12. Steffen, P., and A. Eggen. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Anim. Genet.* 24:121–124.

13. Triwitayakorn, K., B. Moolmuang, S. S. Sraphet Panyim, A. Na-Chiangmai, and D. R. Smith. 2006. Analysis of Genetic Diversity of the Thai Swamp Buffalo (Bubalus bubalis) Using Cattle Microsatellite DNA Markers. *Asian-Australasian Journal of Animal sciences*. 19:617–621.

14. Vaiman, D., D. Mercier, K. Moazami-Goudarzi, A. Eggen, R. Ciampolini, A. Lepingle, R. Velmala, J. Kaukinen, S. L. Varvio, P. Martin, H. Leveziel, and G. Guerin. 1994. A set of 99 cattle microsatellite: characterization, synteny mapping and polymorphism. *Mammalian Genome*. 5:288–297.

15. Van Hooft, W. F., O. Hanotte, P. W. Wenink, A. F. Groen, Y. Sugimoto, H. H. T. Prins, and A. Teale. 1999. Applicability of bovine microsatellite markers for population genetic studies on African buffalo (Syncerus caffer). *Animal Genetics*. 30:214–220.

УДК 636.2.033:575

ХАРАКТЕРИСТИКА СІРОЇ УКРАЇНСЬКОЇ ПОРОДИ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ДНК-МАРКЕРАМИ

Н. Б. МОХНАЧОВА[1], Т. М. СУПРОВИЧ[2], М. Л. ДОБРЯНСЬКА[1], Н. М. ФУРСА[3]

[1]Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

[2]Подільський державний аграрно-технічний університет (Кам'янець-Подільський, Україна)

[3]Інститут тваринництва степових районів імені М. Ф. Іванова «Асканія-Нова» (Асканія-Нова, Україна)

nm82@i.ua

Проведено дослідження популяції корів сірої української породи за QTL-маркерами, що зумовлюють молочну продуктивність та якісні показники м'яса. У роботі використано зразки крові від 136 голів корів із господарств ДП ДГ «Маркеєво» Херсонської області. Спектр алелів генів гормону росту (GH), бета-лактоглобуліну (βLG), тиреоглобуліну (TG5) і калпаїну (CAPN) вивчали за допомогою ПЛР-ПДРФ. Встановлено, що за геном бета-лактоглобуліну найбільша кількість корів є носіями гомозиготного генотипу ВВ; він визначався у кожної другої дослідженої тварини. Вивчення поліморфізму гена тиреоглобуліну встановило, що у популяції представленої породи найчастіше проявляється гетерозиготний генотип СТ, носієм якого є 57% тварин. За геном гормону росту значно превалює також гомозиготний генотип LL (98%), а генотип тварин VV зовсім не виявлено; за геном калпаїну у досліджених тварин взагалі виявлено лише генотип GG.

Ключові слова: **корови, господарські корисні ознаки, молекулярно-генетичні маркери, алелі, QTL-маркери, ПЛР-ПДРФ**

CHARACTERISTICS OF UKRAINIAN GREY CATTLE BY DNA-MARKERS

N. Mokhnachova[1], T. Suprovich[2], M. Dobrynska[1], N. Fursa[3]

[1]Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

[2]Podolsky State Agrarian Technical University (Kamenetz-Podolsk, Ukraine)

[3]Institute of Animal Breeding in the Steppe Regions nd. a. M. F. Ivanov «Ascania-Nova» (Ascania-Nova, Ukraine)

Population of Ukrainian Grey cattle by QTL-markers which determine milk productivity and

© Н. Б. МОХНАЧОВА[1], Т. М. СУПРОВИЧ[2], М. Л. ДОБРЯНСЬКА[1], Н. М. ФУРСА, 2016

quality indicators of meat was studied. We used blood samples from 136 Ukrainian Grey cows at «Markeyevo» farm, Kherson region. The spectrum of alleles of growth hormone (GH), beta-lactoglobulin (βLG), thyroglobulin (TG5) and calpain (CAPN) was studied by PCR-RFLP. It is found that for beta-lactoglobulin gene the greatest number of cows is carriers of homozygous genotype BB; it was determined at every second of the studied animals. The study of gene polymorphism of thyroglobulin found that at the population of the represented breed, the most often seen heterozygous genotype was CT, carriers of which were 57% of the animals. Homozygous genotype LL was dominated (98%) on growth hormone gene and genotype VV wasn't find; only genotype GG was found on calpain gene at studied animals generally.

Keywords: **cows, economic-useful traits, molecular genetic markers, alleles, QTL-markers, PCR-RFLP**

ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОЙ УКРАИНСКИЙ ПОРОДЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО ДНК-МАРКЕРАМ

Н. Б. Мохначева[1], Т. М. Супрович[2], М. Л. Добрянская[1], Н. М. Фурса[3]

[1]Институт разведения и генетики животных имени М.В.Зубца НААН (Чубинское, Украина)

[2]Подольский государственный аграрно-технический университет (Каменец-Подольский, Украина)

[3]Институт животноводства степовых районов имени М.Ф.Иванова Аскания-Нова (Аскания-Нова, Украина)

Проведено исследование популяции коров серой украинской породы по QTL-маркерам, обусловливающих продуктивность и качественные показатели мяса. В работе использованы образцы крови от 136 голов коров из хозяйств ДПДГ "Маркеево" Херсонской области. Спектр аллелей генов гормона роста (GH), бета-лактоглобулина (βLG), тиреоглобулина (TG5) и калпаина (CAPN) изучали с помощью ПЦР-ПДРФ. Установлено, что по гену бета-лактоглобулину наибольшее количество коров являются носителями гомозиготного генотипа BB; он определялся у каждого второго исследованного животного. Изучение полиморфизма гена тиреоглобулина показало, что в популяции представленной породы чаще всего проявляется гетерозиготный генотип CT, носителем которого является 57% животных. По гену гормона роста значительно превалирует также гомозиготный генотип LL (98%), а генотип VV совсем не обнаружено; по гену калпаина вообще обнаружено только генотип GG.

Ключевые слова: **коровы, хозяйственно полезные признаки, молекулярно-генетические маркеры, аллели, QTL -маркеры, ПЦР-ПДРФ**

Вступ. Збереження біологічного різноманіття тварин нині у всьому світі є одним з найвагоміших пріоритетів. Поліморфізм генів сільськогосподарських тварин є запорукою успішної селекції; він же забезпечує пристосування тварин до змін довкілля. Збіднення генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин може призвести до різноманітних негативних наслідків: значно знизиться ефективність селекції, вже існуючі породи не будуть успішно протидіяти збудникам інфекції, що постійно еволюціонують; буде втрачено цінний генетичний матеріал для вивчення та аналізу походження порід.

Місцеві породи, створені народною селекцією, є цінним генетичним ресурсом. Не володіючи у більшості випадків високою продуктивністю, вони, зазвичай, характеризуються високою резистентністю до різних захворювань [1].

Сіра українська порода великої рогатої худоби, як представник групи локальних аборигенних порід, є цікавим об'єктом популяційних досліджень у відношенні не лише адаптаційних характеристик, а і генетичних механізмів, що забезпечують фенотипічний прояв тих чи інших ознак продуктивності [2].

Сучасні досягнення молекулярної генетики зробили можливим ідентифікувати гени, пов'язані з якісними і кількісними ознаками ВРХ. Найбільш інформативними в цьому відношенні є ДНК-маркерні системи засновані на аналізі поліморфізму структурних генів, які беруть участь у формуванні та функціонуванні господарськи корисних ознак. До одних із найбільш поширених потенційних ДНК-маркерів ознак продуктивності ВРХ належать гени: гормону росту (*bGH*), бета-лактоглобуліну (βLG), тиреоглобуліну (TG5), калпаїну (CAPN). Ген bGH є важливим регулятором соматичного росту тварин, володіє лактогенною та жиромобілізуючою дією. Ген CSN3 пов'язаний з білкомолочністю та технологічними властивостями молока. Різні алельні варіанти гена βLG асоційовані з високим вмістом в молоці казеїнових і сироваткових білків, відсотком жиру та позитивно впливають на молочну продуктивність. За цим геном здійснюється контроль якості молочних продуктів і виявлення фальсифікації молока. Доведено його роль у протимікробній активності до збудників маститу. Ген TG5 є попередником тиреоїдних гормонів: трийодотироніну і тетрайодотироніну, які беруть участь в утворенні жирових клітин і формуванні мармуровості м'яса. Ген CAPN бере участь в процесі протеолізу при дозріванні м'яса і приводить до більш високої ніжності м'яса [9, 10, 11].

Мета роботи – дослідити алельний поліморфізм генів гормону росту, бета-лактоглобуліну, тиреоглобуліну і калпаїну у сірої української породи великої рогатої худоби.

Матеріали та методи досліджень. Було досліджено зразки крові (**n=84**) від корів сірої української породи з господарств ДП ДГ «Маркеєво» (Херсонська обл.). Молекулярно-генетичні дослідження проводились на базі лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН. Виділення ДНК із цільної крові проводили з використанням стандартного комерційного набору «ДНК-сорб-В» (виробництво АмпліСенс, ЦНІІ епідеміології МЗ РФ, Росія).

Поліморфізм генів GH, βLG, TG 5 та CAPN1530 досліджували методом ПЛР-ПДРФ. Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації та назви рестриктаз для рестрикції продуктів ампліфікації показано в табл.1.

1. Нуклеотидні послідовності праймерів та рестриктази

Ген	Послідовність праймера, 5'-3'	Рестриктаза	Посилання
*b*GH	GCTGCTCCTGAGGGCCCTTC GCGGCGGCACTTCATGACCC	Alu I	M.C. Lucyetal, 1993
βLG 5	TGTGCTGGACACCGACTACAAAAAG GCTCCCGGTATATGACCACCCTCT	HAE III	J. Medrano, 1990
TG	GGGGATGACTACGAGTAT GACTG GTGAAAATCTTGTGGAGGCTGT	PsuI	V. Alison, 2007
CAPN1530	TCTTCTCAGAGAAGAGCG CAG CTGCGCCATTACTATCGATC	PsyI	B.T. Page et al., 2002

Електрофоретичне розділення фрагментів рестрикції ДНК виконували в 1,5%, та 2%, агарозному гелях у тріс-боратному електрофорезному буфері, згідно методичних рекомендацій [5, 6]. Візуалізацію проводили на трансілюмінаторі в УФ світлі при довжині хвилі 380 нм після забарвлення гелю етидієм бромідом. Розміри отриманих в ПЛР або в результаті рестрикції продуктів виявляли за допомогою маркеру молекулярних мас, *GeneRuler TM 50 bp DNA Ladder, GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder, SM0378, «Fermentas».* Детекцію результатів проводили фотографуванням гелів цифровою камерою.

Підрахунок частот алелів проводився із врахуванням кількості гомозигот і гетерозигот, знайдених за відповідним алелем за формулою:

$$P(A) = \frac{2N_1 + N_2}{2n}, \qquad (1)$$

де N_1 і N_2 – відповідно число гомозигот і гетерозигот для досліджуваного алеля;

n – об'єм вибірки.

Фактичну (наявну) гетерозиготність визначали шляхом прямого підрахунку за формулою:

$$H_0 = N_2 / n \qquad (2)$$

Очікувану гетерозиготність визначали за формулою:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 , \qquad (3)$$

де $p_1, p_2, \ldots p_n$ – частоти алелів.

З метою оцінки статистичної достовірності розбіжності розподілів одержаних результатів використовували критерій Пірсона:

$$\chi^2 = \frac{\sum (\Phi - T)^2}{T} \qquad (5)$$

де Φ – фактична кількість генотипів;

T – теоретична кількість генотипів.

Результати отримані в експериментальних дослідженнях опрацьовували методом популяційно-генетичного і біометричного аналізу з використанням «GEN Alex 6», «Statistica» [8].

Результати досліджень. На рис.1 представлено приклади електрофореграм, отриманих при визначенні генотипів тварин за досліджуваними локусами.

Результати ДНК-тестування локусу бета-лактоглобуліну на наявність А- і В-алельних варіантів у тварин сірої української худоби виявили, що найбільша кількість корів є носіями гомозиготного генотипу ВВ гена βLG. Він визначався у кожної другої дослідженої нами тварини. Гомозиготний генотип АА було встановлено лише у двох корів, що становить 4%. Генотип АВ був представлений у 45% тварин (табл. 2).

2. Частота алелів та генотипів за локусом гена бета-лактоглобуліну у тварин сірої української породи

n	Генотип	Частота генотипів	Частота алелів		H_0	H_e	χ^2
			A	B			
84	AA	0,036	0,264	0,736	0,455	0,389	1,63
	AB	0,455					
	BB	0,509					

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_e – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності

Отже, дослідження показало достовірне превалювання частоти алеля В над алелем А (0,736 та 0,264 відповідно), що призводить до переважаючої гомозиготизації в сторону одного з алелів. Алель В гена бета-лактоглобуліну пов'язаний з високим вмістом у молоці казеїнових білків і високим процентом жиру [12].

Значення очікуваної та наявної гетерозиготності за даним геном достовірно не відрізнялися.

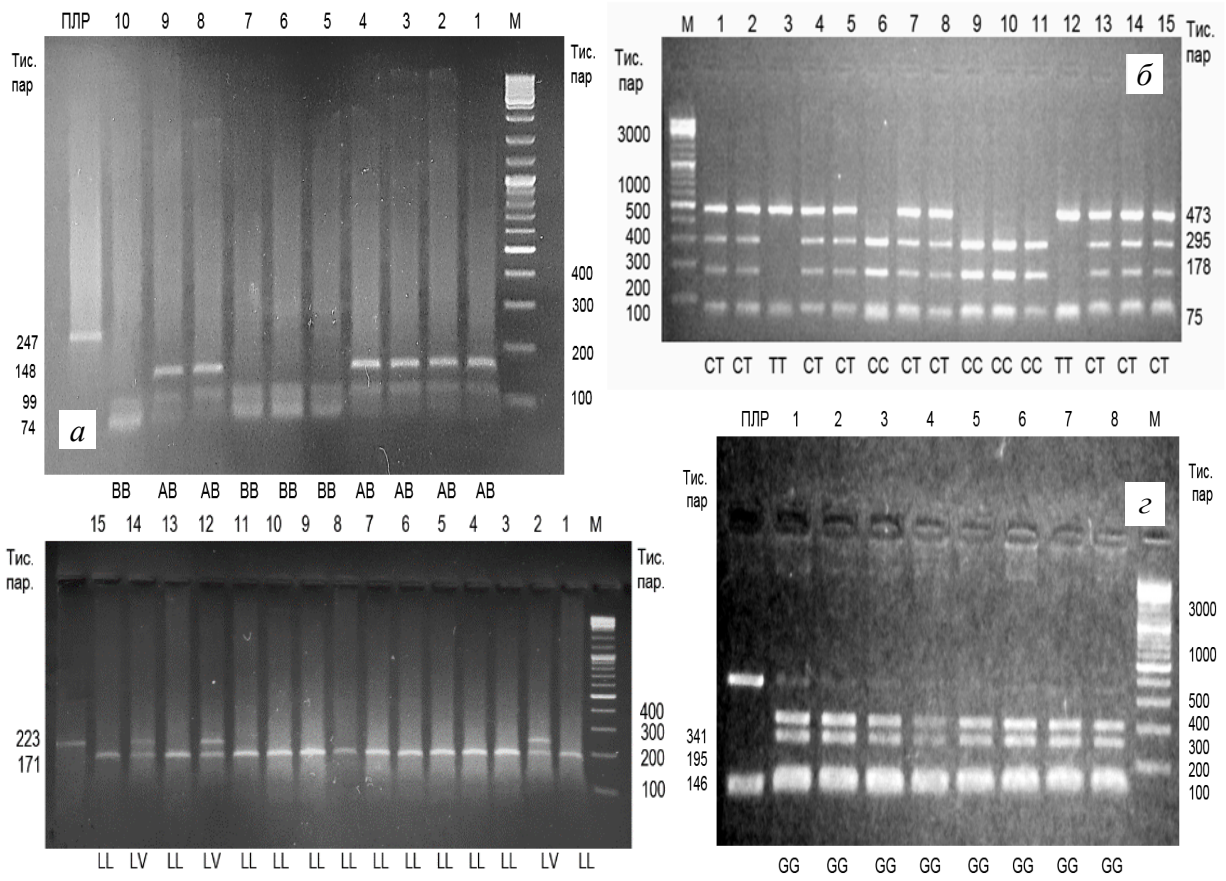

Рис.1. **Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за дослідженими генами:** *а – βLG, б - TG5, в – GH-гормон росту; г – CAPN; М – маркер молекулярних мас М100bp; генотипи зразків вказані на фото*

Вивчення поліморфізму гена тиреоглобуліну засвідчило, що у популяції цієї породи найчастіше проявляється гетерозиготний генотип СТ, носієм якого є 57% тварин (табл. 3).

У гомозиготному стані алель С проявляється у 31% тварин, а алель Т – лише у 11%. Щодо рівня гетерозиготності, отримана нами фактична гетерозиготність перевищує теоретично очікувану. Проте різниця статистично незначуща. Отже, за геном тиреоглобуліну сіра українська порода належить до порід, які несуть найвищу частоту бажаного за ознаками мармуровості м'яса алеля С.

3. Розподіл частот алелів та генотипів за локусом гена тиреоглобуліну у тварин сірої української породи

n	Генотип	Частота генотипів	Частота алелів		H_0	H_E	χ^2
			C	T			
84	CC	0,310	0,571	0,411	0,571	0,411	0,062
	CT	0,571					
	TT	0,119					

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_e – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності

Результати аналізу поліморфізму гена *bGH,* що представлені в табл.4, вказують на відсутність у дослідженій вибірці тварин з генотипом VV, низький відсоток гетерозигот (3%) і значну частку гомозигот за L-алелем (98%).

Достовірної різниці за рівнем фактичної і очікуваної гетерозиготності за геном соматотропіном не виявлено.

4. Розподіл частот алелів та генотипів за локусом гена гормону росту у тварин сірої української породи

n	Генотип	Частота генотипів	Частота алелів		H_0	H_E	χ^2
			V	L			
84	V V	0	0,018	0,98	0,036	0,039	0,06
	LV	0,036					
	LL	0,98					

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_e – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності

Одним із маркерів якісної характеристики м'ясної продуктивності великої рогатої худоби є ген CAPN. Нами встановлено, що у тварин цієї популяції сірої української породи відсутній поліморфізм за геном калпаїну. Всі досліджені тварини були носіями гомозиготного генотипу за бажаним алелем G (1,0). Така особливість генетичної структури дослідженої популяції за геном калпаїну, тварини якої відтворюються в малочисельному масиві, свідчить про породоспецифічний високий рівень генетичного потенціалу за якісною характеристикою м'ясної продуктивності, а саме, ніжністю м'яса.

Висновки. У дослідженій популяції сірої української породи великої рогатої худоби за геном бета-лактоглобуліну (BLG) переважають тварини за генотипом ВВ.

Аналіз генотипів тварин сірої української худоби за геном гормону росту (GH) показав підвищену частоту генотипу LL (98%) та відсутність тварин з генотипом VV.

У корів цієї популяції за геном калпаїну виявлено лише тварин з генотипом GG.

За поліморфізмом гена тиреоглобуліну (TG5) переважає частка тварин з генотипом СТ (57%).

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства / отв. ред. И. А. Захаров; Ин-т общ. генетики им. Н. И. Вавилова РАН. – М.: Наука, 2006. – 462 с.

2. Молекулярно-генетичні та біотехнологічні дослідження в галузі тваринництва/ Б. Є. Подоба, К. В. Копилов, С. І. Ковтун [та ін.] ; за наук. ред. акад. М. В. Зубця. – К. : Аграрна наука, 2013. – 248 с.

3. Дроздов, Е. В. Анализ сочетания мутаций при определении А и В аллелей гена В-лактоглобулина у КРС / В. В. Заякин, И. Я. Нам // Вестник Брянского гос. университета. – 2010. – № 4. – С. 136–140.

4. Сулимова, Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г. Е. Сулимова // Успехи соврем. биологии. – 2004. – Т. 124. – № 3. – С. 260–271.

5. Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкей. – М. : Мир, 1982. – 446 с.

6. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сембрук; пер. с англ. ; под ред. А. А. Баева. – М. : Мир, 1984. – 479 с.

7. Животовский, Л. А. Популяционная биометрия / Л. А. Животовский. – М. : Наука, 1991. – 272 с.

8. Алтухов, Ю. П. Генетические процессы в популяциях / Ю. П. Алтухов. – М. : Наука, 1989. – 328 с.

9. Долматова, И. Ю. Полиморфизм гена гормона роста крупного рогатого скота в связи с молочной продуктивностью / И. Ю. Долматова, А. Г. Ильясов // Генетика. – 2011.– Т. 47. – № 6. – С. 1–7.

10. Хатами, С. Р. ДНК полиморфизм генов гормона роста и пролактина у ярославского и черно-пестрого скота в связи с молочной продуктивностью / С. Р. Хатами, О. Е. Лазебный, Г. Е. Сулимова // Генетика. – 2005. – Т. 41. – № 2. – С. 229–236.

11. Полиморфизм генов *CSN*3, *bPRL*и *bGH* у коров костром ской породы в связи с

показателями молочной продуктивности / А. В. Перчун, И. В. Лазебная, С. Г. Белокуров [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 11. – С. 304–308.

12. Иванченко, Е. В. Полиморфизм хозяйственно-ценных генов (бета-лактоглобулин, каппа-казеин) у аутохонных пород Украины / Е. В. Иванченко, Р. В. Облап, В. И. Глазко // Материалы науч.-ген. конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. А. Р. Жебрака и 70-летию образования каф. генетики Московской с.-х. акад. им. К. А. Тимирязева. – М., 2002. – С. 126–128.

REFERENCES

1. Zakharov, I. A. 2006. *Genofondy sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh: geneticheskie resursy zhivotnovodstva – Gene pools farm animal: animal genetic resources.* Moskva, Nauka, 462 (in Russian).

2. Podoba, B. Ye., K. V. Kopylov, S. I. Kovtun, K. V. Kopylova, Yu. V. Podoba and M. L. Dobryans'ka. 2013. *Molekulyarno-henetychni ta biotekhnolohichni doslidzhennya v haluzi tvarynnytstva – Molecular genetic and biotechnology research in livestock.* Kyiv, Ahrarna nauka, 248 (in Ukrainian).

3. Drozdov, E. V., V. V. Zayakin, and I. Ya. Nam. 2010. Analiz sochetaniya mutatsiy pri opredelenii A i B alleley gena B-laktoglobulina u KRS – Analysis of the combination of mutations the determination A and B allels gene of beta-lactoglobulin. *Vestnik Bryanskogo gos. universiteta – Herald Bryansk State University*. 4:136–140 (in Russian).

4. Sulimova, G. E. 2004. DNK-markery v geneticheskikh issledovaniyakh: tipy markerov, ikh svoystva i oblasti primeneniya – DNA markers in genetic research: types of markers their properties and applications *Uspekhi sovrem. Biologii – The successes of modern biology.* 124(3):260–271 (in Russian).

5. Gaal', E., G. Med'eshi, and L. Veretskey. 1982. *Elektroforez v razdelenii biologicheskikh makromolekul – Electrophoresis in the separation of biological macromolecules*. Moskva, Mir, 446 (in Russian).

6. Maniatis, T., E. Frich and D. Sembruk. 1984. *Molekulyarnoe klonirovanie – Molecular cloning.* Moskva, Mir, 479 (in Russian).

7. Zhivotovskiy, L. A. 1991. *Populyatsionnaya biometriya – Population biometrics.* Moskva, Nauka, 272 (in Russian).

8. Altukhov, Yu. P. 1989. *Geneticheskie protsessy v populyatsiyakh – Genetic processes in populations.* Moskva, Nauka, 328 (in Russian).

9. Dolmatova, I. Yu. and A. G. Il'yasov. 2011. Polimorfizm gena gormona rosta krupnogo rogatogo skota v svyazi s molochnoy produktivnost'yu – Gene polymorphism of growth hormone cattle in connection with dairy efficiency *Genetika – Genetics*. 47(6):1–7 (in Russian).

10. Khatami, S. R., O. E. Lazebnyy, and G. E. Sulimova. 2005. DNK polimorfizm genov gormona rosta i prolaktina u yaroslavskogo i cherno-pestrogo skota v svyazi s molochnoy produktivnost'yu – DNA gene polymorphism growth hormone and prolactin in the Yaroslavl and black-and- white cattle in connection with milk production. *Genetika – Genetics.* 41 (2):229–236 (in Russian).

11. Perchun, A. V., I. V. Lazebnaya, S. G. Belokurov. 2012. Polimorfizm genov CSN3, bPRLi bGH u korov kostromskoy porody v svyazi s pokazatelyami molochnoy produktivnosti – Gene polymorphism CSN3, bPRLi bGH in cows of Kostroma breed in connection with milk production rates. *Fundamental'ny eissledovaniya – Fundamental research.* 11:304–308 (in Russian).

12. Ivanchenko, E. V., R. V. Oblap, and V. I. Glazko. 2002. Polimorfizm khozyaystvenno-tsennykh genov (beta-laktoglobulin, kappa-kazein) u autokhonnykh porod Ukrainy – Polymorphism of economically valuable genes (beta-laktoglobulin, kappa-kazein) autohonnyh rocks in Ukraine. *Materialy nauch.-gen. konf., posvyashch. 100-letiyu so dnya rozhd. A. R. Zhebraka i 70-letiyu obrazovaniya kaf. genetiki Moskovskoy s.-kh. akad. im. K. A. Timiryazeva – Materials scientific-gene. conf., is dedicated 100th anniversary of birth. A.R. Zhebrak and the 70th anniversary of the Department of Education . Moscow Agricultural Genetics Acad. them. Timiryazev.* 126– 128(in Russian).