

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ GH, GDF9 У ОВЕЦ ПОРОДЫ РОССИЙСКИЙ МЯСНОЙ МЕРИНОС

О.Н. ОНИЩЕНКО^{1,2}, Е.Н. ЧЕРНОБАЙ¹, Е.С. СУРЖИКОВА²

¹ ФГБОУ ВО «Ставропольский ГАУ»;

² ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ»

GENETIC POLYMORPHISM OF THE GH, GDF9 GENES IN RUSSIAN MEAT MERINO SHEEP BREED

O.N. ONISCHENKO^{1,2}, E.N. CHERNOBAY¹, E.S. SURZHIKOVA²

¹ Stavropol State Agrarian University;

² Federal State Budgetary Scientific Institution «North Caucasus Federal Scientific Agrarian Center»

Аннотация. В статье представлены результаты ПЦР-ПДРФ анализа распределения генотипа генов GH и GDF9 у овец породы российский мясной меринос ($n = 100$), разводимой в условиях Ставропольского края. Наибольшую популярность приобретают генетические маркеры, которые взаимосвязанные с генами-кандидатами, белковые продукты которых выполняют существенную роль в формировании или регуляции физиолого-биохимических процессов. С помощью методов ПЦР-ПДРФ была установлена специфичность аллельного спектра генов соматотропина и дифференциального фактора роста.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, ген, GH, GDF9, генотип, ПЦР-ПДРФ анализ, аллели, порода овец российский мясной меринос, генотипирование, продуктивность.

Summary. The article presents the results of PCR-RFLP analysis of the genotype distribution of the GH and GDF9 genes in sheep of the Russian meat merino breed ($n = 100$), bred in the conditions of the Stavropol Territory. The most popular are genetic markers that are interconnected with candidate genes, the protein products of which play a significant role in the formation or regulation of physiological and biochemical processes. Using the PCR-RFLP methods, the specificity of the allelic spectrum of the somatotropin and differential growth factor genes was established.

Keywords: genetic polymorphism, gene, GH, GDF9, genotype, PCR-PDRF analysis, alleles, sheep breed Russian meat merino, genotyping, productivity.

Важным аспектом деятельности отечественного овцеводства на современном этапе можно назвать оптимизацию использования поголовья имеющихся пород овец и их рациональное использование [8].

Стратегическими задачами на сегодняшний день являются конкуренция и стабильность отрасли [1, 2]. Селекционная работа, внедрение технологичных методов в производство, усовершенствование методов работы со стадом приобретают важное значение. Воспроизводительные способности и использование генетических ресурсов племенных овец выполняют основную роль в производственных процессах [5, 6].

ПЦР-ПДРФ – широко применяемый метод, проявивший себе в изучениях, нацеленных на обнаружение

точковых мутаций, сущность которого – выявление полиморфизма последовательности нуклеотидов ДНК на основе способности ферментов – эндонуклеаз рестрикции разрезать цепь ДНК в специальных сайтах узнавания фермента [6, 7]. Метод ПЦР-ПДРФ довольно верен, в современных условиях имеется огромное число эндонуклеаз рестрикции, что дает возможность выбрать тест-систему с большим количеством интересующих нас полиморфных вариантов [3, 4].

Большой интерес учёных сосредоточен на генах-кандидатах, которые отвечают за улучшение скорости роста животного, развитие скорости набора веса и метаболизма жировой ткани. Ген – гормон роста (GH) оказывает влияние на ростовые процессы в организме овец, отвечает за качество мяса и туш [5-7].

Гормон роста – белок с молекулярной массой около 22000, его полипептидная цепь состоит из 191 аминокислотного остатка. Полиморфизм гена, расположенного в третьем экзоне, может быть определен методом ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеазы рестрикции HaeIII. Соматотропная ось, система контроля секреции гормона роста (GH) и его эндогенные факторы, участвующие в регуляции метаболизма и распределения энергии, обладают многообещающим потенциалом для получения экономически ценных признаков у сельскохозяйственных животных [9, 10].

Воспроизводительная способность овец остается актуальной. Увеличение воспроизводительных качеств овцематок является эффективным способом повышения продуктивности у полученного потомства [15-17].

Ген фактора дифференцировки роста участвует в регуляции репродуктивных признаков у овец. Нормальная экспрессия специфичности гена фактора дифференцированного роста (GDF9), расположенного на 5 хромосоме, необходима для нормального роста и развития фолликулов у овец. Решающую роль в повышении частоты овуляции у овцематок выполняет ген GDF9, который также улучшает воспроизводительные способности [11, 12].

Ген GDF9 содержит две экзоны и один интрон 1126 п.н., промежуточный между двумя экзонами. Экзон I охватывает 397 п.н. и кодирует 1-134 аминокислоты, в то время как экзон II охватывает 968 п.н. и кодирует 135-456 аминокислот [13-14].

Определение полиморфизма гена дифференциального фактора роста осуществлялось с использованием эндонуклеазы рестрикции – BstHNI.

Цель исследований. Изучить полиморфизм генов GH, GDF9, а также выявить частоту встречаемости аллелей у овец породы российский мясной меринос.

Материал и методика исследований. Экспериментальная часть исследований проводилась в условиях СПК колхоза-племзавода им. Ленина Арзгирского района Ставропольского края. Для проведения исследования полиморфизма гена GH, GDF9 были отобраны овцематки (n = 100) породы российский мясной меринос. Молекулярно-генетические исследования проводились на базе лаборатории иммуногенетики и ДНК-технологий ВНИИОК – филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ» (Свидетельство ПЖ – 77N008326 от 18.04.2018 г.) методом ПЦР-ПДРФ (полимеразно-цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) на четырехканальном программируемом термоциклере «Терцик» фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием специфических праймеров. Биологическим материалом для исследования служила ДНК, выделенная из образцов крови овец исследуемой породы.

Процедуру ДНК проводили в строгом соответствии с протоколом выделения, представленного фирмой-производителем.

Амплификация фрагмента ДНК проводилась на программируемом четырехканальном термоциклере «Терцик» фирмы «ДНК-технология» (Россия) на основе праймера: GH – (F: 5'-GGA-GGC-AGG-AAG-GGA-TGA-A-3' и R: 5'-CCA-AGG-GAG-GGA-GAG-ACA-GA-3'). Анализ рестрикции полученных амплификатов проводили при помощи эндонуклеазы рестрикции HaeIII. После окончания электрофореза в 4,0% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, который предварительно помещали на платформу трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне, производилась визуализация числа и длин фрагментов рестрикции.

В агарозном геле (2,0-4,0%) длина и значение фрагментов рестрикции в присутствии 10,0 мкл 10,0% бромистого этидия определялись методом гель-электрофореза при УФ-свете. Определение полиморфизма гена осуществлялось с использованием эндонуклеазы рестрикции – BstHNI.

Результаты, полученные в ходе исследований, обрабатывались генетико-статистическим анализом.

Результаты и их обсуждение. По результатам молекулярно-генетических исследований овцематок (n = 100) было отмечено, что полиморфизм гена GH представлен аллелью GH^B с частотой встречаемости 0,47, что на 0,07 ниже аллеля GH^A, который

составил 0,54. Основной особенностью исследуемой популяции овцематок является существование высокой частоты встречаемости гетерозиготного генотипа GH^{AB}, которая проявляет признак гормона роста, составившего 55 %, а гомозиготный генотип GH^{BB} составил 19 %.

Анализом результатов типирования овцематок породы российский мясной меринос было установлено, что полиморфизм гена GDF9 дифференциальный фактор роста представлен двумя аллелями: GDF9^A и GDF9^G, у которых имеется разная частота встречаемости, а именно 0,44 и 0,57.

У овцематок преобладает гетерозиготный генотип GDF9^{AG}, который составляет 67,0% (n = 67). Гомозиготные генотипы GDF9^{AA} и GDF9^{GG} присутствуют в исследуемой группе животных – 10% (n = 10) и 23 % (n = 23). Количество овцематок носителей гомозиготных генотипов GDF9^{AA} и GDF9^{GG} в исследуемой выборке составило 33 головы, гетерозиготных GDF9^{AG} – 67 голов. Результаты представлены в таблице 1.

Сравнительный анализ результатов ДНК-диагностики овцематок и их генетической структуры свидетельствует о средней степени гомозиготности (Ca, %), которая составила 50,25% в локусе гена GH гормона роста, а показатели дифференциального фактора роста в локусе гена GDF9 были ниже на 0,6% и составили 50,85%.

Результаты, полученные в ходе молекулярно-генетических исследований, характеризуются неоднозначностью распределения аллельного профиля в изучаемых локусах генов. По гену гормона роста (GH) у овцематок имеется определенное количество эффективно действующих аллелей (Na) с значением 1,99, а (V) уровень генетической изменчивости составил – 48,8.

GDF9 (дифференциальный фактор роста) овцематок представлен числом эффективно действующих аллелей (Na) – 1,97, а уровень генетической изменчивости (V) имеет значение 48,2.

Таблица 1

Аллельный профиль гена GH и GDF9 овцематок породы российский мясной меринос
Allelic profile of the GH and GDF9 genes in Russian Merino meat ewes

Ген-маркер	Генотип	(n)	Частота встречаемости	
			генотип, %	аллели
GH	AA	26	26,0	A 0,54±0,01 B 0,47±0,01
	BB*	19	19,0	
	AB	55	55,0	
GDF9	AA*	10	10,0	A 0,44±0,01 G 0,57±0,01
	GG	23	23,0	
	AG	67	67,0	

Примечания: уровень значимости p < 0,05

У животных изучили степень генетического разнообразия, учитывая такие показатели, как гетерозиготность наблюдаемая (Hobs) и гетерозиготность ожидаемая (Hex), которая рассчитана непосредственно на данных аллелей каждого полиморфного локуса и частоты встречаемости генотипов (табл. 2).

Таблица 2

Генетическая структура гена GH и GDF9 овцематок породы российский мясной меринос

Genetic structure of the GH and GDF9 genes in Russian Merino meat ewes

Ген	Показатель					
	Ca, %	Na	V, %	Hobs	Hex	ТГ
GH	50,25	1,99	48,8	1,22	0,99	0,232 Ф>Т
GDF9	50,85	1,97	48,2	2,03	0,97	1,06 Ф>Т

У овцематок породы российский мясной меринос уровень наблюдаемой (Hobs) и ожидаемой (Hex) гетерозиготности по изучаемым генам, а именно GH – гену гормона роста – составляет 1,22 и 0,99, GDF9 – гену дифференциального фактора роста – составляет 2,03 и 0,97.

В данной выборке животных тест гетерозиготности (ТГ) указывает на повышение гетерозиготности особей.

В соответствии с учётом закона Харди-Вайнберга проведен анализ отклонений каждого локуса гена. С помощью применения критерия χ^2 Пирсона определили достоверность полученных данных. У имеющих овцематок значения χ^2 по генам GH (гормона роста) и GDF9 (дифференциального фактора роста) критического значения не превышали, поэтому безошибочной разницы между показателями ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности не наблюдалось.

Выводы. По результатам молекулярно-генетических исследований овцематок было отмечено, что полиморфизм гена GH представлен аллелью GH^B с частотой встречаемости 0,47, что на 0,07 ниже аллеля GH^A, который составил 0,54. Основной особенностью исследуемой популяции овцематок является существование высокой частоты встречаемости гетерозиготного генотипа GH^{AB}, которая проявляет признак гормона роста, составившего 55 %, а гомозиготный генотип GH^{BB} составил 19 %.

Анализом результатов типирования овцематок породы российский мясной меринос установлено, что полиморфизм гена GDF9 дифференциальный фактор роста представлен двумя аллелями: GDF9^A и GDF9^G, у которых имеется разная частота встречаемости, а именно 0,44 и 0,57.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дейкин А.В., Селионова М.И., Криворучко А.Ю. [и др.] Генетические маркеры в мясном овцеводстве // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. – № 5. – С. 576-583.

2. Трухачев В.И., Селионова М.И., Криворучко А.Ю., Айбазов А.М.М. Генетические маркеры мясной продуктивности овец (*Ovis aries* L.). Сообщение I. Миостатин, кальпаин, кальпастантин // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – № 6. – С. 1107-1119.

3. Колосов Ю.А. Использование генофонда мериносовых овец отечественной и импортной селекции для совершенствования местных мериносов // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2012. – № 4. – С. 13-16.

4. Колосов Ю.А., Широкова Н.В. Мясные качества чистопородных и помесных баранчиков разного происхождения // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2012. – № 3. – С. 44-46.

5. Марзанов Н.С., Саморуков Ю.В., Ескин Г.В. Сохранение биоразнообразия. Генетические маркеры и селекция животных (обзор) // Сельскохозяйственная биология. – 2006. – Т. 41. – № 4. – С. 3-19.

6. Широкова Н.В., Колосов Ю.А., Гетманцева Л.В. [и др.]. Оптимизация техники проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования овец // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 113. – С. 1473-1481.

7. Племяшов К.В. Геномная селекция – будущее животноводства // Животноводство России. – 2014. – № 5. – С. 2-4.

8. Лушников В.П., Фетисова Т.О., Селионова М.И. [и др.]. Полиморфизм генов соматотропина (GH), кальпастина (CAST), дифференциального фактора роста (GDF 9) у овец татарстанской породы // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2020. – № 1. – С. 2-3.

9. Селионова М.И., Айбазов М.М., Мамонтова Т.В. перспективы использования геномных технологий в селекции овец (аналитический обзор) // Сборник научных трудов ФГБНУ ВНИИОК (СНИИЖК). – 2014. – Т. 3. – № 7. – С. 107-112.

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

11. Юлдашбаев Ю.А., Донгак М.И., Куликова К.А. Хозяйственно-полезные признаки у овец тувинской короткожирнохвостой породы и перспективы изучения полиморфизма генов // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2016. – № 42. – С. 141-148.

12. Noor R., Djajanegara A., Schüler L. Selection to improve birth and weaning wei GHt of Javanese fat tailed sheep // Archives Animal Breeding. – 2001. – Vol. 44. – № 6. – Pp. 649-660.

13. Sadighi M., Bodensteiner K., Beattie A., Galloway S. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome // Anim. Genet. – 2002. – Vol. 33. – № 3. – Pp. 244-245.

14. Nicol L., Bishop S., Pong-Wong R. [et al]. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep // Reproduction. – 2009. – Vol. 138. – № 6. – Pp. 921-933.

15. Mihailov N., Getmantseva L. Association polymorphism in the POU1F1/MspI, PRLR/AluI и ESR1/PvuII gene with reproductive traits in Pigs // European Applied Sciences. – 2013. – Vol. 2. – Pp. 7-10.

16. Bodensteiner K., Clay C., Moeller C., Sawyer H. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation

factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries // *Biol. Reprod.* – 1999. – Vol. 60. – № 2. – Pp. 381-386.

17. Galloway S., McNatty K., Cambridge L. [et al]. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner // *Nat. Genet.* – 2000. – Vol. 25. – № 3. – Pp. 279-283.

REFERENCES

1. Deikin A.V., Selionova M.I., Krivoruchko A.Yu. [et al.]. Genetic markers in meat sheep breeding / A.V. Deikin, // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* – 2016. – T. 20. – No. 5. – Pp. 576-583.

2. Trukhachev V.I., Selionova M.I., Krivoruchko A.Yu., Aibazov A.M.M. Genetic markers of sheep meat productivity (*Ovis aries* L.). Message I. Myostatin, calpain, calpastatin // *Agricultural biology.* – 2018. – V. 53. – No. 6. – Pp. 1107-1119.

3. Kolosov Yu.A. Using the gene pool of merino sheep of domestic and imported breeding for the improvement of local merinos // *Sheep, goats, wool business.* – 2012. – No. 4. – Pp. 13-16.

4. Kolosov Yu.A., Shirokova N.V. Meat qualities of purebred and crossbred sheep of different origin // *Sheep, goats, wool business.* – 2012. – No. 3. – Pp. 44-46.

5. Marzanov N.S., Samorukov Yu.V., Eskin G.V. Conservation of biodiversity. Genetic markers and animal breeding (review) // *Agricultural biology.* – 2006. – T. 41. – No. 4. – Pp. 3-19.

6. Shirokova N.V., Kolosov Yu.A., Getmantseva L.V. [et al.]. Optimization of the PCR-RFLP technique for sheep genotyping // *Polythematic network electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University.* – 2015. – No. 113. – Pp. 1473-1481.

7. Plemashov K.V. Genomic selection is the future of animal husbandry // *Livestock in Russia.* – 2014. – No. 5. – Pp. 2-4.

8. Lushnikov V.P., Fetisova T.O., Selionova M.I. [et al.]. Polymorphism of somatotropin (GH), calpastatin (CAST), differential growth factor (GDF 9) genes in sheep of the Tatarstan breed // *Sheep, goats, wool business.* – 2020. – No. 1. – Pp. 2-3.

9. Selionova M.I., Aibazov M.M., Mamontova T.V. prospects for the use of genomic technologies in sheep breeding (analytical review) // *Collection of scientific works of FGBNU VNIIOK (SNIIZhK).* – 2014. – V. 3. – No. 7. – Pp. 107-112.

10. Sulimova G.E. DNA markers in genetic research: types of markers, their properties and applications // *Advances in Modern Biology.* – 2004. – T. 124. – No. 3. – Pp. 260-271.

11. Yuldashbaev Yu.A., Dongak M.I., Kulikova K.A. Economically useful traits in sheep of the Tuva short-fat-tailed breed and prospects for studying gene polymorphism // *Proceedings of the St. Petersburg State Agrarian University.* – 2016. – No. 42. – Pp. 141-148.

12. Noor R., Djajanegara A., Schüler L. Selection to improve birth and weaning weight of Javanese fat tailed sheep // *Archives Animal Breeding.* – 2001. – Vol. 44. – No. 6. – Pp. 649-660.

13. Sadighi M., Bodensteiner K., Beattie A., Galloway S. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome // *Anim. Genet.* – 2002. – Vol. 33. – № 3. – Pp. 244-245.

14. Nicol L., Bishop S., Pong-Wong R. [et al]. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep // *Reproduction.* – 2009. – Vol. 138. – № 6. – Pp. 921-933.

15. Mihailov N., Getmantseva L. Association polymorphism in the POU1F1/MspI, PRLR/AluI и ESR1/PvuII gene with reproductive traits in Pigs // *European Applied Sciences.* – 2013. – Vol. 2. – Pp. 7-10.

16. Bodensteiner K., Clay C., Moeller C., Sawyer H. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries // *Biol. Reprod.* – 1999. – Vol. 60. – № 2. – Pp. 381-386.

17. Galloway S., McNatty K., Cambridge L. [et al]. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner // *Nat. Genet.* – 2000. – Vol. 25. – № 3. – Pp. 279-283.

Онищенко Ольга Николаевна, аспирант базовой кафедры частной зоотехнии, селекции и разведения животных ФГБНУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» Россия, Ставрополь, мл. науч. сотрудник лаборатории иммуногенетики и ДНК-технологий ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр». Россия, Ставропольский край, e-mail: 74helga74@mail.ru;

Чернобай Евгений Николаевич, доктор биол. наук, профессор базовой кафедры частной зоотехнии, селекции и разведения животных ФГБНУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». Россия, Ставрополь, e-mail: bay973@mail.ru.;

Суржикова Евгения Семёновна, канд. с.-х. наук, вед. науч. сотрудник лаборатории иммуногенетики и ДНК-технологий ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр». Россия, Ставропольский край, e-mail: immunogenetika@yandex.ru.