



ĐA HÌNH GEN LEPTIN VÀ THYROGLOBULIN LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH TRẠNG NĂNG SUẤT VÀ CHẤT LƯỢNG THỊT Ở TỔ HỢP BÒ LAI SENEPOL × LAI BRAHMAN NUÔI TẠI TỈNH THỪA THIÊN HUẾ

Hồ Lê Quỳnh Châu*, Dương Thị Hương, Thân Thị Thanh Trà, Đinh Văn Dũng

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Hồ Lê Quỳnh Châu <hochauhuaf@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 24-3-2023; Ngày chấp nhận đăng: 7-6-2023)

Tóm tắt. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá đa hình đoạn intron 2 của gen Leptin (LEP) (g.1926C>T) và vùng 5'UTR của gen thyroglobulin (TG) (g.422C>T) ở tổ hợp bò lai Senepol × lai Brahman nuôi tại tỉnh Thừa Thiên Huế. Kết quả đánh giá đa hình gen LEP/*Sau3AI* và TG5/*PsuI* trên 30 mẫu DNA bằng kỹ thuật PCR-RFLP cho thấy có sự đa hình về kiểu gen LEP/*Sau3AI*; tần số alen A liên quan đến các tính trạng năng suất và sức sinh sản cao là chủ yếu (0,92). Năm trong số 30 con bò mang alen B liên quan đến tỷ lệ mỡ trong thân thịt cao được phát hiện ở xã Điền Môn. Ngược lại, cả 30 con bò khảo sát đều mang kiểu gen TG5/*PsuI* dị hợp tử (CT). Do đó, để xác định chính xác hơn tính đa hình của gen TG5/*PsuI* trên tổ hợp bò lai Senepol × lai Brahman, cần tăng số lượng mẫu khảo sát và tiếp tục chọn lọc để tăng tần số alen T liên quan đến chỉ số vân mỡ cao trong thịt bò. Các kết quả nghiên cứu này cung cấp những thông tin di truyền ở cấp độ phân tử đầu tiên trên tổ hợp bò lai Senepol × lai Brahman nuôi tại tỉnh Thừa Thiên Huế và là cơ sở cho những nghiên cứu chọn lọc tiếp theo nhằm nâng cao chất lượng bò thịt.

Từ khoá: bò lai, đa hình, gen leptin, gen thyroglobulin, PCR-RFLP, Senepol

Polymorphisms of leptin and thyroglobulin genes related to carcass and meat quality traits in Senepol × lai Brahman crossbred cows in Thua Thien Hue province

Ho Le Quynh Chau*, Duong Thi Huong, Than Thi Thanh Tra, Dinh Van Dung

University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Ho Le Quynh Chau <hochauhuaf@hueuni.edu.vn>

(Submitted: March 24, 2023; Accepted: June 7, 2023)

Abstract. This study was conducted to evaluate the polymorphisms in the intron 2 of leptin (LEP) gene (g.1926C>T) and in the 5'UTR of thyroglobulin (TG) gene (g.422C>T) in Senepol × lai Brahman crossbred cows raised in Thua Thien Hue province. The results of evaluating LEP and TG gene polymorphisms on 30 DNA samples with the PCR-RFLP technique show that the LEP/*Sau3AI* gene is polymorphic in the Senepol × lai Brahman crossbred cows, with the A allele related to high production and reproduction traits as the dominant allele (0.92). Five over 30 cows carried allele B related to high-fat yield percentage, and all were raised in Dien Mon commune. In contrast, all 30 studied cows carried heterozygous TG/*PvuI* genotype (CT). More DNA samples should be analysed to confirm the polymorphism of the TG5/*PvuI* gene in this crossbred cattle in Thua Thien Hue province, and further selection is needed to increase the frequency of the T allele related to a high marbling score of beef. These results are informative for further breeding of Senepol × lai Brahman crossbred cows.

Keywords: crossbred cow, PCR-RFLP, polymorphism, leptin gene, Senepol, thyroglobulin gene

1 Đặt vấn đề

Năng suất và chất lượng thịt là các chỉ số rất quan trọng quyết định hiệu quả của ngành chăn nuôi bò thịt. Chất lượng thịt bò được đánh giá dựa trên nhiều chỉ tiêu, trong đó có tỷ lệ mỡ giắt, độ mọng nước, màu sắc, hương vị và độ mềm [1]. Sự tích lũy mỡ giắt trong cơ ở bò thịt chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như di truyền, dinh dưỡng và quản lý [2–4]. Việc cải thiện tiềm năng di truyền chất lượng thịt bò có thể thực hiện bằng chọn lọc dựa trên các chỉ thị phân tử liên quan trực tiếp đến quá trình trao đổi lipid ở động vật, chẳng hạn như gen leptin (LEP) và thyroglobulin (TG), hai gen liên quan đến tính trạng năng suất và chất lượng thịt.

Leptin là một loại hormone được các tế bào mỡ sản xuất, đóng vai trò quan trọng trong quá trình tích lũy lipid, tham gia vào việc điều khiển tập tính dinh dưỡng và ảnh hưởng đến hoạt động của hệ thống miễn dịch và sinh sản, cũng như kích thích của động vật. Gen LEP nằm trên nhiễm sắc thể (NST) số 4, có kích thước 16.735 bp, chứa 3 exon và 2 intron. Toàn bộ vùng mã hoá của gen LEP (gồm 501 nucleotide) nằm trên exon 2 và exon 3; hai exon này được ngăn cách bởi đoạn intron có kích thước 2 kb [5]. Đa hình nucleotide đơn (SNP) LEP/*Sau3AI* (g.1926C>T) xuất hiện trên đoạn intron 2 [6] làm thay đổi amino acid ở vị trí 2059 của chuỗi protein (arginine thành cysteine) [7, 8]. SNP LEP/*Sau3AI* đã được sử dụng để chọn lọc phân tử các tính trạng như năng suất sữa [7, 8], năng suất sinh sản [9–11], trọng lượng cơ thể [12–14], tỷ lệ mỡ [15] và lượng thức ăn thu nhận [16].

Gen TG được xem là một gen dự tuyển cho vị trí tính trạng số lượng, ảnh hưởng đến sự tích lũy lipid ở gia súc. Gen TG nằm trên NST số 14, kích thước ít nhất là 300 kb và chứa 37 exon mã hoá 8,7 kb mRNA [17]. Sự thay đổi nucleotide g.422C>T ở vùng 5' không dịch mã (5'UTR) của

gen TG (TG5) đã được báo cáo có liên quan đến lượng mỡ giết ở bò thịt [18]. SNP ở vị trí g.422C>T trên gen TG5 của bò được sử dụng để chọn lọc phân tử chỉ số vân mỡ [19–21], tỷ lệ mỡ [15] và độ dày mỡ lưng [22–24] ở một số giống bò thịt. Tuy vậy, nghiên cứu của Putra và cs. lại cho thấy vùng 5'UTR của gen TG trên bò Pasundan là đơn hình, chỉ tồn tại alen C; bên cạnh đó, đa dạng di truyền ở vùng intron 2 của LEP/*Sau3AI* rất thấp. Trên cơ sở đó, nhóm tác giả cho rằng không thể sử dụng SNP TG5/BstYI và LEP/*Sau3AI* làm chỉ thị phân tử trong việc chọn lọc bò Pasundan [6]. Như vậy, việc nhận dạng đặc điểm di truyền của hai gen này trên từng nhóm bò thịt là rất cần thiết.

Trong những năm gần đây, một số tổ hợp bò đang được phát triển tại tỉnh Thừa Thiên Huế, chẳng hạn như lai Senepol, lai Brahman, lai Red Angus và lai BBB. Bò lai Senepol là tổ hợp bò được tạo ra bằng phương pháp thụ tinh nhân tạo giữa tinh bò Senepol với bò cái nền lai Brahman tại địa phương. Một số thông tin bước đầu cho thấy bê lai Senepol dễ nuôi, xương nhỏ, cơ bắp phát triển, thịt chắc, khả năng cho tỷ lệ thịt xẻ cao hơn so với con lai Brahman [25]. Với mục tiêu hướng đến phát triển một nền sản xuất hàng hóa bền vững, việc tiếp tục phát triển các giống bò thịt cho năng suất cao và chất lượng tốt là rất cần thiết. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định tính đa hình của các gen LEP/*Sau3AI* và TG5/*PsuI* ở tổ hợp bò lai Senepol × lai Brahman được nuôi ở Thừa Thiên Huế, từ đó cung cấp thêm thông tin cho các chương trình chọn lọc bò thịt chất lượng cao dựa trên chỉ thị phân tử.

2 Phương pháp

2.1 Thu mẫu

Phường Thuỷ Phương, thị xã Hương Thuỷ, và xã Điền Môn, huyện Phong Điền, có số lượng bò lai Senepol cao trong tỉnh Thừa Thiên Huế. Chính vì vậy, đây là các địa phương được lựa chọn để tiến hành thu mẫu. Tổng số 30 mẫu gốc lông được thu thập từ tổ hợp bò lai Senepol × lai Brahman nuôi ở các hộ chăn nuôi (15 mẫu/xã hoặc phường). Số lượng gốc lông thu được ở mỗi con bò tối thiểu là 30. Sau đó, các mẫu gốc lông được cho vào túi đựng mẫu, ký hiệu mã số và chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành tách chiết DNA tổng số.

2.2 Tách chiết DNA tổng số

Các mẫu gốc lông bò được tách chiết DNA tổng số [5, 26] bằng AccuRive sDNA/RNA Prep kit của KT Biotech (Việt Nam). Để tăng hiệu quả tách chiết DNA, các gốc lông được đồng hoá trong dung dịch đệm của bộ kit với sự trợ giúp của thiết bị Bullet blender (Next Advance) trong 5 phút. Sau đó tiến hành tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được đo bằng máy quang phổ Nanodrop (Thermo Scientific, USA).

2.3 Khuếch đại gen LEP và TG

Đoạn intron 2 của LEP và 5'UTR của TG được khuếch đại từ DNA tổng số với cặp primer đặc hiệu bằng kỹ thuật PCR trên máy luân nhiệt Axygen® MaxyGene™. Trình tự và kích thước các cặp primer được trình bày ở Bảng 1. PCR được thực hiện với các thành phần phản ứng sau: 50 ng DNA; 1,25 μM mỗi loại primer; 200 μM dNTP; 1× PCR buffer và 0,75 đơn vị Taq polymerase (Solgent, Hàn Quốc). Tổng thể tích phản ứng là 20 μL. Chương trình nhiệt của PCR được trình bày ở Bảng 2.

Sản phẩm PCR được nhuộm trực tiếp bằng thuốc nhuộm 6× GelRed (ABT, Việt Nam) và được phân tách bằng điện di trên gel agarose 2% trong đệm 0,5× TAE ở 100V trong 25 phút. Kết quả điện di được phân tích trên máy Gel Doc™ XR+ (Bio Rad, Mỹ).

2.3 Xác định đa hình đoạn intron 2 gen LEP và vùng 5'UTR gen TG

Sản phẩm PCR của đoạn intron 2 gen LEP được cắt bằng enzyme hạn chế *Sau3AI* [16]. Trong khi đó, sản phẩm PCR của đoạn gen TG5 được cắt bằng enzyme *PvuI* để tìm các điểm đa hình [27]. Hỗn hợp phản ứng cắt bao gồm 10 μL sản phẩm PCR, 1× buffer, 3 đơn vị enzyme hạn chế. Phản ứng cắt được tiến hành ủ qua đêm ở 37 °C. Kết quả phản ứng cắt hạn chế được kiểm tra bằng điện di hỗn hợp sau phản ứng trên gel agarose 2% trong đệm 0,5× TAE ở 100 V trong 25

Bảng 1. Trình tự các cặp primer đặc hiệu

Gen	SNP	Vị trí	Trình tự primer	Kích thước sản phẩm (bp)	GenBank	Nguồn tham khảo
LEP	g.1926C>T	Intron 2	5'- TGGAGTGGCTTGTTATTTCTCT -3'	422	EU313203	[16]
			5'- GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT -3'			
TG	g.422C>T	5'UTR	5'- GGGGATGACTACGAGTATGACTG -3'	545	AY615525.1	[19]
			5'- GTGAAAATCTTGTGGAGGCTGTA -3'			

Bảng 2. Chương trình nhiệt của PCR

Đoạn gen	Chu kỳ nhiệt	Nhiệt độ và thời gian
Intron 2 LEP	1 chu kỳ	94 °C trong 5 phút
	35 chu kỳ	94 °C trong 40 giây, 62 °C trong 40 giây, 72 °C trong 40 giây
	1 chu kỳ	72 °C trong 7 phút
TG5	1 chu kỳ	94 °C trong 5 phút
	35 chu kỳ	94 °C trong 40 giây, 55 °C trong 40 giây, 72 °C trong 40 giây
	1 chu kỳ	72 °C trong 10 phút

Bảng 3. Thông tin phản ứng cắt bằng enzyme hạn chế

Đoạn gen	Enzyme hạn chế	Trình tự cắt	Kiểu gen	Kích thước alen (bp)	Nguồn tham khảo
Intron 2 LEP	<i>Sau3AI</i>	5' ↓GATC 3'	AA	390, 32	[13]
		3' CTAG↑ 5'	AB	390, 303, 88, 32	
			BB	303, 88, 32	
TG5	<i>PvuI</i>	5' R↓GATCY 3'	CC	295, 178, 72	[18]
		3' YCTAG↑R 5'	CT	473, 295, 178, 72	
			TT	473, 72	

phút. Thang chuẩn 100 bp DNA (Solgent, Hàn Quốc) được sử dụng để xác định kích thước các đoạn DNA trên gel agarose. Kết quả điện di được phân tích trên máy Gel Doc™ XR+ (Bio Rad, Mỹ).

2.3 Xử lý thống kê

Các số liệu được quản lý bằng phần mềm Microsoft Excel và xử lý theo phương pháp thống kê sinh học.

– Tần số kiểu gen được tính theo công thức:

Tần số kiểu gen = Số cá thể mang kiểu gen tương ứng/Tổng số mẫu nghiên cứu

– Tần số alen được tính theo các công thức:

$$p = (2 \times AA + AB)/2 \times N \text{ và } q = (2 \times BB + AB)/2 \times N$$

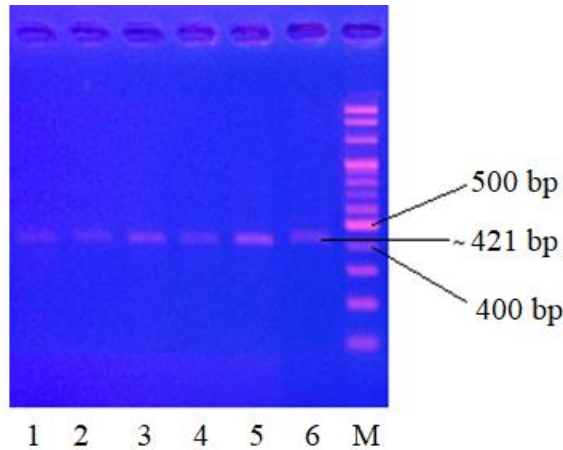
trong đó p là tần số alen A; q là tần số alen B; N là tổng số mẫu nghiên cứu.

3 Kết quả và thảo luận

Đa hình đoạn intron 2 của gen leptin

Kết quả khuếch đại gen intron 2 gen LEP trên nhiễm sắc thể số 4 từ DNA tổng số với cặp primer đặc hiệu cho thấy xuất hiện băng DNA duy nhất, rõ nét, với kích thước khoảng 422 bp (Hình 1). Như vậy, có thể nhận định rằng đã khuếch đại thành công đoạn intron 2 của gen LEP.

Kết quả điện di kiểm tra đa hình đoạn intron 2 của gen LEP trên 30 mẫu DNA của tổ hợp bò lai Senepol × lai Brahman nuôi tại Thừa Thiên Huế được trình bày trên Hình 2. Có hai kiểu gen AA và AB trên tổ hợp bò lai này. Tuy vậy, ở phường Thủy Phương, 15/15 mẫu DNA khảo sát mang kiểu gen LEP/*Sau3AI* đồng hợp tử AA; tần số alen A là 1,0 và alen B là 0 (Bảng 4). Trong khi đó, ở xã Điền Môn, 10/15 con bò lai Senepol × lai Brahman mang kiểu gen AA và 5/15 cá thể mang kiểu gen dị hợp tử AB. Tần số alen trên 15 cá thể bò lai Senepol × lai Brahman ở xã Điền



Hình 1. Kết quả khuếch đại đoạn Intron 2 của gen Leptin
1-6: sản phẩm PCR, M: thang chuẩn DNA 100bp

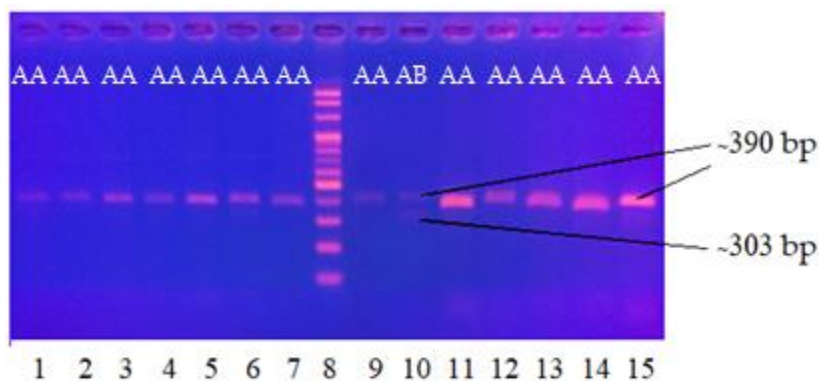
Môn là 0,83 đối với alen A và 0,17 đối với alen B. Tính chung cho cả 2 địa phương lấy mẫu, tần số alen A cao hơn nhiều so với alen B (0,92 so với 0,08).

Leptin là gen dự tuyển quan trọng liên quan đến các tính trạng sản xuất chủ yếu như độ dày mỡ lưng, lượng ăn vào, năng suất sinh sản, sản lượng sữa và chất lượng thịt [28, 29]. Một số kết quả nghiên cứu về đa hình gen *LEP/Sau3AI* trên bò sữa Hostein-Friesian của Jecminkova và cs. và Hussain và cs. cũng cho thấy có hai kiểu gen chủ yếu của gen *LEP* được xác định là AA và AB, tương tự kết quả trong nghiên cứu này [13, 30]. Các tác giả cũng đã chỉ ra rằng tần số của alen A cao hơn của alen B ở các tổ hợp bò địa phương, bò lai ở Irắc [13] và bò Hostein ở Iran, Irắc và Cộng hoà Séc [13, 29, 30]. Một số kết quả nghiên cứu trước đây trên bò Holstein Frisian [31], bò bản địa Iran, bò Holstein và Brown Thụy Sĩ [32], bò Sahiwal và Frieswal [33] hay Holstein [34] cũng cho kết quả tương tự kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Ngược lại, Yang và cs. đã báo cáo rằng trên gia súc bản địa của Trung Quốc, kiểu gen đồng hợp tử phổ biến nhất là BB và các cá thể mang kiểu gen BB có khả năng tăng trưởng vượt trội [35].

Kết quả nghiên cứu của Trakovicka và cs. về đa hình gen *LEP/Sau3AI* g.1926C>T trên 296 mẫu máu bò Slovak Spotted và 85 mẫu gốc lông bò Pinzgau đã chỉ ra rằng tần số alen A và B lần lượt là 0,838/0,162 và 0,694/0,306 [8]. SNP trên gen *LEP/Sau3AI* có tác động đáng kể đến sản lượng sữa và tuổi đẻ lứa đầu. Những con bò mang kiểu gen AA có sản lượng sữa, hàm lượng protein, chất béo trong sữa cao nhất và tuổi đẻ lứa đầu thấp nhất. Ngược lại, bò mang kiểu gen BB có sức sản xuất sữa thấp nhất. Bò mang kiểu gen dị hợp tử AB có tuổi đẻ lứa đầu lớn nhất [8]. Nghiên cứu của Sedykh và cs. cho thấy có mối liên quan đáng kể giữa đa hình gen *LEP/Sau3AI* trên intron 2 và năng suất thịt ở bê Hereford và Limousine. Thân thịt của bê Hereford và Limousine mang

Bảng 4. Kiểu gen và tần suất alen của gen LEP/Sau3AI trên tổ hợp bò lai Senepol × lai Brahman

Địa phương	Số mẫu	Tần số kiểu gen LEP/SAU3AI			Tần số ALEN	
		AA	AB	BB	A	B
Thủy Phương	15	15/15 (1,0)	0/15 (0,0)	0/15 (0,0)	1,0	0,0
Điền Môn	15	10/15 (0,67)	5/15 (0,33)	0/15 (0,0)	0,83	0,17
Tính chung	30	25/30 (0,83)	5/30 (0,17)	0/30 (0,0)	0,92	0,08



Hình 2. Đa hình đoạn Intron 2 của gen LEP/Sau3AI
1-7 và 9-15: kết quả cắt hạn chế; 8: thang chuẩn DNA 100bp

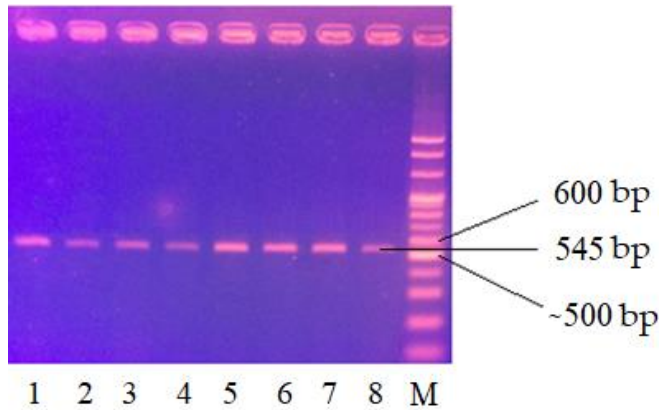
kiểu gen AB có tỷ lệ mỡ cao hơn so với bê mang kiểu gen AA [15].

Đa hình đoạn 5'UTR của gen thyroglobulin

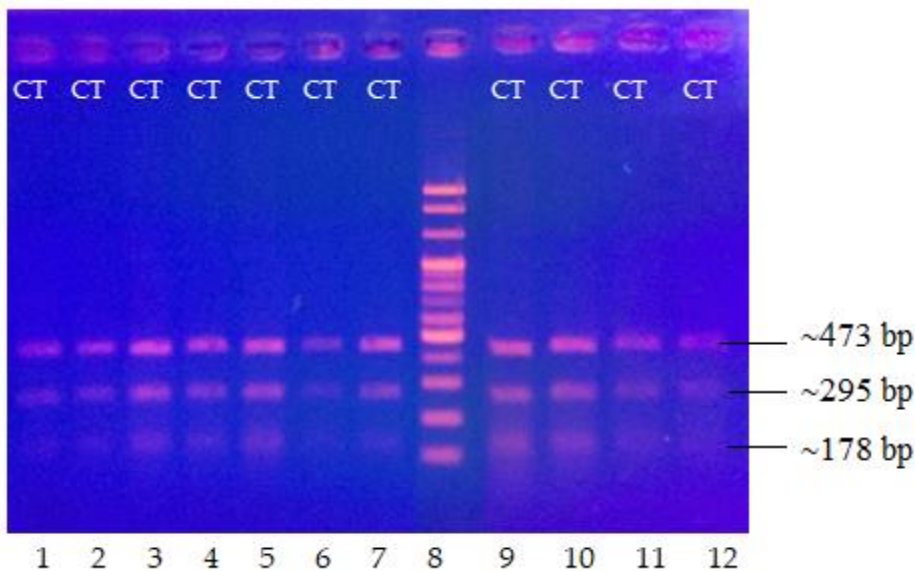
Kết quả khuếch đại gen TG5 trên DNA tổng số với cặp primer đặc hiệu cho thấy xuất hiện băng DNA duy nhất, rõ nét, với kích thước khoảng 545 bp (Hình 3). Như vậy, đoạn 5'UTR của gen TG đã được khuếch đại thành công. Kết quả đánh giá đa hình gen TG5/*PsuI* trên 30 mẫu DNA của tổ hợp bò lai Senepol × lai Brahman được trình bày trên Hình 4 và Bảng 5. Toàn bộ mẫu DNA khảo sát ở phường Thủy Phương và xã Điền Môn, tỉnh Thừa Thiên Huế, đều mang kiểu gen TG5/*PsuI* dị hợp tử (CT), tần số alen C là 0,5 và alen T là 0,5. Không thấy cá thể nào trong 30 con bò lai khảo sát mang kiểu gen đồng hợp CC hay TT. Để đánh giá chính xác hơn tính đa hình của gen TG5/*PsuI* trên tổ hợp bò lai Senepol × lai Brahman, cần tăng số lượng mẫu khảo sát.

Như đã biết, thyroglobulin tác động chủ yếu đến hàm lượng lipid ở cơ thăn [36]. Nghiên cứu của Thaller và cs. về đa hình TG5/*PsuI* trên bò Holstein Đức và Charolais cho thấy những con bò mang kiểu gen đồng hợp tử TT có hàm lượng lipid trong cơ thăn cao hơn đáng kể so với những cá thể mang kiểu gen CT hoặc CC [36]. Kết quả nghiên cứu của Burrell và cs. cũng chỉ ra

rằng bò thịt mang kiểu gen TT có vân mỡ cao hơn so với kiểu gen CC và CT [37]. Tương tự, Barendse và cs. cũng đã công bố rằng tần số alen T cao ở những con bò có độ vân mỡ cao và kiểu gen TT là kiểu gen duy nhất cho thấy sự khác biệt về sự phân bố của vân mỡ, gia tăng vân mỡ ở thịt bò [20]. Như vậy, có thể thấy rằng cần chọn lọc tiếp để tăng tần số alen T của gen TG5/*PsuI* trên bò lai Senepol × lai Brahman ở phường Thủy Phương và xã Điền Môn, tỉnh Thừa Thiên Huế, nhằm nâng cao tỷ lệ mỡ giết trong thân thịt của tổ hợp bò lai này.



Hình 3. Kết quả khuếch đại đoạn 5'UTR của gen TG5
1-8: sản phẩm PCR, M: thang chuẩn DNA 100bp



Hình 4. Kết quả cắt đoạn 5'UTR của gen TG bằng enzyme hạn chế *PsuI*
1-7 và 9-12: kết quả cắt hạn chế, 8: thang chuẩn DNA 100bp

Bảng 5. Kiểu gen và tần suất ALEN của gen TG trên tổ hợp bò lai Senepol × lai Brahman

Địa phương	Tổng số mẫu	Tần số kiểu gen TG5/PSUI			Tần số ALEN	
		CC	CT	TT	C	T
Thủy Phương	15	0/15 (0,0)	15/15 (1,0)	0/15 (0,0)	0,50	0,50
Điền Môn	15	0/15 (0,0)	15/15 (1,0)	0/15 (0,0)	0,50	0,50
Tính chung	30	0/30 (0,0)	30/30 (1,0)	0/30 (0,0)	0,50	0,50

4 Kết luận

Kết quả nghiên cứu trên 30 mẫu DNA của bò lai Senepol × lai Brahman được nuôi tại phường Thủy Phương và xã Điền Môn, tỉnh Thừa Thiên Huế, cho thấy có sự đa hình về kiểu gen LEP/Sau3AI; tần số alen A liên quan đến tuổi đẻ lứa đầu thấp; năng suất và chất lượng sữa cao là chủ yếu (0,92). 5/30 con bò mang alen B liên quan đến tỷ lệ mỡ trong thân thịt cao được tìm thấy ở xã Điền Môn. Ngược lại, 30/30 con bò khảo sát mang kiểu gen TG5/PsuI dị hợp tử (CT). Cần tăng cường số mẫu nghiên cứu để có kết luận chính xác hơn về đa hình gen TG5/PsuI trên tổ hợp bò lai này và tiếp tục chọn lọc để tăng tần số alen T liên quan đến chỉ số vân mỡ cao trong thịt bò.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu từ Đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Đại học Huế, mã số DHH2022-02-164 và Nhóm nghiên cứu mạnh Đại học Huế, mã số NCM.ĐHH.2018-04.

Tài liệu tham khảo

1. Don, N. V., Oanh, N. C. and Aduli, M. E. O. (2021), Main regulatory factors of marbling level in beef cattle, *Veterinary and Animal Science*, 14, 100219.
2. Chen, D., Li, W., Du, M., Cao, B. (2019), Adipogenesis, fibrogenesis and myogenesis related gene expression in longissimus muscle of high and low marbling beef cattle, *Livestock Science*, 229, 188–193.
3. Hocquette, J. F., Gondret, F., Baeza, E., Medale, F., Jurie, C., Pethick, D. W. (2010), Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control and identification of putative markers, *Animal*, 4, 303–319.
4. Wang, Y. H., Bower, N., Reverter, A., Tan, S. H., De Jager, N., Wang, R., McWilliam, S. M., Café, L. M., Greenwood, P. L., Lehnert, S. A. (2009), Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle, *Journal of Animal Science*, 87, 119–130.

5. Javanmard, A., Mohammadabadi, M. R., Zarrigabayi, G. E., Gharahedaghi, A. A., Nassiry, M. R., Javadmansh, A. and Asadzadeh, N. (2008), Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*), *Russian Journal of Genetics*, 44(4), 495–497.
6. Putra, W. P. B., Anwar, S., Said, S., Indratno, S. A. A. and Wulandari, P. (2019), Genetic characterization of Thyroglobulin and Leptin genes in Pasundan cattle at West Java, *Buletin Peternakan*, 43(1), 1–7.
7. Moravčíková, N., Trakovická, A., Kasarda, R. (2012), Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Slovak Pinzgau cattle, *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 45(1), 211–214.
8. Trakovicka, A., Nina, M. and Radovan, K. (2013), Genetic polymorphism of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle, *Acta Biochimica Polonica*, 60, 783–787.
9. Ferchichi, M. A., Bayrem, J., Sihem, A., Abderrahmane, B. G. and Boulbaba, R. (2018), Effect of leptin genetic polymorphism on lameness prevalence in Tunisian Holstein cows, *Archives Animal Breeding*, 61, 305–310.
10. Moussavi, A. H., Ahouei, M., Nassiry, M. R. and Javadmanesh, A. (2006), Association of leptin polymorphism with production, reproduction and plasma glucose level in Iranian Holstein cattle, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19, 627–631.
11. Oner, Y., Onur, Y., Hayrettin, O., Nezh, A., Gulnaz, Y. M. and Abdulkadir, K. (2017), Associations between GH, PRL, STAT5A, OPN, Pit-1, LEP and FGF2 genes polymorphisms and fertility in Holstein Friesian heifers, *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 23, 527–534.
12. Almeida, S. E. M., Almeida, E. A., Moraes, J. F. C. and Weimer, T. A. (2003), Molecular markers in LEP gene and reproductive performance of beef cattle, *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120, 106–113.
13. Hussain, D. A., Abboud, Z. H., Abdulameer, T. A. (2017), Genetic structure analysis of leptin gene/ *Sau3AI* and its relationship with body weigh in Iraqi and Holstein Frisian cows population (Comparative study), *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12(3), 10–13.
14. Nobari, K., Shokoufe, G., Mohammdad, R. N., Mojtaba, T. and Eisa, J. (2010), Relationship between leptin gene polymorphism with economical traits in Iranian Sistani and Brown Swiss cows, *Journal of Animal Veterinary Advances*, 9, 2807–2810.

15. Sedykh, T. A., Kalashnikova, L. A., Gusev, I. V., Pavlova, I. Y., Gizatullin, R. S. and Dolmatova, I. Y. (2016), Influence of TG5 and LEP gene polymorphism on quantitative and qualitative meat composition in beef calves, *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 30, 41–48.
16. Liefers, S. C., te Pas, M. F. W., Veerkamp, R. F. and van der Lende, T. (2002), Associations between Leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers, *Journal of Dairy Science*, 85, 1633–1638.
17. Baas, F., van Ommen, G. J., Bikker, H., Arnberg, A. C. and de Vijlder, J. J. (1986), The human thyroglobulin gene is over 300 kb long and contains introns of up to 64 kb, *Nucleic Acids Research*, 14, 5171–5186.
18. Anwar, S., Putra, A. C., Wulandari, A. S., Agung, P. P., Putra, W. P. B. and Said, S. (2017), Genetic polymorphism analysis of 5' untranslated region of thyroglobulin gene in Bali cattle (*Bos javanicus*) from three different regions of Indonesia, *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 42(3), 175–184, DOI: 10.14710/jitaa.42.3.175-184.
19. Barendse, W. J. (1999), Assessing lipid metabolism, International Patent Application WO9923248 US6383751 (PCT/AU98/00882).
20. Barendse, W. J., Bunch, R. J., Thomas, M. B., Armitage, S. M., Baud, S., Donaldson, N. (2004), The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle, *Australian Journal of Experimental agriculture*, 44(7), 669–674.
21. Casas, E., White, S. N., Riley, D. G., Smith, T. P., Brennehan, R. A., Olson, T. A., Johnson, D. D., Coleman, S. W., Bennett, G. L., Chase, C. C. Jr. (2005), Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle, *Journal of Animal Science*, 83(1), 13–19.
22. Gan, Q. F., Zhang, L. P., Li, J. Y., Hou, G. Y., Li, H. D., Gao, X., Ren, H. Y., Chen, J. B. and Xu, S. Z. (2008), Association analysis of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle, *Journal of Applied Genetics*, 49, 251–255.
23. Mears, G. J., Mir, P. S., Bailey, D. R. C. and Jones, S. D. M. (2001), Effect of Wagyu genetics on marbling, backfat and circulating hormones in cattle, *Canadian Journal of Animal Science*, 81, 65–73.
24. Moore, S. S., Li, C., Basarab, J., Snelling, W. M., Kneeland, J., Murdoch, B., Hansen, C. and Benkel, B. (2003), 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*, *Journal of Animal Science*, 81, 1919–1925.

25. Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Thừa Thiên Huế (2021), Triển vọng của giống bò lai Senepol nuôi trong nông hộ ở Thừa Thiên Huế. Link: <https://snnptnt.thuathienhue.gov.vn/?gd=7&cn=159&tc=22407>, Ngày truy cập: 01/04/2021.
26. Healy, P. J., Dennis, J. A., Moule, J. F. (1995), Use of hair root as a source of DNA for the detection of heterozygotes for recessive defects in cattle, *Australian Veterinary Journal*, 72(10), 392.
27. Dolmatova, I., Sedykh, T., Valitov, F., Gizatullin, R., Khaziev, D., Kharlamov, A. (2020), Effect of the bovine TG5 gene polymorphism on milk- and meat-producing ability, *Veterinary World*, 13(10), 2046–2052.
28. Nkrumah, J. D., Li, C., Yu, J., Hansen, C., Keisler, D. H., Moore, S. S. (2005), Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior and measures of carcass merit, *Journal of Animal Science*, 83, 20–8.
29. Sharifzadeh, A., Doosti, A. and Moshkelani, M. (2010), Genetic polymorphism at the leptin gene in Iranian Holstein cattle by PCR-RFLP, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(10), 1420–1422.
30. Jecminkova, K., Kyselova, J., Ahmed, S. A., Zavadilov, L., Matlova, V. and Majzlik, I. (2016), Leptin Promoter Region Genotype Frequencies and Its Variability in the Czech Fleckvieh Cattle, *Scientia Agriculturae Bohemica*, 47(2), 54–59.
31. Sadeghi, M., Babak, M. M. S., Rahimi, G. and Javaremi, A. N. (2008), Effect of leptin gene polymorphism on the breeding value of milk production traits in Iranian Holstein, *Animal*, 2, 999–1002.
32. Nassiry, M. R., Shahroudi, F. E., Moussavi, A. H., Sadeghi, B. and Javadmanesh, A. (2008), The diversity of leptin gene in Iranian native, Holstein and Brown Swiss cattle, *South African Journal of Animal Science*, 7(15), 2685–2687.
33. Singh, U., Kumar, S., Deb, R., Mann, S. and Sharma, A. (2013), Genotypic profiling of coding region of leptin gene and their association studies on reproductive and milk production traits in Sahiwal and Frieswal cattle of India, *South African Journal of Animal Science*, 12(42), 6140–6146.
34. Tomka, J., Vašíčková, K., Oravcová, M., Bauer, M., Huba, J., Vašíček, D., Peškovičová, D. (2016), Effects of polymorphisms in DGAT1 and LEP genes on milk traits in Holstein primiparous cows, *Mljekarstvo*, 66(2), 122–128, Doi: 10.15567/mljekarstvo.2016.0204.

35. Yang, D., Chen, H., Wang, X., Tian, Z., Tang, L., Zhang, Z. and Zhang, L. (2007), Association of polymorphisms of leptin gene with body weight and body sizes indexes in Chinese indigenous cattle, *Journal of Genetics and Genomics*, (34), 400–5.
36. Thaller, G., Kuhn, C., Winter, A., Ewald, G., Bellmann, O., Wegner, J., Zuhlke, H. and Fries, R. (2003), DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle, *Animal Genetics*, 34, 354–357.
37. Burrell, D. N., Moser, G. H. D., Hetzel, J. and Mizoguchi, Y. S. S. (2004), Meta Analysis Confirms Associations of the TG5 Thyroglobulin Polymorphism with Marbling in Beef Cattle, *29th International Conference on Animal Genetics*, ISAG, Tokyo.