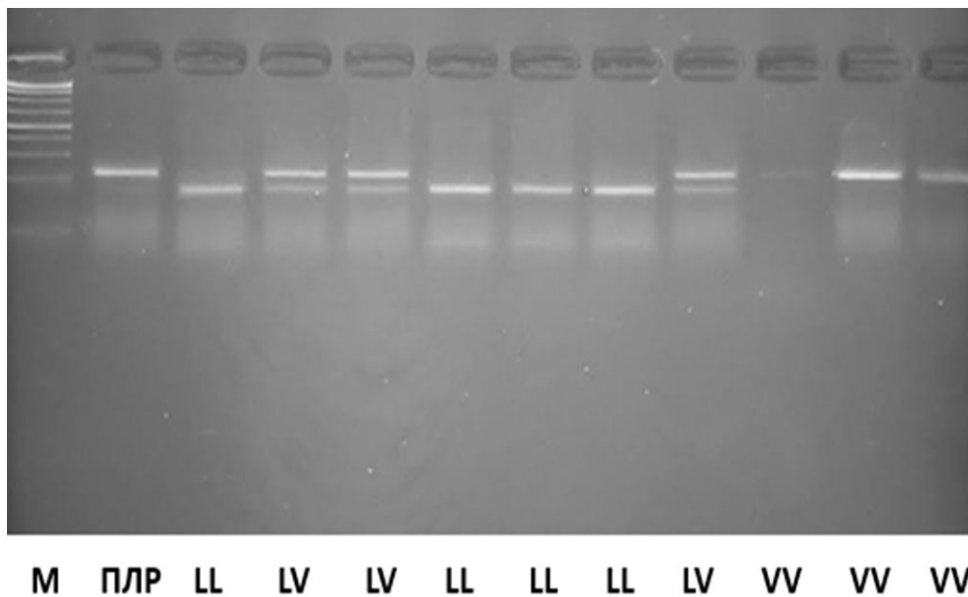


Рис. 3. Продукти рестрикції гена GH. М – маркер молекулярних мас *DNA Ladder*, LL-генотип (171, 52 п.н.); LV-генотип (223, 171, 52 п.н.); VV-генотип (223 п.н.)

Таблиця 4

Особливості генетичної структури бурої карпатської породи ВРХ за геном соматотропіну

| Порода | Розмір вибірки | Частота генотипів | | Частота алеля | | Гетерозиготність | | χ^2 | F_{IS} |
|-----------------|----------------|-------------------|------|---------------|--------------|------------------|-------|----------|----------|
| | | | | L | V | H_0 | H_E | | |
| Бура карпатська | 30 | LL | 0,5 | 0,64 ± 0,027 | 0,36 ± 0,027 | 0,280 | 0,461 | 4,90 | 0,392 |
| | | LV | 0,28 | | | | | | |
| | | VV | 0,22 | | | | | | |

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_E – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності, F_{IS} – індекс фіксації Райта.

Таблиця 5

Гомозиготність за генами тиреоглобуліну та соматотропіну у тварин бурої карпатської породи ВРХ

| Ген | Генотипи | Число гомозиготних генотипів | Доля гомозиготних генотипів, % |
|-----|----------|------------------------------|--------------------------------|
| TG5 | TT | 18 | 90 |
| | CC | 9 | |
| GH | LL | 15 | 73 |
| | VV | 7 | |

автор знайшла тільки декілька подібних досліджень бурої карпатської породи для порівняння результатів. Основний внесок у вивченні цієї породи зробила Копилова К.В. Так у дослідженнях 2005 року вона отримала перевагу алелю GH^L (0,740) у тварин ПГ «Нижні ворота» Закарпатської обл., а вивчаючи у 2009 році генетичну структуру бугаїв Банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН виявила 100% перевагу гетерозиготного генотипу GH^{LV} гена соматотропіну (гормон росту) у бугаїв бурої карпатської породи (Копилова та ін., 2009). Ці результати знайшли своє відображення у отри-маних нами $GH^L=0,64$.

Висновки

Нами вивчені частоти поліморфних варіантів генів асоційованих з господарсько-корисними ознаками в тварин вітчизняної

бурої карпатської породи великої рогатої худоби, яка знаходиться під загрозою зникнення та є носієм унікального генофонду. Наші дослідження є частиною вивчення породоспецифічних особливостей, які допоможуть в розробці генетично обґрунтованих програм збереження.

Генетичний аналіз за генами-кандида-тами м'ясної продуктивності тиреоглобуліну (TG5) та соматотропіну (GH) показав наявність у досліджуваної породи своїх специфічних особливостей, які характерні тільки для неї – перевага «бажаних» для селекції алелей GH^L (0,64) та $TG5^T$ (0,665).

Встановлено, що частки тварин – носіїв гомозиготних «бажаних» генотипів склали GH^{LL} -50% та TG^{TT} -61%, що робить буру карпатську породу носієм цінних генотипів та вказує на потребу подальших молекулярно-генетичних досліджень.

Список використаної літератури

- Копилова К.В., Копилов К.В., Арнаут К.О. Генетична структура бугаїв різних порід великої рогатої худоби за локусами кількісних ознак. *Вісник аграрної науки*. 2012. №2. С. 47–49.
- Мохначова Н.Б. Вивчення генетичної структури популяції української аборигенної лебединської породи корів. *Acta Carpatica*. 2023. № 1. С. 50–58. <https://doi.org/10.32782/2450-8640.2023.1.6>
- Alison V. E. Marker – assisted selection in beef cattle. UC Davis. 2007. P. 1–2.
- Barendse W, Bunch R, Thomas M, Armitage S, et al. The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Aust J Exp Agr*. 2004. Vol. 44(7). P. 669–674. <https://doi.org/10.1071/EA02156>
- Bennett G.L., Shakelford T.L., Wheeler T.L., King D.A., Casas E., Smith T.P.L. Selection for genetic markers in beef cattle reveals complex associations of thyroglobulin and casein 1-S1 with carcass and meat traits. *J. Anim. Sci*. 2013. Vol. 91(2). P. 565–571.

Lee J.H., Lee Y.M., Lee J.Y., Oh D.Y., Jeong D.J., Kim J.J. Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the bovine growth hormone (bGH) gene associated with growth and carcass traits in hanwoo. *Asian Australas. J AnimSci.* 2013. Vol. 26(10). P. 1359–1364. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13248>

M. C. Lucy, S. D. Hauser, P. J. Eppard, G. G., Krivi, J. H. Clark, D. E. Bauman, R. J. Collier. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk yield. *J. Domest. Anim. Endocrinol.* 1993. Vol.10(4). P. 325–333. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(93\)90036-b](https://doi.org/10.1016/0739-7240(93)90036-b).

Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. № 9. Rome, Italy : FAO of the UN, *Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture*, 2011. 87 p.

References (translated & transliterated)

Kopylova, K.V. (2012). Henetychna struktura buhayiv riznykh porid velykoyi rohatoyi khudoby za lokusamy kil`kisnykh oznak [Genetic structure of bulls of different breeds of cattle according to loci of quantitative traits]. *Visnyk ahrarnoyi nauky [Bulletin of Agrarian Science]*, 2, 47–49 [in Ukrainian].

Mokhnachova, N.B. (2023). Vyvchennya henetychnoyi struktury populyatsiyi ukrayins`koyi aboryhennoyi lebedyns`koyi porody koriv [Study of the genetic structure of the population of the Ukrainian aboriginal Lebedin breed of cows]. *Acta Carpatica*, 1, 50–58. <https://doi.org/10.32782/2450-8640.2023.1.6> [in Ukrainian].

Alison, V.E. (2007). Marker – assisted selection in beef cattle. *UC Davis*, 1–2 [in English].

Barendse, W., Bunch, R., Thomas, M., & Armitage, S. (2004). The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Aust J ExpAgr.*, 44(7), 669–674. <https://doi.org/10.1071/EA02156> [in English].

Bennett, G.L., Shakelford, T.L., Wheeler, T.L., King, D.A., Casas, E., & Smith, T.P.L. (2013). Selection for genetic markers in beef cattle reveals complex associations of thyroglobulin and casein 1-S1 with carcass and meat traits. *J. Anim. Sci.*, 91(2), 565–571 [in English].

Lee, J.H., Lee, Y.M., Lee, J.Y., Oh, D.Y., Jeong, D.J., & Kim, J.J. (2013). Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the bovine growth hormone (bGH) gene associated with growth and carcass traits in hanwoo. *Asian Australas. J AnimSci.*, 26(10), 1359–1364. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13248> [in English].

M.C. Lucy, S.D. Hauser, P. J. Eppard, G. G., Krivi, J. H. Clark, D. E. Bauman, & R. J. Collier (1993). Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk yield. *J. Domest. Anim. Endocrinol.*, 10(4), 325–333. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(93\)90036-b](https://doi.org/10.1016/0739-7240(93)90036-b) [in English].

Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. (2011). *Rome, Italy : FAO of the UN, Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture*, 87 [in English].

Отримано: 28.11.2023

Прийнято: 11.12.2023