

УДК: 636.2.082:575.113.1

Добрянська М.Л., Копилов К.В., д.с.-г.н., Подоба Ю.В., к.с.-г.н.,
Вдовиченко Ю.В., к.с.-г.н., Копилова К.В., к.с.-г.н., с.н.с. ©

Інститут розведення і генетики тварин НААН, Чубинське

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА М'ЯСНИХ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ПІВДЕННА М'ЯСНА, СИМЕНТАЛЬСЬКА ТА АБЕРДИН- АНГУСЬКА ЗА РІЗНИМИ ТИПАМИ ДНК-МАРКЕРІВ

Проведено аналіз генетичної структури тварин великої рогатої худоби м'ясного напрямку продуктивності за поліморфізмом генів тиреоглобуліну (TG), калпаїну (CAPN1 530) та ISSR-PCR – маркерами. Виявлено особливості генетичної структури тварин південної м'ясної породи, симентальської та абердин-ангуської за поліморфізмом фрагментів ДНК, отриманих з використанням у якості праймерів 4-х фрагментів три та динуклеотидних мікросателітних локусів (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (GA)₉C; встановлена наявність комерційно-бажаних алелей за маркерами TG і CAPN1 530.

Ключові слова: ДНК-аналіз, велика рогата худоба, ген, тиреоглобулін, калпаїн, ISSR-PCR – маркерами.

М'ясне скотарство України представлено 13 породами великої рогатої худоби, з яких близько 47 % тварин складають абердин-ангуси і симентали [7]. У країнах із розвинутим тваринництвом активно проводяться дослідження на різних породах великої рогатої худоби для виявлення генів, що асоціюються з показниками якості м'яса. В Україні до теперішнього часу не проводилося генотипування вітчизняних тварин за генами, які впливають на якісні показники м'яса. Сучасні методи ДНК-генотипування дозволяють проаналізувати поголів'я за генами м'ясної продуктивності та виявити генетичну структуру м'ясних порід для формуванні стад з бажаними ознаками м'ясної продуктивності.

До показників м'ясної продуктивності, які широко використовуються у світі для оцінки якості м'яса, належать ніжність і мармуровість. Кількісною характеристикою ніжності м'яса є поперечна пружність м'язового волокна, яку пов'язують з дією кальцій-залежних протеїназ [1], що кодуються генами калпаїну (CAPN) і калпастатину (CAST). Калпаїн-системи вельми чутливі до коливань рівня іонів кальцію, температури, рН, які змінюються одразу після забою. Більшість дослідників вказують на калпаїнові протеїнази, припускаючи, що ніжність, це перш за все результат калпаїн-опосередкованої деградації міофібрил та цитоскелету клітин [2, 3].

Мармуровість характеризує кількість внутрішньом'язового жиру, депонування якого контролюють багато генів, серед яких найбільш незалежним від породи і умов утримання є ген тиреоглобуліну (TG)[4, 5]. Тиреоглобулін (TG) – глікопротеїновий гормон, він синтезується в фолікулярних клітинах щитовидної

залози та є попередником трийодтироніну (Т3) та тетраїодтироніну (Т4), які відіграють важливу роль у рості адипоцита, диференціації й гомеостазі жирових відкладень [6].

На основі досліджень поліморфізму генів CAPN1 і TG іноземними компаніями розроблені комерційні тест-системи для передбачення якісних показників туші тварин за ДНК-маркерами (GeneSTAR®Tenderness, IGENITY® Profile, GeneSTAR®Quality Grade). Ці панелі маркерів апробовані та рекомендовані до використання провідним науково-методичним центром з вивчення м'ясної худоби (NBCEC, США), що складається з десяти міжнародних організацій тваринників. Перевірка тест-систем щодо відповідності заявленим показникам проводиться на багатьох стадах і породах для виявлення уніфікованих методик оцінки, в яких зведено до мінімуму вплив навколишнього середовища, умов утримання, годівлі та інших факторів, що можуть впливати на об'єктивність результатів перевірки. Результати цих аналізів є загальнодоступними на веб-сайті (<http://www.nbcec.org>).

Таким чином, розроблені в останні роки молекулярно-генетичні методи тестування за ДНК-маркерами надають можливість передбачити можливий рівень генетично детермінованих характеристик тварин і попередньо оцінити генотип для віднесення конкретної тварини до певної групи тварин визначеного напрямку використання з метою створення спеціалізованих стад великої рогатої худоби. Генотипування тварин за ДНК-маркером полягає у визначенні відповідних алелей. При аналізі популяцій особливої уваги також заслуговують методи, які дозволяють тестувати одночасно велику кількість поліморфних локусів, і таким чином, давати комплексну характеристику геномів. Мікросателіти – короткі послідовності, які повторюються по всьому геному – зручний інструмент для досліджень генетичної структури і генетичної спорідненості. Техніка ISSR-ПЛР дозволила значно збільшувати кількість високоваріабельних генетичних маркерів, які застосовуються для внутріпородного та міжпородного аналізів.

Метою даного дослідження є аналіз генетичної структури вітчизняного поголів'я великої рогатої худоби м'ясного напрямку продуктивності за двома типами ДНК-маркерів для розробки методології диференціації тварин за показниками якості м'ясної продукції.

Матеріал і методи. Аналіз ДНК тварин був проведений за зразками крові від 35-ти тварин породи південна м'ясна, 30-ти тварин породи симентал та 21-ої тварини породи абердин-ангус із господарств ТОВ «Агрικор-Холдинг», ТОВ «Зеленогірське». ДНК виділяли сорбентним методом. Дослідження проводились методом ПЛР-ПДРФ з оптимізацією температурних та часових умови. Суміш для полімеразної ланцюгової реакції: на 10 мкл ПЛР суміші було використано 4 мкл стерильної деіонізованої води, 2 мкл 5-ти кратного буфера (250 mM KCL, 50 mM Tris-HCL (pH 8.3), 7,5 mM MgCl₂), 1 мкл суміші dNTP (по 2 mM кожного), суміш праймерів 0,8 мкл, Taq –полімераза 0,1 мкл, 2 мкл геномної ДНК.

Для ампліфікації гену тиреоглобуліну (TG) застосовані праймери: TGf 5'–GGGGATGACTACGAGTATGACTG–3', TGr 5'–GTGAAAATCTTGTGGAGGCTGT–3'.

Довжина ампліфікованого фрагменту складає 548 п.н. Для виявлення алельних варіантів С і Т гена TG продукт ампліфікації обробляли рестриктазою PstI.

Для ампліфікації гену калпаїну CAPN1 530 застосовані праймери: CAPN1 530f 5'– TCTTCTCAGAGAAGAGCGCAG – 3', CAPN1 530r 5'– CTGCGCCATTACTATCGATC – 3'. Довжина ампліфікованого фрагменту складає 341 п.н. Для виявлення алельних варіантів А і G гена CAPN1530 продукт ампліфікації обробляли рестриктазою PstI.

Дослідження генетичної структури ДНК за ISSR-маркерами проводили з використанням в якості праймерів фрагментів динуклеотидних і тринуклеотидних мікросателітних локусів, а саме: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (GA)₉C. В аналіз включали амплікони які стабільно відтворювалися не менш ніж у трьох процедурах ампліфікації.

Результати і обговорення. Загалом за чотирма ISSR-маркерами виявлено 54 ампліфікованих фрагменти із них 37 з використанням тринуклеотидних мікросателітних повторів і 17 із використанням двонуклеотидних мікросателітних повторів; 21 із них повторюється у всіх досліджених породах Найбільша кількість ампліфікованих фрагментів була характерна для послідовності (GAG)₆C – 20, для (ACC)₆G було виявлено 17 ампліконів, а для двонуклеотидних мікросателітних повторів (AG)₉C і (GA)₉C – було виявлено 9 і 8 ампліконів відповідно.

Для породи симентал за маркером (AG)₉C було виявлено індивідуальний фрагмент розміром 280 п.н., а у породи абердин-аргус за даним маркером, в порівнянні з іншими породами, відсутній фрагмент ампліфікації розміром 1050 п.н. За маркером (GA)₉C спектри фрагментів у всіх порід були подібні, але південна м'ясна порода відрізнялась від інших наявністю фрагменту розміром 600 п.н., а в породи абердин-ангус відсутній фрагмент розміром 1700 п.н..

За маркером, що представлений тринуклеотидним мікросателітним повтор (ACC)₆G у породи абердин-ангус виявлені два індивідуальних фрагменти - 390 і 470 п.н., у симентальської породи виявився індивідуальний амплікон розміром 320 п.н. Південна м'ясна порода характеризувалась за даним маркером відносно невеликою кількістю стабільно відтворюваних ампліфікованих фрагментів – всього 7.

У порівнянні з іншими ISSR-маркерами за маркером (GAG)₆C породи симентальська і південна м'ясна характеризувались найбільшим числом ампліфікованих фрагментів 13 і 10, У абердин-аргусів за цим маркером кількість ампліфікованих фрагментів була така як і при використанні маркеру (ACC)₆G, а саме 14 фрагментів. Також за маркером (GAG)₆C порода абердин-ангуська відрізнялась наявністю індивідуального амплікону розміром 220 п.н.

Загалом за всіма чотирма ISSR-маркерами в породах абердин-ангуська і симентальська було отримано по 39 ампліфікованих фрагментів, а в породи південна м'ясна – 32 фрагменти. Найбільший діапазон фрагментів спостерігався за маркером (ACC)₆G – від 210 п.н. до 1270 п.н., дещо менший, але з більшою кількістю ампліфікованих фрагментів був характерний для маркеру (GAG)₆C від 180 п.н. до 950 п.н.. За маркером (GA)₉C ампліфіковані фрагменти були сконцентровані в проміжку між 330 п.н. і 600 п.н. за винятком фрагменту розміром

1700 п.н. який спостерігався в породах південна м'ясна і симентальська. Подібна картина спостерігалась при використанні маркеру (AG)₉C - фрагменти сконцентровані в інтервалі від 280 до 520 п.н., а також в двох породах наявний фрагмент розміром 1050 п.н. – це південна м'ясна і симентальська.

Для визначення генотипів тварин великої рогатої худоби за локусами кількісних ознак (QTL), які пов'язані з генами м'ясної продуктивності, проведено тестування тварин за маркерами TG і CAPN1 530 генів тиреоглобуліну та калпаїну, результати якого представлені в таблиці.

Таблиця

Розподіл аельних варіантів генів тиреоглобуліну та калпаїну у великій рогатої худоби порід південна м'ясна, симентальська та абердино-ангуська.

| Порода ВРХ | Ген | Генотип | Частота генотипу | Частота алеля | H ₀ | H _E | FIS |
|----------------------------|-----------|------------------------------|--|------------------------|----------------|----------------|--------|
| Південна м'ясна (n - 35) | TG | CC - 18 CT - 16 TT - 1 | CC - 0,514 CT - 0,457 TT - 0,028 | C - 0,742 T - 0,257 | 0,457 | 0,383 | -0,192 |
| | CAPN1 530 | GG - 21 AG - 9 AA - 5 | GG - 0,600 AG - 0,257 AA - 0,142 | G - 0,728 A - 0,271 | 0,257 | 0,397 | 0,352 |
| Симентальська (n - 30) | TG | CC - 9 CT - 18 TT - 3 | CC - 0,3 CT - 0,6 TT - 0,1 | C - 0,6 T - 0,4 | 0,600 | 0,480 | -0,250 |
| | CAPN1 530 | GG - 2 AG - 17 AA - 11 | GG - 0,066 AG - 0,566 AA - 0,366 | G - 0,35 A - 0,65 | 0,566 | 0,465 | -0,244 |
| Абердино-ангуська (n - 21) | TG | CC - 12 CT - 9 TT - 0 | CC - 0,571 CT - 0,428 TT - 0,0 | C - 0,761 T - 0,238 | 0,428 | 0,338 | -0,266 |
| | CAPN1 530 | GG - 16 AG - 5 AA - 0 | GG - 0,761 AG - 0,238 AA - 0 | G - 0,880 A - 0,119 | 0,238 | 0,211 | -0,126 |

У локусі TG найбільший ступінь гетерозиготності спостерігається в породі симентал, також в цій породі найбільша частота комерційно бажаного алелю Т, але в той же час за маркером CAPN1 530, який дозволяє виявити асоціацію з ніжністю м'яса, в даній породі виявлено відносно невисоку концентрацію бажаного алелю G (0,35). Тим не менше гетерозиготність в даному локусі спостерігається на достатньо високому рівні (0,566). Як видно із таблиці, фактична гетерозиготність перевищує очікувану, тобто існує надлишок гетерозигот, що несуть в своєму генотипі алель G.

Досліджена популяція південної м'ясної породи за маркером TG також характеризується високим рівнем гетерозиготності, незважаючи на невисоку частоту алелю Т (0,257). За маркером CAPN1 530 в даній породі виявляється велика кількість тварин з генотипом GG, відповідно і висока частота алелю G.

При дослідженні популяції абердин-ангусів було виявлено відсутність тварин з генотипом ТТ за маркером TG, але гетерозиготність в даному локусі спостерігалась на достатньо високому рівні (0,428) і фактична перевищує очікувану при низькій частоті алелю Т (0,238). При цьому за маркером CAPN1 530 в даній породі спостерігається найбільша частота алелю G (0,880).

Висновки.

Проведений порівняльний аналіз поліморфізму фрагментів ДНК у трьох порід великої рогатої худоби при використанні чотирьох ISSR-ПЛР – маркерів показав, що спектри продуктів ампліфікації мають свої особливості, пов'язані з обраним праймером. Породи відрізнялися одна від одної кількістю і розміром ампліконів, а їх розмір варіював від 180 до 1700 п.н.

За результатами дослідження поголів'я трьох порід за ДНК-маркерами, пов'язаними з показниками м'ясної продуктивності визначено частоту комерційно бажаного алелю Т (маркеру TG) на рівні 0,238 в породі абердин-ангус, 0,257 у породі південна м'ясна та 0,400 у породі симентал. За маркером CAPN1 530 частоту бажаного алелю G на рівні 0,350 для симентальської породи, 0,728 – для породи південна м'ясна та 0,880 для абердин-ангусів. Знайдені певні особливості генетичної структури трьох порід. Отримані в результаті дослідження дані можливо використовувати при формуванні стад із певними ознаками м'ясної продукції.

У дослідженні, було виявлено, що за ДНК-маркерами пов'язаними з показниками продуктивності, генетичні структури популяцій великої рогатої худоби породи південна м'ясна і абердин-ангус мають певну схожість між собою. Можна припустити, що в деякій мірі це пояснюється селекцією в напрямку м'ясної продуктивності, а досліджена популяція сименталів має свої особливості генетичної структури в зв'язку з тим, що в даній породі селекція довгий час була спрямована також і на молочну продуктивність.

Література

1. Calcinns, C.R., Seiderman, S.C. Relationships among calcium dependant protease, cathepsin B and H, meat tenderness and the response of muscle to aging // J. Anim. Sci. – 1988. – Vol. 66. – P.1186-1193.
2. Costello S. et al. Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine *M. longissimus dorsi* // Meat. Science. – 2007. – Vol. 75. – P. 551-557.
3. Page B.T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle // J. Anim. Sci. – 2002. – Vol. 80. – P. 3077-3085.
4. Barendse W.J. et al. The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle // Austr. J. Exp. Agricult. – 2004. – Vol.44. – P.66.
5. Casas E. et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle // J. Anim. Sci. – 2005. – Vol. 83. – P. 13-19.

6. Barendse W.J. Assessing lipid metabolism. Int. Pat. Appl. WO99/23248. // World International Property Organization. – Geneva:1999.

7. Державний племінний реєстр. – 2009р. – Т.2. – 385с.

Summary

Dobrianska M.L., Kopylov K.V., Podoba Y.V., Vdovichenko Y.V., Kopylova K.V.

The Institute of Animal Breeding and Genetics NAAN, Chubynske, Ukraine

**GENETIC STRUCTURE OF MEAT CATTLE BREEDS *SOUTH MEAT*,
SIMMENTAL, *ABERDEEN-ANGUS* FOR DIFFERENT TYPES OF DNA
MARKERS**

Were analyzed of genetic structure of beef cattle by DNA markers of genes thyroglobulin and calpain which associated with meat quality parameters, and ISSR-markers. Breed specific amplification fragments detected with microsatellites (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (GA)₉C for breeds Southern Meat, Simmental and Aberdeen-Angus. Investigated polymorphisms of genes thyroglobulin (TG), associated with marbling meat and calpain (CAPNI 530), associated with the tenderness of meat. Were found the commercially desirable alleles for markers of TG and CAPNI 530 in cattle breeds Southern Meat, Simmental and Aberdeen-Angus from the holding companies "Agrikor-Holding" and "Zelenogirske".

Key words: *DNA analysis, cattle, gene, thyroglobulin, calpain, ISSR-PCR - marker.*

Рецензент - д.с.-г.н., проф. Щербатий З.Є.