

УДК 636.2.082:575.113.1

К. В. КОПИЛОВА, О. В. ДУБІН, Ю. В. ПОДОБА,
І. В. МОСТОВА, М. Л. ДОБРЯНСЬКА

Інститут розведення і генетики тварин НААН

АНАЛІЗ ЛОКУСІВ КІЛЬКІСНИХ ОЗНАК QTLs ЗА МАРКЕРАМИ TG, CAPN1 530, MSTN У ТВАРИН ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Проведений генетичний аналіз тварин різних порід великої рогатої худоби за генами – маркерами, що відповідають за якість м'яса – тиреоглобуліну (TG), що пов’язаний з «мармуровістю», калпаїну CAPN1 530, пов’язаного з ніжністю та міостатину MSTN, пов’язаного з розвитком скелетної мускулатури. Виявлено переважання частоти одного генотипу над іншими.

Велика рогата худоба, генетичні маркери, тиреоглобулін (TG), калпаїн (CAPN1 530), міостатин MSTN

Останні досягнення в сфері молекулярної генетики дозволили виявити молекулярні маркери, пов’язані з кількісними ознаками. Це дало можливість підвищити добір тварин з бажаними фенотиповими ознаками, які важко визначити за життя тварини.

Картування генів привело до можливості проведення селекції за багатьма кількісними та якісними ознаками у молочному та м’ясному скотарстві. Виведення нових та уdosконалення існуючих порід сільськогосподарських тварин ґрунтуються на використанні природного або створеного людиною генетичного різноманіття. Тваринництво в Україні

© К. В. Копилова, О. В. Дубін, Ю. В. Подоба, І. В. Мостова,
М. Л. Добрянська, 2011

Розведення і генетика тварин. 2011. № 45

наразі потребує удосконалення й впровадження нових методів та підходів, які ґрунтуються безпосередньо на аналізі спадкової інформації на рівні генів, що дає можливість проводити аналіз генотипу тварин за господарськи корисними ознаками. З точки зору генетики кількісних ознак генетичний потенціал сільськогосподарських тварин прийнято розглядати за формуванням генних комплексів, здатних за певних умов середовища детермінувати розвиток бажаного фенотипу [1, 2].

Селекція, що ґрунтується безпосередньо на аналізі дії окремих генів, точкових мутацій (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs), локусів кількісних ознак (Quantitative Trait Loci – QTLs) та зчеплених з ними генів отримала назву селекції з допомогою маркерів (Marker Assisted Selection – MAS), методологія якої, в першу чергу, передбачає ідентифікацію фрагментів генома, а потім дослідження ознак, які визначаються певним фрагментом. Селекція за допомогою маркерів MAS відкриває можливості підвищення ефекту селекції за рахунок підвищення точності оцінки генетичного потенціалу тварини [3, 14, 27].

Одними з найбільш важливих якісних характеристик в м'ясному скотарстві є мармуровість та ніжність. Мармуровість – це відношення кількості внутрішньом'язового жиру до м'язових волокон. Потенціал мармуровості у м'ясної худоби важко передбачити і тому фенотиповий добір за цією ознакою непростий. По-перше, ступінь жиру визначається окомірно; по-друге, оцінка мармуровості м'яса відбувається після забою.

Гормони щитовидної залози відіграють важливу роль в регуляції метаболізму та можуть вплинути на гомеостаз відкладання жиру. Тиреоглобулін (TG) – глікопротеїновий гормон, який синтезується в фолікулярних клітинах щитовидної залози. TG є попередником трийодтироніну (T3) та тетрайодтироніну (T4), які відіграють важливу роль у рості адипоцита, диференціації й гомеостазі жирових відкладень [5, 6, 25]. Підшкірний шар та загальний процент жиру в тканинах, включаючи утворення молока, знаходиться під впливом поліморфізму гена тиреоглобуліну, так як йодотироніни

впливають на диференціацію адipoцитів. Раніше здійснювалися спроби асоціації TG маркера з мармуровістю або іншими ознаками депонації жиру і TG поліморфізм включений у комерційні панелі [6, 9, 24, 26, 28].

Ніжність м'яса – одна із важливих його оцінок, але її важко визначити за фенотипом і можлива лише після забою тварини й при приготуванні м'яса. Тому відбір тварин за цією ознакою мало хто намагався зробити. Відбір за генотипом міг би обійти цю перешкоду, якщо підібрати відповідні маркери. Останнім часом маркерам гена калпаїну запропоновано виконувати цю роль [4, 7, 16].

Кальпайни є кальційзалежними протеїназами, що складаються, як мінімум, із трьох протеїназ μ -калпайн (CAPN1), m -калпайн CAPN2 і калпастаїн (CAST) [20]. Калпайн системи вельми чутливий до коливань рівня іонів кальцію, температури, pH, які змінюються одразу після забою. Більшість досліджень у тваринництві вказують на кальпайнові протеїнази, припускаючи, що ніжність – це, перш за все, результат калпайн-опосередкованої деградації міофібріл і цитоскелету білків [8, 11–13, 17, 19, 21–23].

Ген міостатину (MSTN) відноситься до родини трансформуючих росту і впливає на розвиток скелетної мускулатури. Ген MSTN у великої рогатої худоби локалізований на другій хромосомі і асоційований з проявом м'язової гіпертрофії (так званої подвійної мускулатури). Наразі відомі такі мутації гена міостатину, як делеції, інерції, точкові мутації, що призводять до значного приросту м'язової тканини і прояву, так званої, подвійної мускулатури. Гомозиготні тварини за геном MSTN мають певні труднощі при отеленні через збільшення живої маси телят при народженні [1].

Метою нашого дослідження було оцінити поліморфізм генів тиреоглобулін, калпайну та міостатину у тварин великої рогатої худоби різних порід.

Матеріал і методика досліджень. Для аналізу генотипів за господарськи корисними ознаками використовувалася сперма великої рогатої худоби різних порід, надана банком гено-

фонду порід Інституту розведення і генетики тварин НААН, а саме: світла аквітанська – 7 гол.; волинська м'ясна – 13 гол.; знам'янський тип південної м'ясної породи – 3 гол.; кіан – 4 гол; лімузин – 4 гол.; південна м'ясна – 2 гол.; українська м'ясна – 24 гол.; шароле – 4 гол.

ДНК із сперми досліджуваних тварин виділяли за допомогою реагенту «Chelex–100». До 3 мкл нативної сперми додали 200 мкл 5% стерильного водного розчину «Chelex–100». До суміші додали 2 мкл протейнази К концентрацією 10 мг/мл та 7 мкл 1М дітіотрейтолу. Обережно перемішали шляхом струшування та інкубували зразки 30–60 хв при температурі 56°C. Перемішували вміст пробірок на мікрозмішувачі 5–10 сек та інкубували 8 хв при температурі 100°C. Перемішували на мікрозмішувачі 5–10 сек та центрифугували 2–5 хв при 8000–10000 об/хв. Зразки зберігали при температурі -20°C.

Оцінку поліморфізму досліджуваних генів проводили методом ПЛР–ПДРФ за наступними генами: тиреоглобулін TG, калпайн CAPN530.

Для ампліфікації гена териоглобуліну TG використовували наступні праймери:

TGf 5' – GGGGATGACTACCGAGTATGACTG – 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 PsuI. У тварин носіїв генотипу СС три сайти рестрикції, з фрагментами довжиною 295 п.н., 178 п.н., 75 п.н., у ТТ – два сайти рестрикції, довжиною фрагментів 473 п.н., 75 п.н., а СТ – мають довжину фрагментів 473 п.н., 295 п.н., 178 п.н., 75 п.н.

Для ампліфікації гена калпайн CAPN1 530 використовували наступні 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 CAPN530 продукт ампліфікації обробляли рестриктазою PsyI. У тварин носії-

їв генотипу AA один сайт рестрикції, з довжиною фрагмента 341 п.н., у GG – три сайти рестрикції, довжиною фрагментів 341 п.н., 195 п.н., 146 п.н., а AG – мають довжину фрагментів 195 п.н., 146 п.н.

Для ампліфікації гена міостатину MSTN використовували наступні праймери:

MSTNf 5'– TCTAGGAGAGATTTGGGCTT – 3'

MSTNr 5'– TGGGTATGAGGATACTTTGC – 3'.

Довжина ампліфікованого фрагменту складає 196 п.н. Ген MSTN мономорфний і його типували відразу після проведення ПЛР-аналізу. Продукт ПЛР гена MSTN рівний 196 п.н., що відповідає генотипу AA, гетерозиготні тварини мають фрагменти розміром 196 п.н. і 185 п.н.

Результати досліджень. Ген тиреоглобулін розташований у 14 хромосомі розміром 1068 п.н.; однонуклеотидний поліморфізм (C→T) гена відбувається у позиції 422 у 5'– послідовності й переважають два алельні варіанти: алель «3» визначається як Delta T (-537 п.н.; GATT); алель «2» визначається як Delta C (537 п.н.; GATC) [9].

Деякими дослідниками виявлена асоціація гена TG з мармуровістю м'яса [9], внутрішньом'язовим жиром [15], обробленням туші для продажу та масою туші EPDs [24]. Виявлено, що TG/PsuI є причиною мутації в мармуровості QTL і, що T – більш бажаний алельний варіант для депонування внутрішньом'язового жиру [26]. З іншого боку, було повідомлено, що немає асоціації між TG–поліморфізмом і мармуровістю або ступенем ніжності у *Bos indicus* і Brahman великої рогатої худоби [6], або мармуровістю, внутрішньом'язовим жиром, областю м'язового ока й товщиною жиру у *Bos taurus* породи симентал [24] і навіть товщиною жиру на спині [18].

За геном тиреоглобуліну встановлено розподіл алельних варіантів у тварин великої рогатої худоби різних порід та отримано наступні загальні дані: частота генотипу CC була 54,10%, частота генотипу CT – 29,51%, а частота генотипу TT – 16,39% тощо. Тобто, генна частота алеля С становила 0,688 у дослідженої нами великої рогатої худоби.

Найбільша частота генотипу СС гена тиреоглобуліну 0,615 була у тварин волинської м'ясної породи. Частоти генотипів СТ і ТТ складали 0,231 і 0,154 відповідно.

У тварин знам'янського типу частота генотипу СТ складала 0,667, а генотип ТТ серед даної породи не був виявлений, оскільки досліджуване нами поголів'я не достатньо велике. Для світлої аквітанської породи частоти генотипів СС, СТ і ТТ складали 0,571, 0,286, 0,143 відповідно. У тварин порід кіан та шароле частота генотипу ТТ складала 0,25. Частота генотипу СС у тварин української м'ясної породи складала 0,458, а частоти генотипів СТ і ТТ складали 0,334 і 0,208.

За геном тиреоглобуліну у тварин світлої аквітанської породи алельний варіант С складав 0,714, а алельний варіант Т – 0,286. У порід лімузин та шароле алельний варіант С складав 0,75, а варіант Т – 0,25. Щодо волинської м'ясної породи, то алельні варіанти С і Т складали 0,731 й 0,269. Для української м'ясної породи і тварин породи кіан алельний варіант С складав 0,625, а алельний варіант Т – 0,375.

Варіанти C422T гена тиреоглобуліну аналізуються в комерційній панелі GeneSTAR Quality Grade (Genetic Solutions/Bovigen Pty. Ltd.), остання валідація підтвердила те, що наявність алелю Т покращує показники туші [6, 15, 28]. Такі ж результати були отриманні при аналізі тварин, що відтворювалися на території Бразилії [10].

Протилежні результати були отримані нами при аналізі алельних варіантів гена тиреоглобулін. Так для тварин світлої аквітанської породи алельний варіант С складав 0,714, а алельний варіант Т – 0,286. У тварин порід лімузин і шароле алельні варіанти С і Т складали 0,750 і 0,250 відповідно. Щодо волинської м'ясної породи, алельні варіанти С і Т складали 0,731 і 0,269. Для тварин української м'ясної породи і тварин породи кіан алельний варіант С складав 0,625, а алельний варіант Т – 0,375. Тобто, загалом, у дослідженіх нами тварин переважав алельний варіант С і складав – 0,688.

Ген калпайн розташований у 29 хромосомі. Відомі деякі маркери: маркер CAPN1 316 C/G – поліморфізм в екзоні 9 гена (позиція

5709 від AF252504), виробляє заміни С алеля коду для аланіну, G алеля коду для гліцину; маркер CAPN1 530 (A / G) – поліморфізм в екзон 14 гена (позиція 4558 від AF248054), виробляє заміни амінокислот А алеля коду ізолейцину, G алеля кода валіну; маркер CAPN1 4753 – аденоzin / ітідіновий поліморфізм в інтроні 21 (позиція 8676 з AF248054); маркер CAPN1 5331 A / T – аденоzin / тиміновий поліморфізм в інтроні 1 (позиція 327 з AF252504); маркер CAPN1 4751 C / T – поліморфізм в інтроні 17 (позиція 6545 з AF248054) [16, 7, 4, 6].

Маркери CAPN1 316 і CAPN1 530 були пов’язані з ніжністю м’яса, причому маркер CAPN1 530 був менше інформативним, ніж маркер CAPN1 316. Мабуть, це було пов’язано з малою кількістю досліджуваних тварин. Аналіз частот CAPN1 530 також був малоінформативним, а аналіз CAPN1 316 показав, що у тварин з генотипом GG, м’ясо було ніжніше, ніж у тварин з генотипом CG. Протилежні дані були отриманні M. Soattin. Частота алельного варіанту G маркеру CAPN1 530 у тварин великої рогатої худоби породи п’емонтеze була пов’язана з ніжністю м’яса і мала вищі значення, ніж частота алельного варіанту С.

З метою вивчення поліморфізму гена калпайн за маркером CAPN1 530 нами було виконано порівняльний аналіз розподілу алельних варіантів у великої рогатої худоби різних порід та отримані наступні загальні дані: частота генотипу GG становила 60,65%, частота генотипу GA – 31,15 %, а частота генотипу AA – 8,2 %. Потрібно зазначити, що у зв’язку з невеликою кількістю досліджених тварин у породах шароле, кіан, лімузин і світла аквітанська нами не було виявлено генотипу AA.

У тварин української м’ясної худоби частота генотипу GG складала 0,625, для світлої аквітанської породи і волинської м’ясної 0,429 і 0,462; для тварин світлої аквітанської породи частота GA становила 0,571 і була найбільшою.

Загалом бажаний алельний варіант G маркеру CAPN1 530 у досліджуваних нами тварин великої рогатої худоби склав 0,762. У тварин світлої аквітанської породи алельний варіант G становив 0,714, а алельний варіант А – 0,286. У тварин порід

кіан, лімузин і шароле алельний варіант G складав 0,750. Для тварин української м'ясної породи алельний варіант G становив 0,771, алельний варіант A – 0,229.

За геном MSTN в усіх досліджуваних тварин великої рогатої худоби різних порід був виявлений генотип AA.

Висновки. При дослідженні тварин великої рогатої худоби різних порід за геном тиреоглобуліну нами було виявлено переважання частоти генотипу CC, вона складала 54,10%. Досліджені породи за геном калпайн (маркером CAPN1 530), було виявлено переважання частоти генотипу GG, що складала 60,65%. За геном міостатину частота генотипу AA складала 100 %.

Враховуючи вищевикладене, можна зробити висновок, що гени тиреоглобулін і калпайн можуть використовуватися в селекційній роботі як характеристики для поліпшення м'ясних якостей у тварин великої рогатої худоби.

1. *ДНК-діагностика великої рогатої худоби в системі геномної селекції: методичні рекомендації* / В. П. Буркат [та ін.]. – К., Чубинське, 2009. – 112 с.

2. Кленовицкий, П. М. Анализ генных карт животных / П.М. Кленовицкий // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных : тез. докл. междунар. науч. конф., 19–20 ноября 2002 г. / ВИЖ. – Дубровицы, 2002. – С. 138–139.

3. Alison, V. E. Marker – assisted selection in beef cattle / V. E. Alison // UC Davis. – 2007. – Р. 1–2.

4. *A new single nucleotide polymorphisms in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of Bos indicus, Bos Taurus, and crossbred descent* / S.N. White [et al.] // J. Anim. Sci. – 2005. – Vol. 83. – P. 2001–2008.

5. Ailhaund, G. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development / G. Ailhaund [et al.] // Annu Rev Nutr. – 1992. – Vol. 12. – P. 207–233.

6. *Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in Bos indicus cattle* / E. Casas [et al.] // J. Anim. Sci. – 2005. – Vol. 83. – P. 13–19.

7. *Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires* / B. T. Page [et al.] // J. Anim. Sci. – 2004. – Vol. 82. – P. 3474–3481.

8. *Association* of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine M. longissimus dorsi / S. Costello [et al.] // Meat. Science. – 2007. – Vol. 75. – P. 551–557;
9. *Barendse, W.J.* Assessing lipid metabolism. Int Pat Appl WO99/23248. // World International Properti Organization. – Geneva, 1999.
10. *Bovine* gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness / R. S. Marina Fortes [et al.] // Genetics and Molecular Biology – 2009. – Vol.32. – P. 75–82.
11. *Calcinns, C.R.* Relationships among calcium dependant protease, cathepsins B and H, meat tenderness and the response of muscle to aging / C. R. Calcinns, S. C. Seideman // J. Anim. Sci. – 1988. – Vol. 66. – P. 1186–1193.
12. *Changes* in the calpains and calpastatin during poatmortem storage of bovine muscle / M. L. Boehm [et al.] // J. Anim. Sci. – 1998. – Vol. 76. – P. 2415–2434.
13. *Characterization* of biological types of cattle (Cycle VII): Carcass, yield, and longissimus palatability traits / T. L. Wheeler [et al.] // J. Anim. Sci. – 2005. – Vol. 83. – P. 196–207.
14. *Dekkers, C. M.* Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons / C. M. Dekkers // J. of Animal Sci. – 2004. – Vol. 82, suppl 13. – P. 313–328.
15. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle / G. Thaller [et al.] // Anim. Genet. – 2003. – Vol. 34. – P. 354–357.
16. *Evaluation* of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle / B. T. Page [et al.] // J. Anim. Sci. – 2002. – Vol. 80. – P. 3077–3085.
17. *Factors* regulating lamb longissimus tenderness are affected by age at slaughter / E. Veiseth [et al.] // Meat. Science. – 2004. – Vol. 68. – P. 635–640.
18. *Fine* mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of Bos Taurus / S.S. Moore [et al.] // J. Anim. Sci. – 2003. – Vol. 81. – P. 1919–1925.
19. *Is Z-disk* degradation responsible for postmortem tend–1367.
20. *Koohmaraie, M.* Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system / M. Koohmaraie, G.H. Geesink // Meat. Science. – 2006. – Vol. 74. – P. 34–43.
21. *Koohmaraie, M.* Biochemical factors regulating the toughening tenderization processes of meat / M. Koohmaraie // Meat. Science. – 1996. – Vol. 43. – P. 193–201.

22. *Koohmaraie, M.* Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effect on myofibrils with m-calpain / M. Koohmaraie // J. Anim. Sci. – 1992b. – Vol. 70. – P. 3697–3708.
23. *Luciano, F.B.* Biochemical aspects of meat tenderness: a brief review / F. B. Luciano, A. A. Anton, C. F. Rosa // Archivos de Zootecnia – 2007. – Vol. 56. – P. 1–8.
24. *Relationship* among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition and expected progeny differences in early weaned Simmental steers / C.B. Rincker [et al.] // J. Anim. Sci. – 2006. – Vol. 84 – P. 686–693.
25. *Terminal* differentiation of mouse preadipocyte cells: Adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine / C. Darimont [et al.] // Mol. Cell Endocrinol. – 1993. – Vol. 98. – P. 67–73.
26. *The TG5* thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle / W. J. Barendse [et al.] // Austr. J. Exp. Agricult. – 2004. – Vol. 44. – P. 66.
27. *The Use of Genetic Markers to Measure Genomic Response to Selection in Livestock* / L. Gomes-Raya [et al.] // Genetics. – 2002. – Vol. 162, № 3. – P. 1381–1388.
28. *Validation* of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits / A. L. Van Eenennaam [et al.] // J. Anim. Sci. – 2007. – Vol. 85. – P. 891–900.

АНАЛИЗ ЛОКУСОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ QTLs ПО МАРКЕРАМ TG, CAPN1 530, MSTN У ЖИВОТНЫХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА. Копылов К. В., Дубин А. В., Подоба Ю. В., Мостовая И. В., Добрянская М. Л.

Проведен генетический анализ животных разных пород крупного рогатого скота по генам-маркерам, ответственным за качество мяса – тиреоглобулин TG, который связан с «мраморностью», калпaina CAPN1 530, связанного с нежностью и миостатина MSTN, ответственного за развитие скелетной мускулатуры. Выявлено преобладание частоты одного генотипа над другими.

Крупный рогатый скот, генетические маркеры, тиреоглобулин (TG), калпайн CAPN1 530, миостатин MSTN

ANALYSIS OF QUANTITATIVE TRAIT LOCI (QTLS) ON THE MARKER TG, CAPN1 530, MSTN ANIMALS CATTLE. Kopylov K. V., Dubin A. V., Podoba J. V., Mostova I. V., Dobrjanska M. L.

Conducted genetic analysis of animals of different breeds of cattle in the genes-markers, which are responsible for quality meat – thyroglobulin TG associated with marbling, calpain CAPN1 530 associated with tenderness and miostatin MSTN associated with the development of skeletal muscle. Revealed the predominance of one genotype frequencies over others.

Cattle, genes-markers, thyroglobulin TG, calpain CAPN1 530, miostatin MSTN

УДК 636.92

Г. А. КОЦЮБЕНКО, Є. М. РЯСЕНКО

Інститут розведення і генетики тварин НААН

ВПЛИВ ГЕНОТИПОВИХ ТА ПАРАТИПОВИХ ФАКТОРІВ НА ВІДТВОРЮВАЛЬНУ ЗДАТНІСТЬ КРОЛИЦЬ РІЗНИХ ПОРІД



Вивчено вплив різних факторів на відтворювальну здатність кролиць. Встановлено вірогідний вплив генотипу на багатоплідність та масу кроленят при відлученні, а також вплив паратипових факторів на збереженість гнізда.

Кролі, генотип, жива маса, відтворення

Кролівництво – галузь тваринництва, яка може вирішити м'ясну та хутрову проблеми країни. Швидкому відтворенню та подальшому розвитку галузі сприяють виняткові біологічні та господарські корисні особливості кролів, зокрема висока плідність, скоростиглість, оплата кормів, невибагливість до умов утримання, доступність догляду та ефективне використання поширеного асортименту кормів. Жодний вид тварин не може зрівнятися з кролями за енергією збільшення живої маси [1].

© Г. А. Коцюбенко, Є. М. Рясенко, 2011

Розведення і генетика тварин. 2011. № 45