

Наталія Борисівна Мохначова,

кандидат сільськогосподарських наук, старший дослідник

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця Національної академії аграрних наук України, Україна

orcid.org/0000-0001-5982-6542, e-mail: nataliia.mokhnachova82@gmail.com

ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ПОПУЛЯЦІЇ УКРАЇНСЬКОЇ АБОРИГЕННОЇ ЛЕБЕДИНСЬКОЇ ПОРОДИ КОРІВ

Анотація. В статті представлені результати дослідження структурних генів в популяції української аборигенної лебединської породи корів, які асоціюються з молочною продуктивністю: *CSN2* (бета-казеїн), *CSN3* (капа-казеїн), *BLG* (бета-лактоглобулін). Ці гени кодують білки молока та є важливими генетичними факторами, які впливають на якість та склад молока корів. Вивчення генетичної структури аборигенних порід ВРХ є важливим для розуміння еволюції та розподілу генофонду тварин. Це може бути корисним для збереження цих порід, а також для покращення їх продуктивності та пристосування до змін у навколишньому середовищі.

Всього було досліджено поліморфізм 3 гени (*CSN2*, *CSN3*, *BLG*). Для дослідження використали 32 зразки ДНК, виділеної із венозної крові корів лебединської породи за допомогою набору «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens). Генотипування проводили використовуючи аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР-ПДРФ). Ампліфікований фрагмент *CSN2* (121 п.н.) обробляли ферментом рестрикції *DdeI*. Особливістю аельного спектру гена бета-казеїна у вивчених тварин є значне переважання алеля *A1* (0,75). Тварин з генотипом *A2A2* виявлено не було. Для гена *CSN3* ампліфікований фрагмент розміром 273 п.н. обробляли рестриктазою *HinfI*. Встановлено відсутність тварин з генотипом *CSN3^{BB}* та високу частоту алеля *A* (0,81). При дослідженні гена *BLG* продукт ампліфікації (247 п.н.) обробляли ферментом рестрикції *HaeIII*. Виявлено, що частіше зустрічався алель *B* (0,77) та генотип *BLG^{BB}* (0,7).

Виявлені особливості аельного спектру генів *CSN2* (*A2-0,25*), *CSN3* (*A-0,81*), *BLG* (*B-0,77*), які характерні для дослідженої популяції української аборигенної лебединської породи корів. Результати дослідження є цінними у зв'язку з різким скороченням чисельності місцевих аборигенних популяцій і виникнення загрози зникнення власних генетичних ресурсів сільськогосподарських видів.

Ключові слова: корови, аборигенна порода корів, лебединська порода, поліморфізм, гени, капа-казеїн, бета-казеїн, бета-глобулін, алель.

ВСТУП

Збереження генетичних ресурсів набуло величезного значення для усього світу та України в тому числі. Захист породного різноманіття є необхідним для сталого розвитку сільського господарства, вирішення глобальних проблем продовольчої безпеки, розвитку нових ринків, зменшення екологічних проблем, є захистом від невідомих сьогодні селекційних, природних та інших ризиків. Особливе значення для тваринництва України мають вітчизняні генофонди аборигенних порід великої рогатої худоби, які витісняються комерційними породами [1].

Лебединська порода великої рогатої худоби – це аборигенна українська порода корів. Була виведена в Україні поблизу м. Лебедин Сумської області, звідки й походить назва

породи. Створена методом відтворного схрещування корів сірої української породи з бугаями швіцької породи. Як породу затверджено 1950 року. Весь цей час селекційно-племінна робота з лебединською породою здійснювалася за рахунок внутрішніх резервів України. Породі властива низка цінних господарських ознак: адаптованість до місцевості та кормових умов, витривалість і загальна резистентність, скоростиглість і високі показники приросту маси. Ці ознаки визначають особливу цінність породи, як носія спадкових якостей і генних комплексів [2]. Лебединська порода – це унікальна українська порода, яка є джерелом унікальних властивостей, закріплених у генотипі. Дослідження цієї породи є важливим для збереження генофонду української великої рогатої худоби.

Ген бета-казеїну відповідає за синтез β -казеїну. Найбільш поширеними варіантами β -казеїну у молочних порід великої рогатої худоби є *A1* та *A2*. Саме білок *A1* все частіше називають основною причиною непереносимості молочних продуктів [3–5]. Ген капа-казеїну пов'язують з білковомолочністю та технологічними властивостями молока. Для алеля *CSN3^B* встановлена кореляція з більшим вмістом білку в молоці і виходом сиру. Бета-лактоглобулін (*BLG*) – ген сироваткового білку молока. Алель *BLG^B* асоціюється з високим вмістом казеїнових білків, високим відсотком жиру та покращує характеристики казеїнового згустку [6; 7].

Метою роботи було дослідити поліморфізм генів: бета-казеїну (*CSN2*), капа-казеїну (*CSN3*), бета-лактоглобуліну (*BLG*) в популяції лебединської аборигенної породи великої рогатої худоби.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Було досліджено зразки крові від дійних корів лебединської породи з господарства ПГ «Голосієво» ($n=32$) Київської області, Україна (Рис. 1). Молекулярно-генетичні дослідження проводились на базі лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН.

Зразки крові відбирали з яремної вени в об'ємі 5 мл в вакуумні пробірки з сухим ЕДТА. Геномну ДНК виділяли згідно зі стандартною методикою, використовуючи комерційний набір «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens). Концентрацію ДНК доводили до 50 нг/мкл. Поліморфізм генів *CSN2*, *CSN3* та *BLG* досліджували методом ПЛР-ПДРФ. Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації та назви рестриктаз для рестрикції продуктів ампліфікації показано в таблиці 1.



Рисунок 1. Корова лебединської породи ПГ «Голосієво» Київська обл.

Таблиця 1

Нуклеотидні послідовності праймерів та рестриктази

Послідовність праймера	Ампліфікат, (п.н.)	Рестриктаза	Посилання
CSN2			
F:5'-CCTTCTTTCCAGGATGAACTCCAG-3' R:5'- AGTACGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT-3'	121	<i>DdeI</i>	McLachlan et al., 2006[8]
CSN3			
F:5'-GAAATCCCTACCATCAATACC-3' R:5'-CCATCTACCTAGTTTAGATG -3'	273	<i>HinfI</i>	Pinder et al., 1991[9]
βLG			
F:5'-TGTGCTGGACACCGACTACAAAAAG-3' R:5'-GCTCCCGGTATATGACCACCCTCT-3'	247	Hae III	Medrano et al., 1990 [10]

Умови ПЛР та схеми рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації поліморфних ділянок досліджуваних генів в таблиці 2.

Таблиця 2

Характеристика умов ПЛР та схеми ПДРФ-аналізу продуктів ампліфікації

Поліморфізм	Умови ампліфікації	Генотипи та відповідні довжини рестрикційних фрагментів
<i>CSN2- DdeI</i>	94°C-4 хв; (95°C- 15с; 56°C- 15с;72°C- 60с) x35; 72° -5 хв	<i>CSN2- DdeI^{A1A1}</i> :121; <i>CSN2- DdeI^{A2A2}</i> :86+35; <i>CSN2- DdeI^{A1A2}</i> :121+86+35;
<i>CSN3- HinfI</i>	95°C-4 хв; (95°C- 15с; 58°C- 15с;72°C- 60с) x35; 72° -10 хв	<i>CSN3- HinfI^{BB}</i> :224+49; <i>CSN3- HinfI^{AA}</i> :133+91+49; <i>CSN3-HinfI^{AB}</i> :224+133+91+49;
<i>BLG- Hae III</i>	94°C-4 хв; (95°C- 15с; 61°C- 15с;72°C- 60с) x35; 72° -10 хв	<i>BLG- Hae III^{AA}</i> :148+99; <i>BLG- Hae III^{BB}</i> :99+74; <i>BLG- Hae III^{AB}</i> :148+99+74;

Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 2 мкл буфера для ДНК полімерази, 1,0 мкл суміші дНТФ (*AmpliSens*), 1,0 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази (*Fermentas*). Генотипна ДНК додавалась у кількості 2,0 мкл, решта ddH₂O. Загальний об'єм ДНК-суміші становив 10 мкл. Ампліфікацію ДНК проводили на програмуваному чотирьохканальному термоциклері ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ДНК-технологія). Прилад виконаний у вигляді єдиного модуля, що об'єднує 4 незалежно керованих термоблока. В кожному термоблоці встановлена матриця на 10 пробірок об'ємом 0,5 мл.

Продукти ПЛР обробляли специфічними рестрикційними ферментами: до 10 мкл ПЛР-продукту додавали 5 од./мкл рестриктази та 1,5 мкл рестрикційного буферу, інкубували при 37 °С 12 год. Візуалізацію результатів проводили в 2-3% агарозному гелі з бромистим етидієм. у 1хTBE-буфері при постійній напрузі 100 В протягом 90 хв, з наступною детекцією за допомогою транслюмінатора ТУВ-1 в ультрафіолетовому світлі 312 нм. В якості маркерів молекулярних мас використовували *GeneRuler TM 50 bp*

DNA Ladder та Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Аналіз результатів проводили, фотографуючи гелі цифровою камерою.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного пакету Statistica 6.0 та Exel (Microsoft Office 2007).

РЕЗУЛЬТАТИ

В популяції лебединської аборигенної породи ВРХ було досліджено 3 локуси (*CSN2*, *CSN3*, *BLG*), які є генами-кандидатами молочної продуктивності. Гени вибрані так, щоб проаналізувати молочну характеристику, як одну з найголовніших господарсько-корисних ознак.

Локус *CSN2*

Аналіз результатів генотипування (Рис. 1) дослідженого поголів'я встановив поліморфізм за геном бета-казеїну (*CSN2*) у вигляді наявності двох алельних станів: *CSN2*^{A1} і *CSN2*^{A2}. Так, частота «бажаного» алеля А2 (0,25) у тварин лебединської породи, у 3 рази була нищою, від частоти алеля А1 (0,75). Це знайшло своє відображення в частоті генотипів *CSN2*^{A1A1} та *CSN2*^{A2A1}, які зустрічалися в однаковій кількості тварин – 16 гол. і 16 гол., відповідно. Тварин з генотипом *CSN2*^{A2A2} – в даній вибірці виявлено не було.

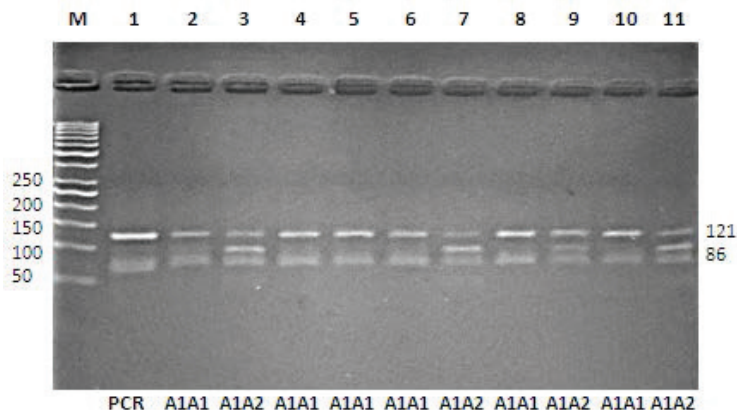


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за геном *CSN2*: М – маркер молекулярних мас; генотипи тварин вказані під фото

Оцінка ступеня генетичної різноманітності виявила, що показник гомозиготності за геном бета-казеїну у вивчених тварин знаходився на рівні 50%, тобто 16 голів.

Значення фактичної рівноваги у тварин лебединської породи ВРХ на 0,125 перевищує теоретично очікувану (Табл. 3). Відповідно до закону Харді-Вайнберга, за локусом бета-казеїну у дослідженій вибірці тварин порушена генетична рівновага.

Локус *CSN3*

У дослідженій групі тварин лебединської породи з господарства ПГ «Голосієво» Київської області спостерігали поліморфізм за геном капа-казеїну (Рис. 2). Так в результаті генотипування виявлено тварин двох генотипів *CSN3*^{AA} та *CSN3*^{AB}. Найбільша кількість тварин – 20 голів із 32 досліджуваних – носії гомозиготного

генотипу $CSN3^{AA}$ капа-казеїну (62%). В їх молоці присутній тільки один варіант білку – А. Решта корів (12 голів) гетерозиготні – $CSN3^{AB}$ (Табл. 4).

Таблиця 3

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		χ^2	F_{IS}
		A1A1	A1A2	A1	A2	H_0	H_E		
Лебединська	32	A1A1	0,5	0,75±0,021	0,25±0,021	0,5	0,375	2,22	-0,33
		A1A2	0,5						
		A2A2	-						

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

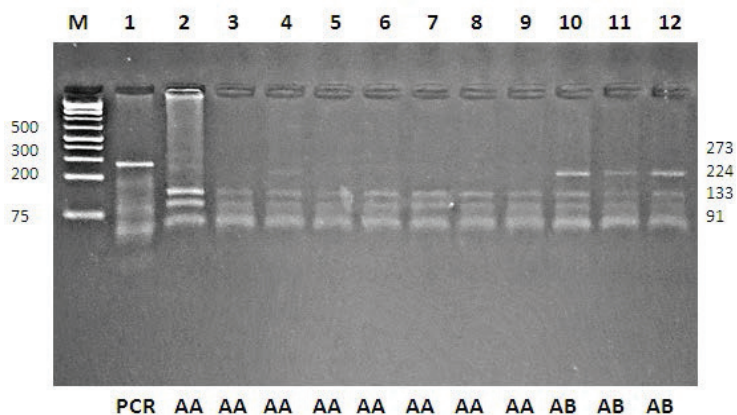


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за геном $CSN3$: М – маркер молекулярних мас; генотипи тварин вказані під фото

Частота алелю А складає 0,81, що у 4,26 рази перевищує частоту алелю В, який пов'язують з більшим вмістом білку в молоці і виходом сиру. Алель $CSN3^B$ в досліджених тварин зустрічається з частотою 0,19 (таблиця 4).

Таблиця 4

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		χ^2	F_{IS}
		AA	AB	A	B	H_0	H_E		
Лебединська	32	AA	0,62	0,81±0,03	0,19±0,03	0,380	0,308	0,75	-0,235
		AB	0,38						
		BB	-						

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

За порівняння значень фактичної і теоретичної гетерозиготності у вивченій вибірці тварин відмічено, що фактична гетерозиготність на 0,072 перевищувала теоретичну, проте, різниця є статистично незначущою ($\chi^2=0,75$). За результатами дослідження показник гомозиготності за геном капа-казеїну склав 62%.

Локус βLG

Показники аельного поліморфізму за геном бета-лактоглобуліну корів лебединської породи наведені в таблиці 5. За допомогою фермента рестрикції *Hae III* виявлено наявність двох алелів А і В та трьох генотипів АА (асоційований із синтезом білку А бета-глобуліну), АВ (цей генотип має неповне домінування, при ньому синтезується бета-глобуліновий білок, що характеризується проміжними властивостями і поєднує властивості варіантів А і В білків бета-лактоглобуліну) і ВВ (асоціюється з експресією білку В бета-лактоглобуліну) (Рис. 3).

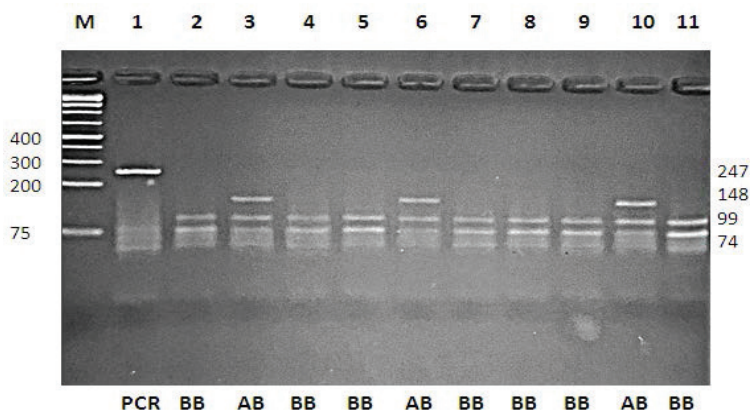


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за геном βLG : М – маркер молекулярних мас; генотипи тварин вказані під фото

За результатами дослідження розподілу генотипів бета-лактоглобуліну серед 32 голів ПГ «Голосієво» Київської області 22 корови (70%) є гомозиготними за алелем В та по 5 корів були носіями гомозиготного за А-алелем генотипу АА (15%) і гетерозиготного АВ-генотипу (15%). Дослідження частоти алелів виявило, що у тварин вивченої вибірки лебединської породи у 3 рази переважає алель В бета-лактоглобуліну (77%). Частота алелю А складає 23% відповідно.

Таблиця 5

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		χ^2	F_{IS}
		АА	АВ	А	В	H_0	H_E		
Лебединська	32	0,15	0,15	0,23±0,021	0,77±0,021	0,150	0,349	6,50*	0,570
		ВВ	0,7						

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_E – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності; * – достовірність ($P<0,05$)

При порівнянні значень фактичної і теоретично очікуваної гетерозиготності за геном βLG досліджених тварин лебединської породи відмічено дворазове переважання теоретично очікуваної гетерозиготності над фактичною. Це є наслідком високого рівня гомозиготності, який становив 85%. Також за вивченим геном βLG виявлене достовірне зміщення генетичної рівноваги $\chi^2=6,50$ ($P<0,05$).

ВИСНОВКИ

В результаті дослідження 3 локусів, які пов'язані з молочною продуктивністю, виявлені особливості розподілу алельних варіантів вивчених генів у популяції корів аборигенної лебединської породи. Аналізом результатів генотипування корів лебединської породи встановлено, що поліморфізм генів $CSN2$, $CSN3$ та BLG представлений двома алелями $CSN2^{A1}$ і $CSN2^{A2}$, $CSN3^A$ і $CSN3^B$, BLG^A і BLG^B . Генетична структура лебединської породи характеризувалася високою концентрацією цінних з селекційної точки зору алельних варіантів: $CSN2^{A2}$ (0,25), $CSN3^A$ (0,81), BLG^B (0,77). Це свідчить, що досліджені тварини лебединської породи великої рогатої худоби продемонстрували порівняно високий рівень генетичного різноманіття для цієї невеликої і географічно ізольованої породи. Отримані результати можуть бути використані як додатковий інструмент в селекційних програмах та програмах із збереження генофонду лебединської породи великої рогатої худоби.

ЛІТЕРАТУРА

1. Voitenko, S.L., Porkhun, M., Sydorenko, O., Ilnytska, T. Genetic resources of agricultural animals of Ukraine at the beginning of the third millennium. *Animal Breeding and Genetics*. 2019. № 58. P. 110–119.
2. Ladyka, V.I., Sklyarenko, Yu.I., & Pavlenko, Yu.M. Characteristics of the genetic structure of lebedinian breed bulls for the kappa-casein gene ($CSN3$). *Animal Breeding and Genetics*. 2018. № 56. P. 157–161.
3. Kaminski, S., Cieslinska, A., Kostyra, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J. Appl. Genet.* 2007. № 48. P. 189–198.
4. Haq, M.R., Kapila, R., Sharma, R., Saliganti, V., Kapila, S. Comparative evaluation of cow (3-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. *Eur J Nutr.* 2014. № 53(4). P. 1039–1049.
5. Parashar, A., Saini, R.K. A1 milk and its controversy-a review. *International Journal of Bioassays*. 2015. № 4. P. 4611–4619.
6. Gregorio, P., Grigoli, A., Trana, A., Alabiso, M., Maniaci, G., Rando, A., Valluzzi, C., Finizio, D., Bonanno, A. Effects of different genotypes at the $CSN3$ and LGB loci on milk and cheese-making characteristics of the bovine Cinisara breed. *International Dairy Journal*. 2017. № 71. P. 1–5.
7. Zepeda-Batista, J.L., Saavedra-Jiménez, L.A., Ruíz-Flores A., Núñez-Domínguez, R., Ramírez-Valverde, R. Potential influence of κ -casein and β -lactoglobulin genes in genetic association studies of milk quality traits. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 2017. № 30(12). P. 1684–1688.
8. McLachlan, C.N. Breeding and milking cows for milk free of β -casein A1. Patent US No. 7094949. 2006.
9. Pinder, S.J., Perry, B.N., Skidmore, C.J., Savva, D. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of polymerase chain reaction. *Animal Genetics*. 1991. № 22(1). P. 11–20.
10. Medrano, J.F., Aquilar-Cordova, E. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology*. 1990. № 1(1). P. 73–77.

REFERENCES

1. Voitenko, S.L., Porkhun, M., Sydorenko, O., Ilnytska, T. (2019). Genetic resources of agricultural animals of Ukraine at the beginning of the third millennium. *Animal Breeding and Genetics*, 58, 110–119. doi: 10.31073/abg.58.15 [in Ukrainian]
2. Ladyka, V.I., Sklyarenko, Yu.I., & Pavlenko, Yu.M. (2018). Characteristics of the genetic structure of lebedinian breed bulls for the kappa-casein gene (CSN3). *Animal Breeding and Genetics*, 56, 157–161. <https://doi.org/10.31073/abg.56.21> [in Ukrainian]
3. Kaminski, S., Cieslinska, A., Kostyra, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J. Appl. Genet.*, 48, 189–198. doi: 10.1007/BF03195213.
4. Haq, M.R. Kapila, R., Sharma, R., Saliganti, V., Kapila, S. (2014). Comparative evaluation of cow (3-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. *Eur J Nutr*, 53(4), 1039–1049. doi: 10.1007/J100394-013-0606-7.
5. Parashar, A., Saini, R.K. (2015). A1 milk and its controversy-a review. *International Journal of Bioassays*, 4, 4611–4619. doi:10.21746/IJBIO.2015.12.007.
6. Gregorio, P., Grigoli, A., Trana, A., Alabiso, M., Maniaci, G., Rando, A., Valluzzi, C., Finizio, D., Bonanno, A. (2017). Effects of different genotypes at the CSN3 and LGB loci on milk and cheese-making characteristics of the bovine Cinisara breed. *International Dairy Journal*, 71, 1–5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.001>.
7. Zepeda-Batista, J.L., Saavedra-Jiménez, L.A., Ruíz-Flores, A., Núñez-Domínguez, R., Ramírez-Valverde, R. (2017). Potential influence of κ -casein and β -lactoglobulin genes in genetic association studies of milk quality traits. *Asian-Australas J. Anim. Sci.*, 30(12), 1684–1688. doi: 10.5713/ajas.16.0481.
8. McLachlan, C.N. (2006). Breeding and milking cows for milk free of β -casein A1. Patent US No. 7094949.
9. Pinder, S.J., Perry, B.N., Skidmore, C.J., Savva, D. (1991). Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of polymerase chain reaction. *Animal Genetics*, 22(1), 11–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1991.tb00642.x>.
10. Medrano, J.F., Aquilar-Cordova, E. (1990). Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology*, 1(1), 73–77. <https://doi.org/10.1080/10495399009525730>.

ABSTRACT

STUDY OF THE GENETIC STRUCTURE OF THE POPULATION OF THE UKRAINIAN INDIGENOUS LEBEDYN BREED OF COWS

The article presents the results of the study of structural genes in the population of the Ukrainian indigenous Lebedyn breed of cows, which are associated with milk productivity: CSN2 (beta-casein), CSN3 (kappa-casein), BLG (beta-lactoglobulin). These genes encode milk proteins and are important genetic factors that influence the quality and composition of cows' milk. Studying the genetic structure of aboriginal breeds of cattle is important for understanding the evolution and distribution of the animal gene pool. This can be useful for the conservation of these breeds, as well as for improving their performance and adaptation to environmental changes.

A total of 3 gene polymorphisms (CSN2, CSN3, BLG) were investigated. For the research, 32 samples of DNA isolated from the venous blood of Swan breed cows using the "DNA Sorb-B" kit (AmpliSens) were used. Genotyping was performed using polymerase chain reaction (PCR-PCR) polymorphism analysis of restriction fragment lengths. The amplified fragment of CSN2 (121 bp) was treated with DdeI restriction enzyme. A feature of the allelic spectrum of the beta-casein gene in the studied animals is the significant predominance of the A1 allele (0.75). No animals

with the A2A2 genotype were found. For the CSN3 gene, an amplified fragment with a size of 273 bp. treated with *Hinf*I restriction enzyme. The absence of animals with the CSN3^{BB} genotype and a high frequency of the A allele (0.81) were established. When studying the BLG gene, the amplification product (247 bp) was treated with the restriction enzyme *Hae*III. It was found that allele B (0.77) and genotype BLG^{VV} (0.7) were more common.

Features of the allelic spectrum of CSN2 (A2-0.25), CSN3 (A-0.81), BLG (B-0.77) genes, which are characteristic of the studied population of the Ukrainian indigenous Lebedyn breed of cows, were revealed. The results of the study are valuable in connection with the sharp reduction in the number of local indigenous populations and the threat of extinction of the own genetic resources of agricultural species.

Key words: cows, indigenous breed of cows, Lebedyn breed, polymorphism, genes, kappa-casein, beta-casein, beta-globulin, allele.