

7. Совершенствование В12 витаминного питания телочек, идущих на воспроизводство / И. С. Серяков [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сб. науч. тр. – Горки, 2014. – Вып. 17, ч. 1. – С. 162-168.
8. Серяков, И. С. Влияние минеральной добавки трепела на продуктивность и обмен веществ молодняка крупного рогатого скота второго периода выращивания / И. С. Серяков // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сб. науч. тр. – Горки, 2013. – Вып. 12, ч. 2. – С. 278-285.

УДК 636.2.034.636.087.7

МЕТОДИКА ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КУР ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ ПО ГЕНУ ГОРМОНА РОСТА

Н. М. Юрага, В. Ю. Горчаков, О. А. Епишко

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,
г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: gorchakow@rambler.ru)

Ключевые слова: ген гормона роста, куры, аллель, генотип, продуктивность.

Аннотация. Разработана и адаптирована методика, позволяющая определить и изучить полиморфизм гена гормона роста у кур отечественной селекции яичного направления продуктивности. Результаты исследований показали, что в линиях кур распределение генотипов по гену гормона роста составило: AA – 46,43 %; AB – 32,14 %; BB – 3,57 %; CC – 10,71 %; AC – 1,43 %.

METHOD OF GENOTYPING CHICKENS OF DOMESTIC SELECTION ACCORDING TO THE GROWTH HORMONE GENE

N. M. Yuraga, V. Yu. Gorchakov, O. A. Epishko

EI «Grodno state agrarian university»
Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 230008, Grodno,
28 Tereshkova str.; e-mail: gorchakow@rambler.ru)

Key words: genes growth hormone, chickens, allele, genotype, productivity.

Summary. A technique has been developed and adapted to determine and study the polymorphism of the growth hormone gene in chickens domestic selection of egg direction of productivity. The results of the studies showed that in the lines of chickens among homozygotes the AA genotype occurs with the highest frequency – 46,43 %; AB – 32,14 %; BB – 3,57 %; CC – 10,71 %; AC – 1,43 %.

(Поступила в редакции 21.06.2022 г.)

Введение. Новые методы молекулярной биологии позволяют обнаруживать полиморфизм локусов кодируемых белками генов,

связанных с продуктивными признаками животных и птиц. Эти локусы могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров в программах селекции для улучшения определенных признаков. Наибольший интерес для выявления взаимосвязи различных генов с хозяйственно полезными признаками представляют варианты генетического полиморфизма, находящихся в генах и регуляторных областях (РТ_регионы) и отвечающих за определенный признак. Использование генетического полиморфизма генов, отвечающих за продуктивность, может повысить интенсивность селекции и раскрыть генетический потенциал птиц. Основными показателями яичного птицеводства являются количество яиц, масса яиц и возраст достижения первого яйца. Цель промышленного птицеводства заключается в производстве большого количества яиц хорошего качества с низкой производительностью и затратами на корма. Именно поэтому на сегодняшний день так актуален вопрос поиска локусов количественных признаков, связанных с продуктивными признаками как сельскохозяйственных животных, так и птиц. Использование молекулярных маркеров в современной генетике позволяет значительно ускорить процесс селекции в сельском хозяйстве, как в животноводстве, так и в птицеводстве [1].

Метод генотипирования животных, в частности птицы, по генам, отвечающим за продуктивные качества, является мощным инструментом в селекционной работе. Взаимосвязь полиморфных вариантов генетической изменчивости и их использование в качестве генетических маркеров позволит повысить эффективность селекции кур яичного направления. На протяжении последних 10-15 лет проводятся исследования, направленные на изучение генома кур, выявление и идентификацию вариантов генетического полиморфизма, а также выявление взаимосвязи полиморфных вариантов генетической изменчивости с хозяйственно полезными признаками продуктивности. Неоднократно было доказано, что показатели продуктивности, а также репродуктивные качества животных и птиц напрямую зависят от генетических факторов [2].

Открытие и последующее использование для анализа полиморфных ДНК-фрагментов позволило получить данные о гетерогенности различных пород и популяций сельскохозяйственной птицы. На основе этих работ были сделаны выводы о происхождении разных групп кур, построены дендрограммы генетического сходства и определены генетические расстояния между популяциями. В то же время современные исследования направлены на поиск различных вариантов полиморфизма, которые могут оказаться связанными с хозяйственно полезными

признаками. У кур это особенно актуально, поскольку для них характерна быстрая смена поколений. Это дает селекционеру шанс получить эффект селекции в течение незначительного времени, если вести отбор по генам-кандидатам важных признаков [3].

В основе геномной селекции лежит изучение полиморфизма целевых генов, аллельные варианты которых связаны с продуктивными качествами животных. Аллельные варианты функциональных генов возникают в результате различных модификаций нуклеотидного состава, таких как точечные мутации (однонуклеотидный полиморфизм, single nucleotide polymorphism SNP), инсерции / делеции (indel) и т. д. В любом случае выявление полиморфизма и последующее изучение его корреляции с продуктивными признаками служат основой дальнейшей направленной селекции. Наиболее интересен поиск полиморфизма в генах, которые кодируют регуляторные белки, участвующие в контроле роста и дифференцировки, в частности гормоны. В свою очередь, физиологический эффект любого гормона напрямую зависит от его рецептора, что определяет целесообразность изучения полиморфизма генов, кодирующих как сами гормоны, так и их рецепторы [4].

Когда оба аллеля в паре совершенно одинаковы (например, ОО, АА), то такой генотип и его обладатель называются гомозиготным, а когда эти аллели разные (скажем, АО) – гетерозиготным [5].

Поиск взаимосвязи полиморфных вариантов генетической изменчивости с яичной продуктивностью кур и использование их в качестве генетических маркеров позволит повысить эффективность селекции кур яичной направленности. С этой точки зрения в генетике птицы в качестве одного из наиболее перспективного гена-кандидата для изучения полиморфизма и связи аллельных вариантов с продуктивными качествами птицы рассматривают ген гормона роста (GH) [6].

Гормон роста относится к классу пептидных гормонов с широким спектром регулируемых функций. Так, гормон роста принимает непосредственное участие в регуляции роста и дифференцировки различных типов тканей организма. Гормон пролактин, являясь пептидным гормоном, оказывает серьезное влияние на обменные процессы в организме млекопитающих и птиц благодаря своей ростовой, анаболической, гипергликемической и лактогенной активности [7].

Ген гормона роста (GH), расположенный в 27-й хромосоме, содержит 5 экзонов, 4 интрона при общей длине ~4,35 т. п. н. Показано наличие различных SNP (G662A, T3094, C3199T и т. д.) в разных участках гена (интроны, экзоны и т. д.). Выявлена связь аллельных вариантов с продуктивными признаками [8].

Целью наших исследований является разработка и адаптация методики, позволяющей определить и изучить полиморфизм гена гормона роста у кур отечественной селекции яичного направления продуктивности.

Материал и методика исследований. Исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «Гродненский государственный аграрный университет». В лаборатории имеется современный генетический анализатор для расшифровки ДНК (3500 Applied Biosystems); ДНК-амплификаторы для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР); спектрофотометр Implen Nano Photometer P-Class, позволяющий исследовать сверхмалые объемы образцов (до 0,3 мкл); для анализа концентрации нуклеиновых кислот и белков, скорости роста бактерий, кинетики реакции имеется система гель-документирования GelDoc XR+; приборы для детекции хемилюминесцентных красителей или 2D-гелей высокого разрешения, вестерн-блоттинга, 2D-электрофореза, дот-блоттинга, денситометрии. Все оборудование сертифицировано в Республике Беларусь и соответствует международным стандартам.

В качестве объекта исследований использовали птицу кросса Беларусь коричневый (линии K1, K3 и K4). Для исследований было отобрано 140 проб крови птицы. Кровь отбирали из гребня с помощью скарификатора на стерильную фильтровальную бумагу. ДНК из опытных образцов выделяли с помощью коммерческого набора для очистки ДНК «Арт ДНК». Концентрация выделенных нуклеиновых кислот регистрировалась с помощью спектронанофотометра Implen P330. Амплификацию гена гормона роста проводили с помощью синтетических олигонуклеотидов, имеющих следующую последовательность:

GH – F: 5'- ATCCCCAGGCAAACATCCTC-3';

GH – R: 5'- CCTCGACATCCAGCTCACAT-3'.

ПЦР-программа: «горячий старт» – 4 минуты при 94 °С; 35 циклов: денатурация – 1 минута при 94 °С, отжиг – 45 секунд при 54 °С, синтез – 30 секунд при 72 °С; достройка – 10 минут при 72 °С.

Амплификацию гена GH проводили с использованием реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащую: 1xTaq-буфер, 0,2 mM dNTP's, 2 mM MgCL₂, 500-1000 pM каждого праймера, концентрация Taq ДНК-полимеразы, 1 ед. геномной ДНК.

Продукт амплификации разделяли в 2%-м агарозном геле (аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по длине, основан на разной скорости движения фрагментов разной длины при движении в геле под действием внешнего электрического поля) в течение 50 минут, используя напряжение 110 В.

Дальнейший анализ аллельных вариантов гена проводили с помощью эндонуклеазной рестриктазы MspI. Продукт амплификации расщепляли рестриктазой, смесь инкубировали при температуре 37 °С в течении 12-16 ч, после чего разделение продуктов рестрикции проводили в 3%-м агарозном геле при напряжении 130 В.

Визуализацию полученных результатов проводили с использованием гель-документирующей системы GelDoc XR+, Bio-Rad. Наличие того или иного аллеля определяется присутствием цитозина или тимина в сайте рестрикции. У гена гормона роста (GH) (1-й интрон) возможны три аллеля. Для аллеля А характерно наличие одного сайта рестрикции, для аллеля В – двух, для аллеля С – трех. При расщеплении продуктов амплификации гена гормона роста распознавались следующие генотипы: АА – 539/237 п. н., ВВ – 392/237 и 147 п. н., СС – 267/237/147 и 125 п. н., АВ – 539/392/237 и 147 п. н., АС – 267/237/147 и 125 п. н., ВС – 267/237/147 и 125 п. н.

Результаты исследований и их обсуждение. По результатам оценки Msp-полиморфизма в 1-м интроне гена гормона роста в изученной популяции кур имелись особи пяти (из шести возможных) генотипов – АА, АВ, ВВ, СС, АС. Хотелось бы отметить, что в изученной популяции отсутствовали особи с генотипом ВС.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов рестрикции первого интрона гена гормона роста.

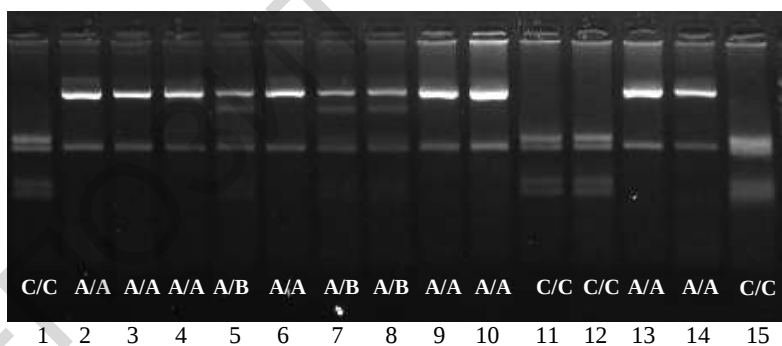


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов рестрикции первого интрона гена гормона роста у кур отечественной селекции; 1-15 – номера лунок; А/А, А/В, С/С – генотипы

Анализ полиморфизма кур отечественной селекции по гену гормона роста показал, что в линиях кур частота встречаемости генотипов по гену гормона роста составила: АА – 49,43 %, АВ – 34,86 %, ВВ – 3,57 %, СС – 10,71 % и АС – 1,43 % (рисунок 2).

Таким образом, у птицы яичного направления наибольшую частоту встречаемости имел гомозиготный генотип АА, наименьшую — генотипы ВВ и АС.

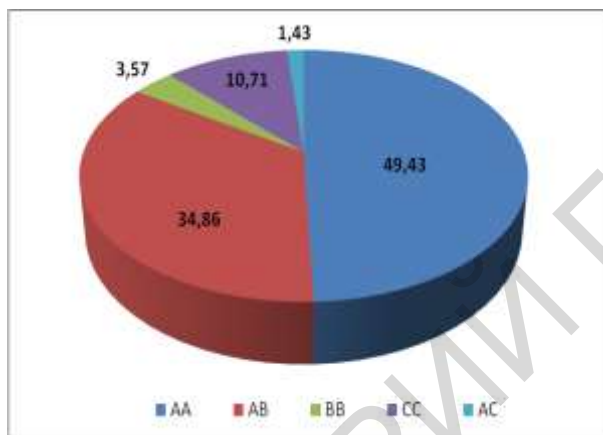


Рисунок 2 – Частота встречаемости генотипов, %

Частота встречаемости аллелей GHA, GHB и GHC составила соответственно 0,625; 0,196 и 0,072. При этом в популяции выявлено нарушение генетического равновесия в сторону преобладания особей с аллелем GHA, что связано с проведением преимущественной селекции птицы на увеличение яичной продуктивности.

При анализе полиморфизма в 1-м интроне гена гормона роста в исследуемой популяции кур был определен аллель С в гетерозиготном состоянии (АС), при этом его частота составила 0,072. Следует отметить тот интересный факт, что как таковой аллель С, согласно данным специальной литературы, практически полностью отсутствует в популяциях коммерческих линий, однако присутствует у некоторых аборигенных пород (причем, аборигенные породы часто являются носителями редких и исчезающих генов, отсутствующих у заводских пород) [9, 10].

Заключение. В результате проведенных исследований разработана и адаптирована методика генотипирования птицы отечественной селекции по гену гормона роста, позволяющая изучить генетическую структуру птицы и прогнозировать их дальнейшую продуктивность с учетом генотипа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алтухов, Ю. П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю. П. Алтухов, Е. А. Салменкова // Генетика, 2002. – Т. 38. – С. 1173-1195.

2. Nie, Q. The PIT1 gene polymorphisms were associated with chicken growth traits / Q. Nie, M. Fang, L. Xie, M. Zhou, Z. Liang, Z. Luo, G. Wang, W. Bi, C. Liang, W. Zhang, X. Zhang // BMC Genetics, 2008. – С. 20.
3. Дементьева, Н. В. Полиморфизм в промоторе гена пролактина и его ассоциация с направлением продуктивности у кур / Н. В. Дементьева, А. А. Крутикова // Научный журнал КубГАУ. – № 111 (07). – 2015. – С. 4.
4. Кулибаба, Р. А. Полиморфизм генов гормона роста, рецептора гормона роста, пролактина и рецептора пролактина в связи с яичной продуктивностью у кур породы полтавская глинистая / Р. А. Кулибаба // Сельскохозяйственная биология. – Том 50. – № 2. – 2015. – С. 198-207.
5. Что такое гомозиготный и гетерозиготный генотип [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://unotices.com/answer-u/21172>. – Дата доступа: 30.05.2022.
6. Полиморфизм гена пролактина у кур и петухов отечественной селекции / Н. М. Юрага [и др.] // Сборник научных статей по материалам XXIV международной научно-практической конференции «К 70-летию образования университета» (Ветеринария, зоотехния), г. Гродно 2021. – С. 214-216.
7. Kansaku, N. Prolactin and growth hormone in birds: protein structure, gene structure and genetic variation. / N. Kansaku, G. Hiyama, T. Sasanami, D. Zadworny // The Journal of Poultry Science, 2008, 45. – P. 1-6.
8. Nie, Q. Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth –correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. / Q. Nie, M. Lei, J. Ouyang, H. Zeng, G. Yang, X. Zhang // Genet. Sel. Evol., 2005. 37. – P. 339-360.
9. Ip, S.C.Y. Genomic growth hormone gene polymorphisms in native Chinese chickens. / S.C.Y. Ip, X. Zyang, F.C. Leung // Exp. Biol. Med. 2001, 226(5). – P. 458-462.
10. Аборигенная порода [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki>. – Дата доступа: 30.05.2022.

УДК 636.22/.28.082.4

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ ФЕРТИЛЬНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Е. И. Юрченко, О. В. Вертинская

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,
г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: elurch1986@mail.ru)

Ключевые слова: коровы, полиморфизм, фертильность, методика, ПЦР-анализ.

Аннотация. Экспериментально смоделирована и отработана методика определения полиморфизма генов *APAF1*, *SMC2*, *GART*, *PROV*, ассоциированных с гаплотипами фертильности (определяющих фертильность) крупного рогатого скота, разводимого в Республике Беларусь. В результате проведенного генотипирования коров голштинской породы молочного направления продуктивности отечественной селекции были выявлены носители всех вышена-