

лизату добавили по 2 мкл 0,2 % 2-меркаптоэтанола. В оставшиеся 4 пробирки внесли по 1 мкл 10 мМ дитиотрейтола. Далее продолжили выделение ДНК по схеме первых четырех пробирок. В результате ДНК из этих восьми образцов успешно выделилась.

На втором этапе брали 12 образцов семени хранящихся в полипропиленовых соломинках по 100 мкл.

От каждой полипропиленовой соломинки аккуратно ножницами отрезали кончики и помещали соломинки в пробирки «Эппендорф» объемом 1,5 мл. Семя в паетах размораживали при комнатной температуре.

Установили, что выделение ДНК из семени (гранула, паета) без использования реагентов-тиовосстановителей (2-меркаптоэтанола или дитиотрейтола) является неэффективным. При этом принципиальной разницы в действии на процесс выделения между 2-меркаптоэтанолом и дитиотрейтолом не наблюдается.

На третьем этапе выделение проводили из 12 образцов нанесенных на фильтры:

- 4 образца нанесенных на фильтр плотностью №1 (рыхлая плотность, d пор 20-25 мкм, вес 68 г/м²);
- 4 образца нанесенных на фильтр плотностью №2 (плотная узкопористая, d пор 8-10 мкм, вес 120 г/м²);
- 4 образца нанесенных на фильтр плотностью №3 (высокая плотность, d пор < 2

мкм, вес 165 г/м²).

Каждый фильтр измельчали с помощью ножниц (фламбируя ножницы от пробы к пробе) и переносили в пробирки «Эппендорф» объемом 1,5 мл. К образцам добавляли по 600 мкл лизирующего раствора + 1,5 мкл дитиотрейтола и инкубировали при 65° С 40 минут. Далее приступали к выделению по стандартной методике.

В результате выход спермальной ДНК оказался прямо пропорциональным увеличению плотности фильтра (концентрация ДНК определялась визуально в агарозном геле после электрофореза).

Выводы. Выделение ДНК из каждого вида биологического материала имеет свои особенности. Знание этих особенностей, позволяет проводить успешное выделение ДНК.

Список литературы

1. Перепечина И. О. Исследование объектов судебно-биологической экспертизы полимеразной цепной реакцией / И. О. Перепечина, Т. В. Стегнова, М.Г. Пименов // Методические рекомендации: М., ЭКЦ МВД РФ, 1996. – 24 с.
3. Лубенникова М. В. Выделение ДНК – важный этап молекулярно-генетического исследования / М. В. Лубенникова, В. А. Афанасьев, К. А. Афанасьев // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. – 2020. – № 2 (21). С. 18.

DOI: 10.48612/sbornik-2023-1-4
УДК 636.32/38.082.12

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА СОМАТОТРОПИНА (GH) У ОВЕЦ ЮЖНОЙ МЯСНОЙ ПОРОДЫ

Куликова Анна Яковлевна, д-р с.-х. наук
ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,
г. Краснодар, Российская Федерация

В результате генотипирования в субпопуляции овец южной мясной породы с использованием ПЦР-ПДРФ анализа установлена разная частота встречаемости аллелей и генотипов гена в локусе гармона роста (GH), и их ассоциативные связи с ростом и развитием, формированием мясной продуктивности и плодовитостью. Гетерозиготные особи GH_AB по живой массе превосходили гомозиготных GH_AA на 2,4–3,95 %, по настригу шерсти – на 2,4 %. по плодовитости – на 12 %.

Ключевые слова: полиморфизм; ген; аллель; генотип; продуктивные качества

POLYMORPHISM OF SOMATOTROPIN (GH) GENE IN SHEEP OF THE SOUTHERN MEAT BREED**Kulikova Anna Yakovlevna**, Dr. Agr. Sci.*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation*

As a result of genotyping in a subpopulation of sheep of the Southern meat breed using PCR-RFLP analysis, different frequencies of occurrence of alleles and genotypes of the gene at the growth hormone (GH) locus, and their associative relationships with growth and development, the formation of meat productivity and fertility, were established. Heterozygous individuals GH_AB exceeded homozygous GH_AA in live weight by 2.4–3.95%, in terms of wool shearing – by 2.4%. in terms of fertility – by 12%.

Key words: polymorphism; gene; allele; genotype; productive qualities

Стратегия селекции с использованием ДНК-маркеров в животноводстве в настоящее время значительно ускорит генетический прогресс желательных производственных признаков, особенно тех, которые трудно измерить или они проявляются только в позднем возрасте. Поскольку основные хозяйственно-полезные признаки формируются под влиянием аддитивных генов (суммарных), то отбор с помощью ДНК-маркеров и отбор с учетом всего генома гарантирует большую надежность и исключает повторное их определение в каждом поколении. Маркерная селекция является современным перспективным направлением в животноводстве, которая позволяет результативно использовать выявленные генетические маркеры хозяйственно-значимых признаков с целью увеличения эффективности селекционной работы. В большинстве стран с развитым животноводством маркер-ассоциированная селекция является неотъемлемой частью национальных селекционных программ. В овцеводстве, как и в других областях животноводства, остро стоит вопрос внедрения в отрасль различных новейших технологий для повышения продуктивности, улучшения качества продукции. Поэтому тенденция развития отрасли направлена на использование специализированных мясных пород, обеспечивающих возрастающие требованиями к мясной продуктивности. С мясной продуктивностью и её качеством связывают ген гармона роста (GH) [1-6].

Методика исследований. Изучение полиморфизма гена гармона роста (GH), и определение генотипов-носителей селекционно-значимых маркерных аллелей в субпопуляции овец южной мясной породы выполнено в генофондном хозяйстве КНЦЗВ по ДНК, выделенной из 100 биопроб (кровь) овец южной мясной породы. Генотипирование овец мясного направления по ДНК проводилось методом ПЦР (полемеразной цепной реакции с использованием набора и реагентов «Diatom tm DNA Prep» (IsoGeneLab) г. Москва, согласно прилагаемой инструкции в лаборатории иммуногенетики и ДНК-технологий ВНИИОК – (Филиала ФГБНУ «Северокавказский ФНАЦ»). Реакцию амплификации проводили с помощью набора «Gen Pak CR Core» на программируемом четырехканальном термоциклере «Терцик». В качестве праймеров использовали следующие нуклеотидные последовательности для амплификации участков гена гармона роста (GH) : F : 51 – GAAACCTCCTTCCTCGCCC – 31, R : 51 – CCAGGGTCTAGGAAGCCACA – 31 (амплифицированный фрагмент 934 п.н.). Рестрикцию амплифицированного фрагмента осуществляли с помощью реагентов эндонуклеаз рестрикции Nae III и анализировали методом электрофореза в 4 %-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Наличие 10 сайтов рестрикции соответствовало аллелю А и 11 – аллелю В. Определены 10 рестриционных фрагментов для генотипов АА и ВВ и 11 – для АВ (рис. 1).

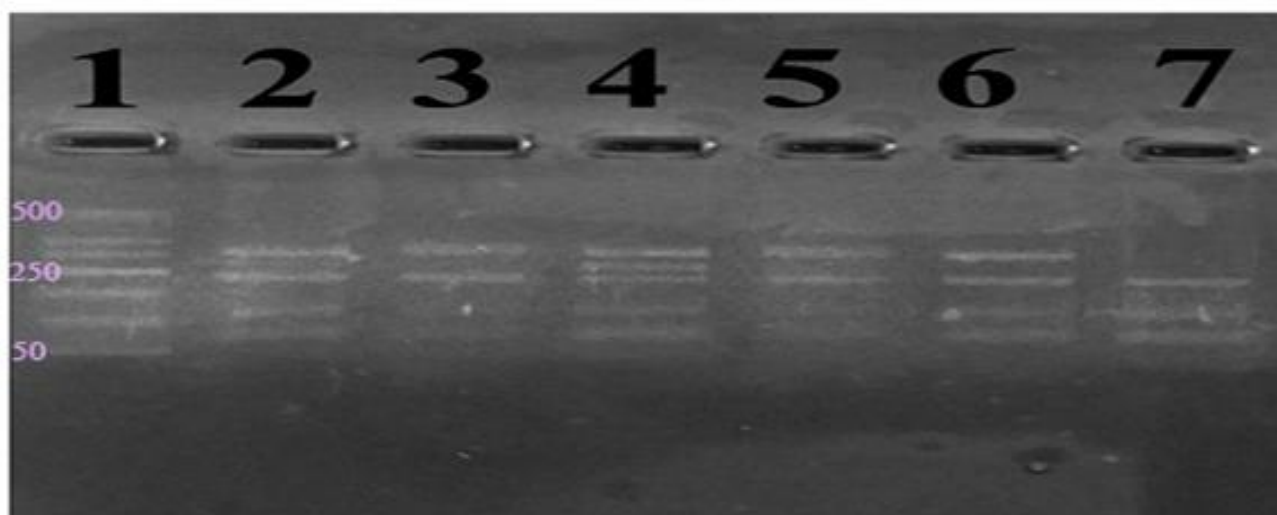


Рисунок 1 – Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ GH 3,8 % агарозном геле

Обозначения: 1 – ДНК-маркер 50 bp (Изоген);

2, 3, 5, 6 – генотип AA (277; 202; 110; 100; 94; 68; 49; 22; 8 и 4 п.н);

4 – генотип АВ (277; 256; 202; 110; 100; 94; 68; 49; 22; 8 и 4 п.н);

7 – генотип ВВ (256; 202; 110; 100; 94; 68; 49; 22; 8 и 4 п.н).

Обработка материала, полученного в эксперименте, проведена методами вариационной статистики, и генетико-статистического анализа (по формулам, изложенным в методике Л.В. Ольховской и др. 2007).

Результаты исследований и их обсуждение. Определение генетического разнообразия и выявления генов-маркеров, ассоциированных с комплексом желательных для селекции признаков у овец ЮМ породы, по результатам ДНК-исследований показало, что полиморфизм гена GH представлен двумя аллелями А и В, а по распределению частот аллелей тремя генотипами АА, АВ и ВВ. В генетической структуре овец ЮМ по гену гормона роста преобладает гомозиготный генотип АА (67 %), гетерозиготный – АВ составляет 27 % и ВВ – 6 %. Варибельность частот аллелей составляла - А ($0,805 \pm 0,028$) и В - ($0,195 \pm 0,028$). Величина наблюдаемой гетерозиготности (Hobs) по локусу гена (GH) составляла 0,27, а ожидаемой (Hex) – 0,31, что на 14,8 % выше наблюдаемой. Дефицит гетерозиготности связан с применением в стаде замкнутой субпопуляции методов селекционного давления по признакам отбора. Высокий уровень гомозиготности (73 %) влияет на величину полиморфности (Na), уровень которой равен 1,46, что свидетельствует о снижении разнообразия исследуемой субпопуляции

овец ЮМ породы по гену гормона роста. Степень генетической изменчивости по локусу гена GH составляла 31,04. Тест гетерозиготности (ТГ) отрицательный и равен «- 0,04» также отражает дефицит гетерозигот по локусу гена GH. Генное равновесие генотипов гормона роста (GH) согласно закону Харди-Вайнберга и значению критерия Пирсона (χ^2) также нарушено за счет преобладания гомозиготных особей и составляет 27,9.

Для оценки признаков, ассоциированных с геном гормона роста в генофондном стаде южной мясной породы, был проведен анализ возрастной динамики живой массы и воспроизводительных качеств овец разных генотипов. В исследуемых группах отмечены особенности интенсивности роста и шерстной продуктивности овец ЮМ породы с различными генотипами в локусе гормона роста (таблица 1).

Приведенные данные свидетельствуют, что при рождении наиболее крупными были гомозиготные особи GH_AA. Они превосходили по живому весу гетерозиготных сверстников генотипа АВ на 6,3 %. Однако, гетерозиготные животные гена GH_AB превосходили гомозиготных (AA) сверстников по живой массе в 4 месяца – на 5,7 %, в годовалом возрасте – на 2,3 %, а по настригу шерсти – на 6,7 % и длине штапеля – на 4,5 %. Существен-

ная достоверная разница по живой массе наблюдалась в 4 и 5 месяцев между генотипами GH_AB и GH_BB, составляла 10,7 % ($P<0,05$) и 8,7 % ($P<0,05$) соответственно.

Необходимо отметить, что в подсосный

период выращивания овцы с генотипом GH_AB росли интенсивнее, о чем свидетельствуют среднесуточные привесы и скорость роста. Эта тенденция сохранилась до 5-месячного возраста (таблица 2).

Таблица 1 – Динамика живой массы и шерстная продуктивность овец ЮМ с разными генотипами гена GH

Показатели	GH		
	AA	AB	BB
n	83	n=34	6
При рождении	3,83±0,06	3,6±0,10	3,6±0,26
4	31,3±0,46	*33,1±0,79	29,9±1,11
5	35,98±0,52	*37,4±0,74	34,4±1,30
6	44,2±1,00	42,4±0,78	39,0±0,82
8	50,1±0,54	52,0±4,50	49,4±1,43
12	63,7±0,98	65,2±1,36	58,3±1,70
Настриг шерсти, кг	4,5±0,09	4,8±0,15	4,3±0,31
Длина шерсти, см	13,2±1,5	13,8±0,29	14,0±0,71

Примечание - достоверно * $P<0,05$

Таблица 2 – Динамика скорости роста овец ЮМ при аллельных вариантах гена GH

Возраст, (месяцев)	AA		AB		BB	
	прирост в сутки, г	скорость роста, %	прирост в сутки, г	скорость роста, %	прирост в сутки, г	скорость роста, %
0–4	236,4±3,4	156,4	240,6±6,8	160,7	219,0±9,5	157,0
4–5	153,0±6,2	13,9	180,6±8,8	12,2	150,0±23,5	14,0
5–6	147,7±5,7	20,1	131,4±10,7	12,5	153,0±23,5	12,5
6–8	160,3±5,4	12,5	160,8±7,6	20,3	168,0±16,8	23,5
8–12	119,0±5,8	23,9	108,2±6,9	22,5	74,0±14,9	16,5

Преимущество овец с гетерозиготным генотипом GH_AB по признаку среднесуточного прироста живой массы, к 5-месячному возрасту, составило 20 % по сравнению с гомозиготным генотипом GH_BB и 18,0 % – с генотипом GH_AA. В последующие возрастные периоды существенных различий по величине среднесуточного привеса у овец с разными генотипами гена гормона роста не наблюдалось, однако по скорости роста овцы с генотипом GH_AB превосходили генотипы GH_AA – на 7,8 % в возрасте от 6 до 8 месяцев и сохранили этот показатель до 12 месяцев, обеспечив наибольшую живую массу, равную 65,2±1,4 кг. Плодовитость подвержена влиянию, как генетических, так и паратипических факторов. В результате выполненных исследований получены сведения о полиморфизме гена гормона роста (GH) и предварительные

результаты их ассоциации с основными селекционными признаками овец генофондного стада южной мясной породы. Гомозиготное состояние генотипов исследуемого гена обусловлено давлением отбора по основным селекционным признакам, которые соответствуют требованиям стандарта породы. По интенсивности прироста и скорости роста живой массы во все возрастные периоды преимущество имели овцы с гетерозиготным генотипом GH_AB, а по абсолютной величине живой массы – гомозиготного локуса гормона роста GH_AA. Продолжительность хозяйственного использования овцематок исследуемых генотипов составляет от 3 до 7 ягнений, а в среднем от 4,3 до 4,7 ягнений. Наибольшее количество приплода в расчете на одну овцематку за период её использования получено от гетерозиготных овец по локусу гена GH_

АВ, превосходящих по этому признаку гомозиготных – на 12 % (таблица 3).

Таблица 3 – Плодовитость овцематок ЮМ породы разных генотипов гена GH

Ген	Генотип	n	Получено ягнят, гол				Среднее количество ягнений за жизнь
			всего	на 1 матку за жизнь	за одно ягнение	плодовитость, %	
GH	AA	24	139	5,8	1,37	137	4,3
	AB	6	43	7,2	1,49	149	4,7

От овцематок гомозиготного генотипа GH_AA получен одинцовый приплод у 54,1 %, двойнёвый – у 41,7 % и тройнёвый – у 4,3 %. Высокая плодовитость 138,9 % сохраняется у овцематок до семилетнего возраста, а максимальная наблюдалась в возрасте пяти лет и составляла – 175,0 %. Статистически достоверные различия, связанные с аллельными вариантами гена соматотропина (GH) по среднесуточным приростам живой массы, частоте встречаемости аллелей наблюдали в стадах овец татарстанской, эдильбаевской пород, а по плодовитости – у волгоградской [1, 6].

Выводы. В результате экспериментальных исследований впервые получены данные о полиморфизме гена гормона роста (GH) у овец генотипа ЮМ южной мясной породы. В субпопуляции ЮМ выявлены три генотипа с двумя аллелями с разной частотой встречаемости. Преобладание гомозиготных генотипов наблюдается в локусах гена GHAA/BB – 73 %. По абсолютной величине живой массы гомозиготные достоверно превосходили гетерозиготных от рождения до отъема на 17,8 %, а в 12 месяцев – на 10,8 %, по настригу – 10,8 %. Лучшими воспроизводительными качествами обладали овцематки ЮМ породы гетерозиготного генотипа GH_AB и превосходили по этому признаку гомозиготных – на 12 %.

Список литературы

1. Колосов Ю. А. Биотехнологические мето-

ды изучения полиморфизма гена гормона роста / Ю. А. Колосов, П. С. Кобыляцкий, Н. В. Широкова, Л. В. Гетманцева, Н. Ф. Бакоева // Научная жизнь. – 2017. – № 3. – С. 84–91.

2. Куликова К. А. Исследование полиморфизма гена GH у овец тувинской короткожирнохвостой породы / К. А. Куликова, Ю. А. Юлдашбаев, С. А. Хататаев, Л. А. Калашникова, М. И. Донгак // Научно-практический журнал вестник ИРГСХА. – 2018. – № 87. – С.139–148.

3. Росс Л. Гены, способствующие генетическому изменению мускулатуры у овец / Л. Росс, Теллам, Э. Ноэль, Кокетт, Тони Вуоко, А. Кристофер, Бидуэлл // Публикация на сайте 2012. Aug Doi: 10.3389 / fgene.2012.00164 PMID: PMC3429854 PMID: 22952470.

4. Сафонова Н. С. Полиморфизм гена соматотропина (GH) у овец породы советский меринос / Н. С. Сафонова, Д. А. Ковалев, Л. Н. Скорых, Н. И. Ефимова, А. М. Жиров // Главный зоотехник. – 2019. – № 6. – С. 25–31.

5. Скорых Л. Н. Исследование полиморфизма генов соматотропина и лептина у северокавказской мясошерстной породы / Л. Н. Скорых, Д. А. Ковалев, Н. С. Сафонова, А. А. Омаров // Ветеринария и кормление. – 2020. – № 1. – С. 37–39.

6. Широкова Н. В. Хозяйственно-биологические особенности и рациональное использование овец разного генетического потенциала при производстве и переработке баранины в условиях Юга России: Автореф. дис. доктора биол. наук // Волгоград. – 2021. – 41 с.