

УДК 636.3
ГРНТИ 68.39.31

Колосов Ю.А., д-р с-х. наук;
Кобыляцкий П.С., канд. с-х. наук;
Широкова Н.В., канд. биол. наук;
Гетманцева Л.В., канд. с-х. наук;
Бакоев Н.Ф., аспирант,
Донской государственный аграрный университет,
пос. Персиановский, Октябрьский район. Ростовская область, Россия,
E-mail:nadya.shirockowa@yandex.ru
**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА
ГЕНА ГОРМОНА РОСТА**

В работе представлены результаты полиморфизма гена GH у овец сальской породы, разводимых в Ростовской области (Россия). Анализ полиморфизма гена GH проводили методом ПЦР-ПДРФ (полимеразной цепной реакции - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Для рестрикции амплифицированного фрагмента использовали эндонуклеазу HaeIII. Мясные качества учитывали по результатам контрольного убоя баранчиков в возрасте 10 мес. (n=50) по следующим показателям: предубойная масса (кг), масса мякоти (полутуши) (кг), убойная масса (кг), убойный выход (%), масса внутренних органов (селезенка, легкие, сердце, печень, почки) (г). У овец сальской породы определены генотипы AA, AB и BB с частотой 57, 36 и 7% соответственно. Установлено положительное влияние гетерозиготного генотипа AB/GH на откормочные и мясные качества овец.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ОВЦЫ, САЛЬСКАЯ ПОРОДА, GH, HAEIII, ПОЛИМОРФИЗМ

UDC 636.3

Kolosov A.Yu., Dr Agr. Sci.;
Kobylyazki P.S., Cand. Agr. Sci.;
Shirokova N.V., Cand. Biol. Sci.;
Getmanceva L. V., Cand. Agr. Sci.;
Bakoyev N.F., Postgraduate,
Donskoy State Agrarian University,
Village of Persianovskii, Oktyabrskii district, Rostov region, Russia,
E-mail:nadya.shirockowa@yandex.ru
**BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF STUDY OF GROWTH HORMONE
GENE POLYMORPHISM**

The article presents the results of analysis of the Salsk sheep' GH gene polymorphism (the sheep is bred in the Rostov Region, Russia). The study of the GH gene polymorphism was carried out in accordance with the method of polymerase chain reaction - polymorphism of restriction fragments' length. Endonuclease HaeIII was used for restriction of amplicated fragment. Meat qualities were registered in accordance with the results of the check slaughter of young sheep 10 months of age (n=50) using the following characteristics: weight before slaughter (kg), weight of flesh (half carcass) (kr), slaughter weight (kg), slaughter output (%), weight of internals (spleen, lungs, heart, liver, kidneys) (g). During the experiment the AA, AB, and BB genotypes of the Salsk sheep were identified at a frequency of 57, 36, and 7% correspondently. It was found out that heterozygous genotype AB/GH had positive effect on feeding and meat qualities of sheep.

KEYWORDS: BIOTECHNOLOGICAL METHODS, SHEEP, SALSK BREED, GH, HAEIII, POLYMORPHISM

В настоящее время возрастает интерес к технологиям, основанным на использовании ДНК-маркеров, которые находят широкое применение в национальных селекционных программах ряда стран с развитым животноводством и оказывают значительное воздействие на улучшение состава туши, качество мяса и эффективность производства мяса (Колосов Ю.А., Широкова Н.В., 2013).

Все большую популярность приобретают генетические маркеры, взаимосвязанные с генами (гены-кандидаты), белковый продукт которых играет значительную роль в формировании или регуляции биохимических и физиологических процессов (Колосов Ю.А. 2012; Kolosov Yu A, Getmantseva LV, Shirokova NV, Klimenko A, Bakoev SYu, et al., 2015).

Сам ген при этом должен обладать различными аллельными вариантами (полиморфизмом), которые связаны с вариативностью уровня продуктивности (NoorRR, Djajanegara 2001).

Среди прочих одним из перспективных генов-кандидатов является ген гормона роста (GH). Гормон роста, соматотропный гормон, обладает широким спектром биологического действия, влияя на все клетки организма. Он усиливает биосинтез белка, ДНК, РНК и гликогена и в то же время способствует мобилизации жиров из депо и распаду высших жирных кис-

лот и глюкозы в тканях. Помимо активации анаболических процессов, сопровождающихся увеличением размеров тела, стимуляцией роста скелета, соматотропин, кроме того, координирует и регулирует скорость протекания обменных процессов (Malewa A.D. 2014).

Гормон роста – белок с молекулярной массой около 22000, его полипептидная цепь состоит из 191 аминокислотного остатка. Полиморфизм гена, расположенного в 3 экзоне, может быть определен методом ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеазы рестрикции *HaeIII*.

В связи с этим, целью нашей работы было изучение полиморфизма гена GH/*HaeIII* и определение ассоциативных связей с ростовыми и мясными признаками у сальской породы овец, разводимой в Ростовской области.

Методика. Материалом исследований служили овцы сальской породы (n=84), разводимой в Ростовской области, Россия. Для проведения молекулярно-генетических исследований у животных были отобраны образцы ткани с ушной раковины площадью 1 см². ДНК выделяли с применением набора реагентов D1Atom DNA Prep 100 (ООО «НПФ Генлаб»). Анализ проводили методом ПЦР-ПДРФ (полимеразной цепной реакции - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Специальные олигонуклеотидные праймеры представлены в таблице 1.

Таблица 1

Последовательность олигонуклеотидных праймеров

Ген	Праймер	Длина фрагмента, н.п.
GH/ <i>HaeIII</i>	5'- GGAGGCAGGAAGGGATGAA -3' 5'-CCAAGGGAGGGAGAGACAGA-3'	934

Условия ПЦР: предварительная денатурация при 95°C - 5 мин. и далее 33 цикла: 95°C – 45 с, 60°C - 45 с, 72°C - 45с; заключительный синтез при 72°C - 10 мин. Рестриктию амплифицированного фрагмента проводили эндонуклеазой *HaeIII*. Наличие 10 сайтов рестрикции соответствовало аллелю А, наличие 11 сайта аллелю В. Размер полученных рестрикционных фрагментов определяли методом электрофореза в 4%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

По результатам молекулярно-генетического анализа устанавливали наличие и частоту аллелей и генотипов (Nei&Kumar, 2000). Влияние генотипов гена GH/*HaeIII* на скорость роста учитывали у баранчиков (n=84) по следующим показателям: вес при рождении (кг), вес при отъеме в 2 мес. (кг) и среднесуточный прирост веса животного со дня рождения до 2 месяцев (кг). Мясные качества учитывали по результатам контрольного убоя баранчиков в возрасте 10 мес. (n=50) по следующим показателям:

предубойная масса (кг), масса мякоти (полутуши)(кг), убойная масса (кг), убойный выход (%), масса внутренних органов (селезенка, легкие, сердце, печень, почки) (г). Все исследуемые животные были одного года рождения и содержались в одинаковых условиях.

Результаты и обсуждение. На первом этапе в результате проведения молекулярно-генетических исследований у овец сальской породы были определены аллельные варианты гена *GH/NaеIII* (рис. 1) и уста-

новлены генотипы, представленные фрагментами: 277-, 202-, 110-, 100-, 94-, 68-, 49-, 22-, 8- и 4 н.п. генотип AA; 256-, 202-, 110-, 100-, 94-, 68-, 49-, 22-, 21-, 8- и 4 н.п. генотип BB и 277-, 256-, 202-, 110-, 100-, 94-, 68-, 49-, 22-, 21-, 8- и 4 генотип AB.

Частота встречаемости трех генотипов AA, AB и BB установлена в соотношении 57, 36 и 7%, соответственно (табл.2). В целом у сальской породы овец наибольшую частоту имел аллель A и гомозиготный генотип AA.

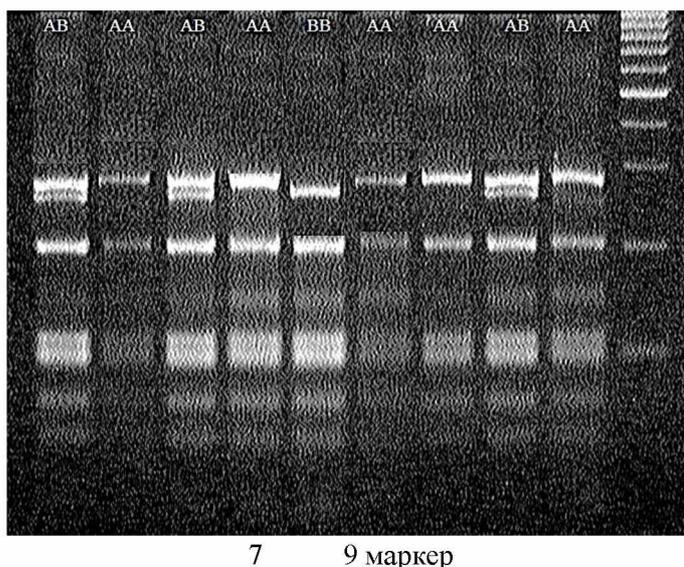


Рис. 1. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена *GH/NaеIII* в 4% агарозном геле. Генотип AA представлен фрагментами 277-, 202-, 110-, 100-, 94-, 68-, 49-, 22-, 8- и 4 н.п.; генотип BB - 256-, 202-, 110-, 100-, 94-, 68-, 49-, 22-, 21-, 8- и 4 н.п.; генотип AB - 277-, 256-, 202-, 110-, 100-, 94-, 68-, 49-, 22-, 21-, 8- и 4 н.п.

Таблица 2

*Частота аллелей и генотипов гена *GH/NaеIII* овец сальской породы*

Ген	Аллели		Генотипы, %		
	A	B	AA	AB	BB
<i>GH/NaеIII</i>	0.75	0.25	57	36	7

Проведение дальнейших исследований по изучению связи аллельных вариантов гена *GH/NaеIII* со скоростью роста показало, что наличие гетерозиготного генотипа AB у баранчиков сальской породы оказывает положительное влияние на

темпы роста молодняка. Живая масса при отъеме баранчиков с генотипом AB превосходила массу овец с генотипами AA и BB на 0.92 и 1.42 кг ($p \leq 0.05$) соответственно (табл.3).

Таблица 3

*Динамика роста овец сальской породы различных генотипов по гену *GH/NaеIII**

Генотипы	Вес при рождении, кг	Вес при отъеме, кг	Среднесуточный прирост, г
AA	4.01 ± 0.06	22.25 ± 0.17	303.50 ± 10.32
AB	3.91 ± 0.13	23.17 ± 0.45*	328.50 ± 6.32
BB	3.60 ± 0.17	21.75 ± 0.32	302.50 ± 11.17

* $p \leq 0.05$

Среднесуточный прирост у баранчиков с гетерозиготным генотипом АВ также был больше на 25.3 и 25.9 г ($p \leq 0.05$), по сравнению со сверстниками с генотипами АА и ВВ. Результаты контрольного убоя (табл.4) показали, что наилучшую мясную продуктивность имели баранчики генотипа АВ/ГН, которые достоверно превосходили аналогов генотипа АА/ГН практически по всем анализируемым признакам. Предубойная живая масса у баранчиков генотипа АВ/ГН была больше на 10.65 кг ($p \leq 0.01$), а также от них были получены большая масса туши на 4.97 кг ($p \leq 0.01$) и масса мякоти на 1.83 кг ($p \leq 0.05$). Убойная масса и убойный выход у баранчиков генотипа АВ/ГН превышали на 4.83 кг и 2.04%

соответственно данные показатели у баранчиков генотипа АА/ГН. Дополнительно была проведена оценка массы внутренних органов. В результате было определено, что наличие генотипа АВ у баранчиков связано с большей массой сердца и почек на 75.21 и 75.44 г ($p \leq 0.05$) соответственно. Достоверных различий по другим признакам (масса селезенки, легких и печени) установлено не было.

Таким образом, результаты ДНК-диагностики полиморфизма гена ГН показали, что лучшую живую массу при отъеме в 2 мес., среднесуточный прирост от рождения до отъема, а также предубойную массу и мясную продуктивность имели овцы генотипа АВ/ГН.

Таблица 4

Результаты контрольного убоя баранчиков различных генотипов гена ГН

Показатели	Генотип	
	АА	АВ
Предубойная живая масса, кг	36.05 ± 1.78	46.71 ± 2.85**
Масса туши (парной), кг	12.93 ± 1.24	17.92 ± 1.05**
Масса мякоти (полутуши), кг	4.02 ± 0.40	5.85 ± 0.75*
Убойная масса, кг	13.56 ± 1.54	18.4 ± 0.81**
Убойный выход, %	37.40 ± 0.72	39.44 ± 0.69*
Масса внутр. органов, г:		
селезенка	80.32 ± 20.81	80.23 ± 30.21
легкие	550.26 ± 32.01	550.86 ± 50.12
сердце	150.57 ± 18.32	225.78 ± 25.54*
печень	550.34 ± 50.35	600.87 ± 89.58
почки	200.12 ± 24.21	275.56 ± 25.12*

* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$

В проведенных нами исследованиях, у овец сальской породы гетерозиготный генотип также связан с лучшими среднесуточными приростами с рождения и до отъема в два месяца.

Подводя итог данной работы, нужно отметить, что впервые получены результаты полиморфизма гена ГН/НаеШу овец сальской породы, разводимых в Ростовской области (Россия) и выявлены достоверные ассоциации между генотипами гена ГН/НаеШ и селекционно-ценными признаками овец сальской породы.

Полученные результаты показали перспективность гена в качестве маркера откормочной и мясной продуктивности овец и дальнейшие исследования в данном направлении позволят разработать селекционные программы по совершенствованию сальской породы овец с учетом полиморфизма гена ГН/НаеШ.

Все это очередной раз подтверждает необходимость поиска и изучения ДНК-маркеров, ассоциированных с продуктивными качествами овец для большей эффективности селекционных работ и повышения рентабельности отрасли овцеводства.

Список литературы

1. Бараников, А. И. Создание новых мясных продуктов с использованием баранины / А. И. Бараников, Ю. А. Колосов, Н. В. Широкова // Научный журнал Кубанского ГАУ [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2013. - №05 (089). – Шифр Информрегистр: 0891305052. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2013/05/pdf/52.pdf>

2. Колосов, Ю.А. Мясные качества чистопородных и помесных баранчиков разного происхождения / Ю.А. Колосов, Н.В. Широкова // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2012. - №3. – С. 44-46.
3. Колосов, Ю.А. Использование генофонда мериносовых овец отечественной и импортной селекции для совершенствования местных мериносов / Ю.А. Колосов // Овцы, козы, шерстяное дело. - 2012. - №4. - С.13-16.
4. Широкова, Н.В. Генетическое детерминирование плодовитости овец / Н.В. Широкова // Молодой ученый. - 2013. - №6. - С. 785-787.
5. Hajihosseini A, Semsarnejad A, Abollow E, Hashrafi F and Negahdary M 2013 Effect of GH gene polymorphisms on biometric traits in Makooei sheep. *Annals of Biological Research* 4(6): 351-355. <http://scholarsresearchlibrary.com/ABR-vol4-iss6/ABR-2013-4-6-351-355.pdf>
6. Karagodina N., Y. Kolosov, A. Usatov, S. Bakoev, A. Kolosov, M. Leonova, N. Shirokova, A. Svyatogorova and L. Getmantseva, 2014. Influence of Various Bio-Stimulants on the Biochemical and Hematological Parameters in Porcine Blood Plasma. *World Applied Sciences Journal*, 30 (6): 723-726.
7. Kolosov Yu, L. Getmantseva, N. Shirokova. 2013. Sheep Breeding Resources in Rostov Region. *World Applied Sciences Journal*. 23(10). p. 1322-1324.
8. Kolosov Yu A, Getmantseva LV, Shirokova NV, Klimenko A, Bakoev S Yu, et al. (2015) Polymorphism of the GDF9 Gene in Russian Sheep Breeds. *J CytolHistol* 6:305. doi: 10.4172/2157-7099.1000305
9. Malewa A.D. 2014. SifatkualitatifeksternaldombaDonggalapadatigalokasi di Sulawesi Tengah. *Agrisains* 10(2): 101-109.
10. Mihailov N.V., L.V. Getmantseva., 2013. Association polymorphism in the POU1F1/MspI, PRLR/AluI и ESR1/PvuII gene with reproductive traits in Pigs. *European Applied Sciences*. 2. p.7-10.
11. Noor R R, Djajanegara A and SCHÜLER L 2001 Selection to improve birth and weaning weight of Javanese fat tailed sheep. *Arch. Tierz.*

Reference

1. Baranikov A. I., Kolosov Yu.A., Shirokova N.V. Sozdanie novykh myasnykh produktov s ispol'zovaniem baraniny (Use of Gene Pool of Merino Sheep of Native and Import Breeding for Improving Domestic Merino Sheep), A.I. Baranikov, *Nauchnyi zhurnal Kubanskogo GAU* [Elektronnyi resurs], Krasnodar: KubGAU, 2013, No 05 (089), Shifr Informregistra: 0891305052, Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2013/05/pdf/52.pdf>.
2. Kolosov, Yu.A., Shirokova, N.V. Mясные качества чистопородных и помесных баранчиков разного происхождения (Meat Qualities of Purebred and Cross-Bred Young Sheep of Different Origin), *Ovtsy, kozy, sherstyanoє delo*, 2012, No 3, PP. 44-46.
3. Kolosov, Yu.A. Ispol'zovanie genofonda merinovovykh ovets otechestvennoi i importnoi seleksii dlya sovershenstvovaniya mestnykh merinov (Use of Gene Pool of Merino Sheep of Native and Import Breeding for Improving Domestic Merino Sheep), *Ovtsy, kozy, sherstyanoє delo*, 2012, No 4, PP.13-16.
4. Shirokova, N.V. Geneticheskoe determinirovanie plodovitosti ovets (Genetic Determination of Sheep Breeding Power), *Molodoi uchenyi*, 2013, No 6, PP. 785-787.
5. Hajihosseini A, Semsarnejad A, Abollow E, Hashrafi F and Negahdary M 2013 Effect of GH gene polymorphisms on biometric traits in Makooei sheep. *Annals of Biological Research* 4(6): 351-355. <http://scholarsresearchlibrary.com/ABR-vol4-iss6/ABR-2013-4-6-351-355.pdf>
6. Karagodina N., Y. Kolosov, A. Usatov, S. Bakoev, A. Kolosov, M. Leonova, N. Shirokova, A. Svyatogorova and L. Getmantseva, 2014. Influence of Various Bio-Stimulants on the Biochemical and Hematological Parameters in Porcine Blood Plasma. *World Applied Sciences Journal*, 30 (6), 723-726.
7. Kolosov, Yu., L. Getmantseva, N. Shirokova. 2013. Sheep Breeding Resources in Rostov Region. *World Applied Sciences Journal*. 23(10). r. 1322-1324.
8. Kolosov, Yu., A. Getmantseva, LV, Shirokova NV, Klimenko A, Bakoev S Yu, et al. (2015) Polymorphism of the GDF9 Gene in Russian Sheep Breeds. *J CytolHistol* 6:305. doi: 10.4172/2157-7099.1000305
9. Malewa A.D. 2014. SifatkualitatifeksternaldombaDonggalapadatigalokasi di Sulawesi Tengah. *Agrisains* 10(2): 101-109.
10. Mihailov N.V., L.V. Getmantseva., 2013. Association polymorphism in the POU1F1/MspI, PRLR/AluI и ESR1/PvuII gene with reproductive traits in Pigs. *European Applied Sciences*. 2. p.7-10.
11. Noor R R, Djajanegara A and SCHÜLER L 2001 Selection to improve birth and weaning weight of Javanese fat tailed sheep. *Arch. Tierz.*