

МЕТОДЫ ПЦР-ПДРФ ГЕНОВ CAST, IGFBP-3 И GDF9 В ИССЛЕДОВАНИИ ОВЕЦ ТУВИНСКОЙ КОРОТКОЖИРНОХВОСТОЙ ПОРОДЫ

Ю.А. ЮЛДАШБАЕВ¹, К.А. КУЛИКОВА¹, М.И. ДОНГАК², С.А. ХАТАТАЕВ³,
Л.А. КАЛАШНИКОВА³, Я.А. ХАБИБРАХМАНОВА³, И.Ю. ПАВЛОВА³

(¹РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; ²Тувинский государственный университет;
³Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела)

Представлены результаты работы по выявлению полиморфизма некоторых генов-маркеров (CAST, IGFBP-3, GDF9) хозяйственно-полезных признаков овец (качество мяса, живая масса, характеристики плодовитости и т.д.). Тувинская короткожирнохвостая порода овец – уникальная местная порода, получившая историческое распространение на территории современной Республики Тыва и некоторых сопредельных регионах. В настоящее время отрасль овцеводства в Тыве имеет экстенсивный характер и во многом является традиционной для коренного населения республики. Применение ДНК-маркирования рассматривается как один из возможных путей интенсификации данной отрасли. Согласно полученным сведениям, характер проявления полиморфных вариантов генов CAST и GDF9 позволяет предположить о возможности их дальнейшего использования при организации исследований, направленных на выявление взаимосвязи уровня продуктивности овец с выявляемыми генотипами.

Ключевые слова: овец, тувинская короткожирнохвостая порода овец, генетический полиморфизм, ПЦР-ПДРФ, ген-маркер, CAST, IGFBP-3, GDF9.

Введение

Овцеводство – одна из важнейших отраслей животноводства. Современное российское овцеводство является экстенсивной, в большинстве случаев исключительно традиционной для многих регионов страны отраслью. В настоящее время остро стоит вопрос внедрения новейших технологий в различные отрасли животноводства с целью оптимизации процессов производства продукции разных видов, повышения экономической эффективности. Отечественное овцеводство, важным аспектом деятельности которого на современном этапе можно назвать оптимизацию использования поголовья имеющихся пород овец и их рациональное использование, не является исключением [8].

Одной из важнейших представителей отечественных аборигенных пород овец является тувинская короткожирнохвостая порода. Данная порода получила историческое распространение на территории современной Республики Тыва, также более ограниченно распространена на территории Республики Хакасия и Республики Алтай. Уникальные качества, присущие овцам тувинской короткожирнохвостой породы, обуславливают малую требовательность животных к условиям содержания. Овцы данной породы сочетают в себе хорошие мясные качества и высокую приспособленность к условиям резко континентального климата Тувы, неприхотливость к кормовым ресурсам, способность к тебенёвке, выносливость при перегонах на большие расстояния [8]. Данные хозяйственно-биологические особенности породы об-

улавливают возможность отказа от использования капитальных строений и сложного технологического оборудования в производстве [2], что позволяет экономить ресурсы хозяйств и способствует поддержанию распространения традиционного для республики кочевого типа ведения сельского хозяйства.

Порода включает в себя 2 внутривидовых типа: степной и горный [3]. Живая масса взрослых представителей породы: бараны – 55-76 кг, матки – 42-56 кг. Настриг мытой грубой неоднородной шерсти составляет в среднем 1,0-1,5 кг. Длина шерсти 12–14 см. Плодовитость сравнительно небольшая и составляет 100–110% [8].

Применение ДНК-маркирования в овцеводстве – один из способов возможной интенсификации отрасли. Во многих прочих отраслях животноводства, особенно за рубежом, давно ведутся исследования, направленные на поиск генетических маркеров разных типов, формирование тест-систем для внедрения в производство и позволяющих решить целый ряд важных для практического животноводства вопросов: прогнозирование уровня продуктивности сельскохозяйственных животных, организация грамотного отбора ценных представителей и совершенствование племенной работы, формирование стад животных с определенными признаками и пр. [8].

Практическая польза генотипирования сельскохозяйственных животных заключается в возможности прогнозирования уровня продуктивности сельскохозяйственных животных. С самого раннего возраста, когда продуктивные признаки находятся в стадии формирования и не проявлены в полную силу, можно оптимизировать условия содержания и кормления в отношении потенциальных ценных животных.

Одним из удобных методических решений вопросов разработки и применения системы ДНК-маркирования сельскохозяйственных животных является применение метода ПЦР-ПДРФ.

Полимеразная цепная реакция – метод молекулярной биологии, предложенный К. Mullis et al. в 1986 году, с успехом используемый в самых различных областях современных наук [17]. В основе ПЦР заложен принцип репликации ДНК, заложенный в природных живых системах. Однако в данном случае речь идет об избирательном копировании выборочных, относительно коротких фрагментов ДНК, необходимых для исследования [7, 17].

ПЦР-ПДРФ – удобный метод, хорошо зарекомендовавший себя в исследованиях, направленных на выявление точковых мутаций, основой которого является выявления полиморфизма последовательности нуклеотидов ДНК на основе способности ферментов – эндонуклеаз рестрикции разрезать цепь ДНК в специальных сайтах узнавания фермента [6, 7]. В случае возникновения нуклеотидных замен в сайте рестрикции узнавания не происходит и меняется характер разрезания цепочки ДНК, что может быть успешно детектировано в процессе электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Метод достаточно точен, в настоящее время существует большое количество эндонуклеаз рестрикции, что позволяет подобрать тест-систему под множество интересующих полиморфных вариантов.

Гены кальпастина (CAST), дифференциального фактора роста (GDF9), белка 3 типа, ингибирующего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-3) являются одними из перспективных генов-кандидатов (маркеров), связанных со многими хозяйственно-полезными признаками, уровень проявления которых напрямую связан с экономическим успехом овцеводства [1, 7].

Ген кальпастина (CAST) рассматривается в качестве одного из перспективных маркеров по набору живой массы и качества мяса овец [1, 11]. По некоторым данным, мясо овец тувинской короткожирнохвостой породы обладает уникальными органолептическими свойствами [4]. Получение сведений о взаимосвязи качественных характеристик получаемой баранины с аллельными вариантами маркерных генов открывает

возможность практики раннего выявления перспективных животных, оптимизации условий их кормления и содержания, совершенствования менеджмента отрасли.

Ген кальпастина определен у овец на 5 хромосоме [10]. Изначально полиморфизм данного гена у овец был изучен в 1998 году с помощью метода ПЦР-ПДРФ у овец породы Dorset Down [18].

В качестве одного из перспективных генов-маркеров хозяйственно-полезных признаков, который в настоящее время рекомендован к использованию в исследованиях как маркер воспроизводительной продуктивности овец, рассматривается ген дифференциального фактора роста (GDF9) [14].

В его структуре определены восемь точечных мутаций (G1-G8), пять из которых приводят к аминокислотным заменам в конечном белковом продукте (G1, G4, G6, G7, G8) [5]. Согласно данным Hanrahan J.P. et al., ген GDF9 был определен у овец на 5-й хромосоме, его протяженность составляет приблизительно 2,5 т.н.п. [12].

Ген белка 3 типа, ингибирующего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-3) – это потенциальный маркерный ген, связанный с ростом и развитием животных [15]. Относится к структурным генам, ответственен за проявление активности инсулиноподобных факторов роста. Как известно, IGF-I и IGF-II являются гормонами ответственными за процессы роста и регенерации у млекопитающих, принимают участие в развитии молочной железы [13]. Предположительно, изменение принципа функционирования молекулы IGFBP-3 может сказываться на процессах роста и развития животных. Полиморфизм данного гена изначально активно изучался у крупного рогатого скота, буйволов [15]. Особенности структуры данного гена у овец исследованы недостаточно. Имеется информация о мономорфном характере структуры некоторых участков данного гена [9, 19].

Цель работы – оптимизация протоколов проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования поголовья овец по генам кальпастина (CAST), дифференциального фактора роста (GDF9), белка 3 типа, ингибирующего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-3), применительно к овцам тувинской короткожирнохвостой породы. Примечательно, что ранее исследований подобного рода на овцах данной породы не проводилось.

Материал и методика исследования

В работе использовали образцы крови, отобранные в пробирки с напылением ЭДТА, у овец тувинской короткожирнохвостой породы, происходящих из ведущих хозяйств Республики Тыва. Образцы крови замораживали при $-20...25^{\circ}\text{C}$ сразу после забора для оптимальной сохранности образцов и в замороженном виде доставляли в лабораторию. Для выделения геномной ДНК использовали коммерческий набор «ДНК-Экстран-1» (ЗАО «Синтол», г. Москва), процедуру экстракции ДНК проводили в строгом соответствии с протоколом выделения, представленного фирмой-производителем.

При подборе пар праймеров для реакций, а также условий проведения амплификации учитывался опыт предыдущих исследований [9, 14, 16, 19, 20].

Для каждой реакции использовались индивидуальные ранее апробированные в аналогичных исследованиях и рекомендованные к использованию условия.

Условия реакции амплификации для получения участка гена GDF9: первоначальная денатурация – 2 мин при 94°C ; денатурация 94°C – 30 с, отжиг 63°C – 40с, элонгация 72°C – 30 с (35 циклов), завершающая элонгация при 72°C – 4 мин.

Условия ПЦР для гена CAST: предварительная денатурация при 95°C – 3 мин., далее 35 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 40 с, 72°C – 30с; заключительный синтез при 72°C – 5 мин.

Реакцию для гена IGFBP-3 проводили следующим образом: первоначальная денатурация 94°C – 5 мин., денатурация 94°C – 60 с, отжиг 60°C – 60 с, синтез 72°C – 60 с (всего 35 циклов), завершающий синтез 72°C – 5 мин.

Рестрикцию амплифицированного фрагмента CAST проводили с помощью эндонуклеазы рестрикции MspI.

ПЦР-ПДРФ анализ фрагмента гена GDF9 осуществляли путем использования эндонуклеазы AspI.

Для детекции полиморфизма нуклеотидной последовательности получаемых в процессе амплификации фрагментов гена IGFBP-3 применяли эндонуклеазу рестрикции Hae III.

Рестрикцию во всех трех случаях проводили при температуре 37°C в течение 12–16 ч.

Все использованные в исследовании эндонуклеазы рестрикции произведены ООО «СибЭнзим-М».

Концентрацию агарозного геля для детекции продуктов амплификации и рестрикции выбирали исходя из получаемых фрагментов. Визуализацию проводили после окрашивания гелей бромистым этидием в УФ излучении.

Результаты исследований

CAST

Как уже было сказано ранее, ген кальпастина – хорошо известный потенциальный маркер мясных качеств овец, а также ответственный за качество мяса после убоя и созревания туши [11]. Используемый нами протокол хорошо зарекомендовал себя в предыдущих исследованиях.

Использовались следующие праймеры [7]:

CAST F: 5'-TGGGGCC CAATGACGCCATCGATG-3';

CAST R: 5'-GGTGGAGCAGCACTTCTGATCACC-3'.

В результате проведенной реакции был получен фрагмент гена размером 622 п.н. [10, 11] (рис. 1), рестрикция которого с помощью эндонуклеазы MspI позволила идентифицировать три генотипа: MM, MN и NN.

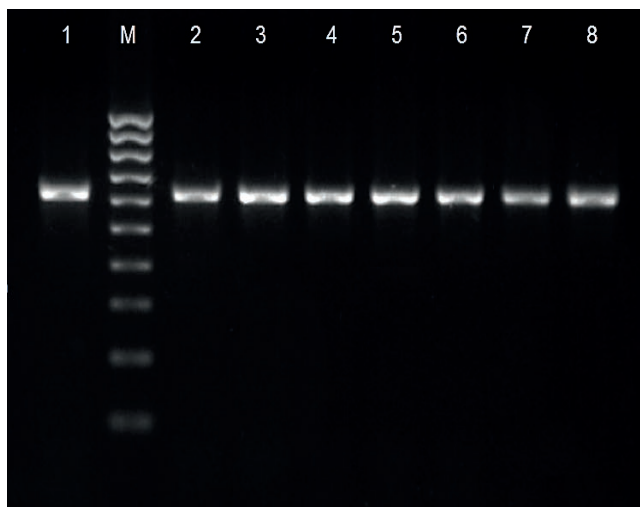


Рис. 1. Результаты ПЦР. Дорожки 1–8: амплифицированные фрагменты гена CAST размером 622 п.н., М – маркер молекулярных масс М100, 2% агарозный гель

Если более подробно говорить об архитектуре результатов электрофоретического разделения рестрикционных фрагментов, то стоит в первую очередь отметить, что аллель М характеризуется наличием сайта рестрикции в нуклеотидной последовательности исходного синтезированного участка гена. Благодаря этому возможно образование двух фрагментов длиной 336 и 286 п.н. после обработки образца эндонуклеазой MspI или ее аналогом (рис. 2).

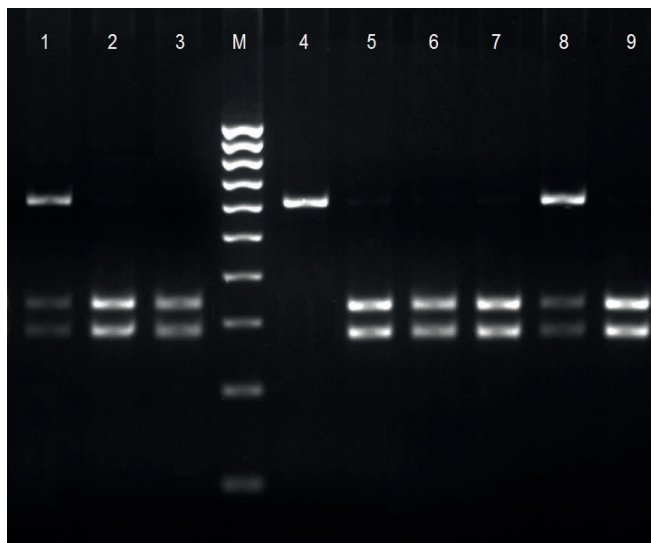


Рис. 2. Результаты рестрикционного анализа по выявлению генотипов: дорожки 1,8 – генотип М, дорожка 4 – генотип NN, дорожка 2, 3, 5, 6, 7 – генотип MM, М – маркер молекулярных масс М100, 2% агарозный гель

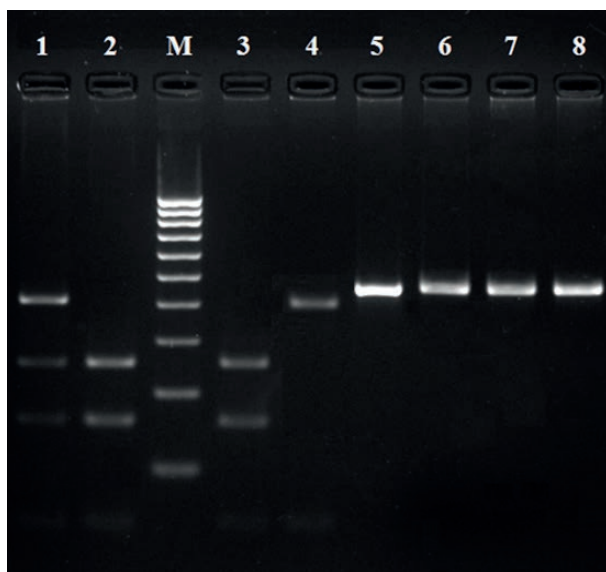


Рис. 3. Исходные амплифицированные фрагменты гена GDF9 (дорожки 5–8) и результаты их рестрикционного анализа: дорожка 1 – генотип CD (401, 254, 156 и 52 п.н.), дорожка 2, 3 – генотип CC (254, 156 и 52 п.н.), дорожка 4 – генотип DD, М – маркер молекулярных масс М100, 3% агарозный гель

В случае отсутствия сайта рестрикции длина фрагмента остается без изменения (622 bp), что соответствует генотипу NN. Носители гетерозиготного варианта генотипа MN характеризуются наличием фрагментов в 286, 336 и 622 п.н.

Полученные результаты полностью соответствуют данным, полученным в прошлых исследованиях [10, 11, 20].

GDF9

Получение необходимого участка гена GDF9 было возможно с применением следующей пары праймеров [14]:

GDF9-F: 5'-GAAGACTGGTATGGGGAAATG-3';

GDF9-R: 5'-CCAATCTGCTCCTACACACCT-3'.

В результате получен фрагмент гена, размер которого полностью соответствует заявляемому в предыдущих исследованиях (462 п.н.) [14, 16] (рис. 3).

Обработка получаемых фрагментов рестриктазой AspLEI позволила выявить его аллельные варианты. Обнаруженные аллели С и D обеспечивали наличие трех генотипов (рис. 3), характеризующихся присутствием на электрофореграмме рестрикционных фрагментов определенной длины. Генотип СС проявлял себя как комплекс фрагментов размером 254, 156 и 52 п.н., генотип CD – 401, 254, 156 и 52 п.н. Отличительная черта генотипа DD – наличие на электрофореграмме рестрикционных фрагментов ДНК размером 410 и 52 п.н. [16].

Сразу стоит отметить, что фрагменты размером в 52 п.н. могут быть плохо визуально различимы в зависимости от свойств и концентрации используемого агарозного геля.

IGFBP-3

Фрагмент последовательности гена для исследования получали с помощью следующей пары праймеров [9, 19]:

IGFBP-3-F: 5'- CCAAGCGTGAGACAGAATAC -3';

IGFBP-3-R: 5'- AGGAGGGATAGGAGCAAGAT -3'.

В ходе реакции получали фрагмент размером 654 п.н.

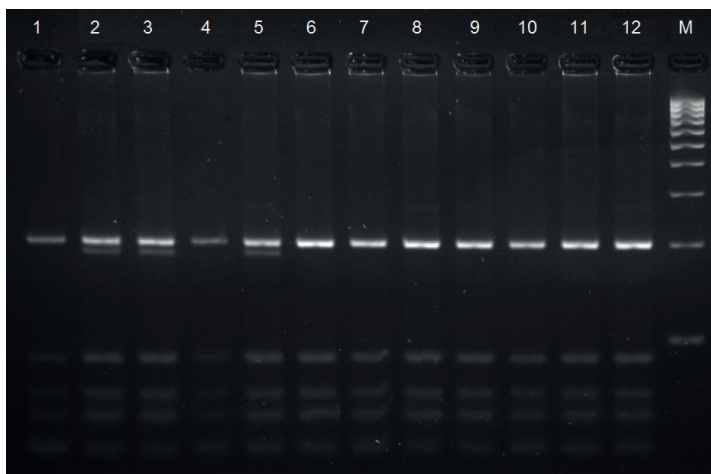


Рис. 4. Результаты рестрикции фрагмента гена IGFBP: дорожки 2, 3, 5 – вероятные полиморфные варианты (генотип BC), дорожки 1, 4, 6–12 – стандартные результаты анализа (генотип BB), М – маркер молекулярных масс М100, 4,5% агарозный гель

Изначально идея поиска полиморфных вариантов рассматриваемого гена у овец основана на полученных сведениях о наличии аллельных вариантов аналогичного участка рассматриваемого гена у крупного рогатого скота [15].

Использование эндонуклеазы рестрикции *NotI* в большинстве случаев позволило выявить следующие фрагменты: 201, 200, 87, 67, 56, 19, 16, 8 п.н., что соответствует генотипу BB. В редких случаях исследуемые представители породы имели генотип, электрофоретическая структура которого дополнительно включала в себя фрагмент размером на 20-30 п.н. меньше верхних элементов (рис. 4).

Материалы прошлых исследований указывают на мономорфный характер данного участка гена *IGFBP-3*. Однако стоит отметить, что представленные результаты получены на сравнительно небольшом поголовье овец. Так, А.А. EL-Hanafy и Н.Н. Salem получили сведения об отсутствии полиморфных вариантов гена *IGFBP-3* у четырех египетских пород овец, однако каждая порода была представлена группами, включающими в себя всего 5 представителей породы [9]. Другой научный коллектив подтвердил мономорфный характер исследуемого фрагмента гена путем проведения работы на трех группах овец разных пород, при этом каждая группа включала в себя 20 представителей [19].

В случае редкой встречаемости генотипа BC подобного количества животных в выборке может быть недостаточно для его выявления.

Заключение

Таким образом, изученные методы ПЦР-ПДРФ генов *CAST*, *GDF9* являются возможными для проведения генотипирования тувинской короткожирнохвостой породы овец. Однако по результату полученных данных, ген *IGFBP-3* требует дополнительных исследований.

Библиографический список

1. Дейкин А.В., Селионова М.И., Криворучко А.Ю., Коваленко Д.В., Трухачев В.И. Генетические маркеры в мясном овцеводстве // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2016. Т. 20. № 5. С. 576–583.
2. Донкова Н.В., Бэнь В., Лебедева Т.С. Тувинская короткожирнохвостая порода овец как источник получения высококачественной баранины // Проблемы современной аграрной науки. Материалы международной заочной научной конференции (15 октября 2015 г.). г. Красноярск, 2015. С. 41–43.
3. Дунин И.М. и др. Справочник пород и типов сельскохозяйственных животных, разводимых в Российской Федерации. Словарь терминов по разведению, генетике, селекции и биотехнологии размножения сельскохозяйственных животных. Перечень российских и международных организаций в сфере животноводства. – М.: ВНИИплем, 2013. 551 с.
4. Ерохин А.И., Ерохин. С.А. Овцеводство. М.: Изд-во МГУП, 2004. 480 с.
5. Колосов Ю.А., Гетманцева Л.В., Широкова Н.В. Полиморфизм гена (*GDF9*) у овец сальской породы // Ветеринарная патология, 2014. № 3–4 С. 78–81. Режим доступа: http://vetpat.ru/ru_RU/полиморфизм-гена-gdf9-у-овец-сальской-пор/, - свободный., дата обращения: 13.03.2018.
6. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи современной биологии, 2004. Т. 3. С. 260–271.
7. Широкова Н.В., Колосов Ю.А., Гетманцева Л.В., Радюк А.В., Бакоев Н.Ф. Оптимизация техники проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования

овец // Научный журнал КубГАУ. 2015. №113(09). Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2015/09/pdf/102.pdf>, – свободный, дата обращения: 20.02.2018.

8. 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.

9. EL-Hanafy A.A., Salem H.H. PCR-RFLP of IGFBP-3 gene in some Egyptian sheep breeds // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci, 2009. 5(1) P. 82–85.

10. Gábor M., Trakovická A., Miluchová M. Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method // Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol, 2009. №42 (2). P. 470–476.

11. Georgieva S., Hristova D., Dimitrova I., Stancheva N., Bozhilova-Sakova M. Molecular analysis of ovine calpastatin (CAST) and myostatin (MSTN) genes in Synthetic Population Bulgarian Milk sheep using PCR-RFLP // J. BioSci. Biotechnol, 2015. № 4 (1). P. 95–99.

12. Hanrahan J.P., Gregan S.M., Mulsant P., et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in cambridge and belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology Of Reproduction*, 2004. 70. P. 900–909.

13. Hossner K. L., McCusker R. H., Dodson M. V. Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. // *Animal Science*, 1997. 64. P. 1–15.

14. Kolosov Yu.A., Getmantseva L.V., Shirockova N.V. et al. Polymorphism of the GDF9 Gene in Russian Sheep Breeds // *J. Cytol. Histol*, 2015. 6: 305. doi:10.4172/2157-7099.1000305.

15. Kumar P., Choudhary V., Kumar K. G., Bhattacharya T.K., Bhushan B., Sharma A., Mishra A. Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies on IGFBP-3 gene in sheep and its comparison with cattle and buffalo // *Small Ruminant Research*, 2006. 64. P. 285–292.

16. Moradband F., Rahimi G., Gholizadeh M. Association of polymorphisms in fecundity genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with litter size in Iranian baluchi sheep // *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2011. Vol. 24. № 9. P. 1179–1183.

17. Mullis K., Erlich H., Faloona F., Horn G., Saiki R., Scharf S. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro – the polymerase chain reaction // *Cold Spring Harbor symp. Quant. Biol*, 1986. Vol. 51. P. 236–273.

18. Palmer B.R., Roberts N., Hickford J.G.H., Bickerstaffe R. Rapid communication: PCR-PFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene // *Journal of Animal Science*, 1998. 76. P. 1499–1500.

19. Shafey H.I., Mahrous K.F., Hassanane M.S., Abdel Mordyand M., Rushdi H.E. Genetic polymorphism of myostatin and insulin-like growth factor binding protein-3 genes in Egyptian sheep breeds // *Global Veterinaria*, 2014. 13 (3) P. 419–424.

20. Suleman M., Khan S.U., Riaz M.N., Yousaf M., Ishaq A.S.R., Ghafoor A. Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds // *Afr. J. Biotechnol*, 2012. 11 (47) P. 10655–10660.

PCR-RFLP METHODS OF CAST, GDF9 AND IGFBP-3 GENES IN THE STUDY OF TUVINIAN SHORT-FAT-TAILED SHEEP BREED

Yu.A. YULDASHBAEV¹, K.A. KULIKOVA¹, M.I. DONGAK², S.A. KHATATAYEV³,
L.A. KALASHNIKOVA³, Ya.A. KHABIBRAKHMANOVA³, I.Yu. PAVLOVA³

¹Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy;

²Tuvan State University; ³All-Russian Scientific Research Institute of Livestock Breeding)

The paper presents the research results on revealing the polymorphism of some marker genes (CAST, IGFBP-3, GDF9) of economically valuable traits of sheep (meat quality, live weight, fertility characteristics, etc.). The Tuvian short-fat-tailed sheep breed is a unique local breed that has been historically spread on the territory of the modern Tuva Republic and some neighbouring regions. At present, the sheep industry in the Tuva Republic has been developing in an extensive way and is rather traditional for the indigenous population of the Republic. The use of DNA markers is considered as one of the possible ways of intensifying this industry. According to the information obtained, the manifestation pattern of the polymorphic variants of the CAST and GDF9 genes suggests a possibility of their further use in the organization of studies aimed at identifying the relationship between the sheep productivity level and the genotypes detected.

Key words: sheep, Tuvian short-fat-tailed sheep, genetic polymorphism, PCR-RFLP, marker gene, CAST, IGFBP-3, GDF9.

References

1. Deykin A.V., Selionova M.I., Krivoruchko A.Yu., Kovalenko D.V., Trukhachev V.I. Geneticheskie markery v myasnom ovtsevodstve [Genetic markers in meat sheep breeding] // Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii, 2016. Vol. 20. No. 5. Pp. 576–583.
2. Donkova N.V., Ben V., Lebedeva T.S. Tuvinskaya korotkozhirovostaya poroda ovets kak istochnik polucheniya vysokokachestvennoy baraniny [The Tuvian short-fat-tailed sheep breed as a source of high-quality mutton production] // Problemy sovremennoy agrarnoy nauki. Materialy mezhdunarodnoy zaachnoy nauchnoy konferentsii (15 October 2015), Krasnoyarsk, 2015. Pp. 41–43.
3. Dunin I. M. et al. Spravochnik porod i tipov selskokhozyaystvennykh zhiivotnykh, razvodimykh v Rossiyskoy Federatsii. Slovar terminov po razvedeniyu, genetike, seleksii i biotekhnologii raznozheniya selskokhozyaystvennykh zhiivotnykh. Perechen rossiyskikh i mezhdunarodnykh organizatsiy v sfere zhiivotnovodstva [Handbook of breeds and types of farm animals bred in the Russian Federation. Glossary of terms on rearing, genetics, breeding and biotechnology of the reproduction of farm animals. List of Russian and international organizations involved in livestock breeding]. M.: VNIIPlem, 2013. 551 p.
4. Erokhin A. I., Erokhin. S. A. Ovtsevodstvo [Sheep Breeding]. M.: Izd-vo MGUP, 2004. 480 p.
5. Kolosov Yu.A., Getmantseva L.V., Shirokova N.V. Polimorfizm gena (GDF9) u ovets salskoy porody [Polymorphism of the gene (GDF9) in the sheep of the Salsk breed] // Veterinarnaya patologiya, 2014. No. 3–4 Pp. 78–81. Access mode: http://vetpat.ru/ru_RU/polimorfizm-gena-gdf9-u-ovets-salskoy-por/, – free access., access date: 13.03.2018.
6. Sulimova G.E. DNK-markery v geneticheskikh issledovaniyakh: tipy markerov, ikh svoystva i oblasti primeneniya [DNA markers in genetic studies: types of markers, their properties and areas of application] // Uspekhi sovremennoy biologii, 2004. Vol. No. 3. Pp. 260–271.

7. *Shirokova N.V., Kolosov Yu.A., Getmantseva L.V., Radyuk A.V., Bakyoev N.F.* Optimizatsiya tekhniki provedeniya PCR-PDRF dlya genotipirovaniya ovets [Optimization of PCR-RFLP technique for sheep genotyping] // Nauchnyy zhurnal KubGAU, 2015. No. 113 (09). Access mode: <http://ej.kubagro.ru/2015/09/pdf/102.pdf>, – free access, access date: 20.02.2018.
8. *Yuldashbaev Yu.A., Dongak M.I., Kulikova K.A.* Khozyaystvenno-poleznye priznaki u ovets tuvinskoy korotkozhirovostoy porody i perspektivy izucheniya polimorfizma genov [Economically valuable characteristics of sheep of the Tuvinian short-fat-tailed breed and the prospects] // Izvestiya Sankt-peterburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2016. No. 42. Pp. 141–148.
9. *EL-Hanafy A.A., Salem H.H.* PCR-RFLP of IGFBP-3 gene in some Egyptian sheep breeds // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci, 2009. 5 (1) Pp. 82–85.
10. *Gábor M., Trakovická A., Miluchová M.* Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method // Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol, 2009. No. 42 (2). Pp. 470–476.
11. *Georgieva S., Hristova D., Dimitrova I., Stancheva N., Bozhilova-Sakova M.* Molecular analysis of ovine calpastatin (CAST) and myostatin (MSTN) genes in Synthetic Population Bulgarian Milk sheep using PCR-RFLP // J. BioSci. Biotechnol, 2015. No. 4 (1). Pp. 95–99.
12. *Hanrahan J.P., Gregan S.M., Mulsant P., et al.* Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 2004. 70. Pp. 900–909.
13. *Hossner K.L., McCusker R.H., Dodson M.V.* Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. // *Animal Science*, 1997. 64. Pp. 1–15.
14. *Kolosov Yu.A., Getmantseva L.V., Shirokova N.V. et al.* Polymorphism of the GDF9 Gene in Russian Sheep Breeds // *J. Cytol. Histol.* 2015. 6: 305. doi:10.4172/2157-7099.1000305.
15. *Kumar P., Choudhary V., Kumar K. G., Bhattacharya T.K., Bhushan B., Sharma A., Mishra A.* Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies on IGFBP-3 gene in sheep and its comparison with cattle and buffalo // *Small Ruminant Research*, 2006. 64. Pp. 285–292.
16. *Moradband F., Rahimi G., Gholizadeh M.* Association of polymorphisms in fecundity genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with litter size in Iranian baluchi sheep // *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, 2011. Vol. 24. No. 9. Pp. 1179–1183.
17. *Mullis K., Erlich H., Faloona F., Horn G., Saiki R., Scharf S.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro – the polymerase chain reaction // *Cold Spring Harbor symp. Quant. Biol*, 1986. Vol. 51. Pp. 236–273.
18. *Palmer B.R., Roberts N., Hickford J.G.H., Bickerstaffe R.* Rapid communication: PCR-PFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene // *Journal of Animal Science*, 1998. 76. Pp. 1499–1500.
19. *Shafey H.I., Mahrous K.F., Hassanane M.S., Abdel Mordyand M., Rushdi H.E.* Genetic polymorphism of myostatin and insulin-like growth factor binding protein-3 genes in Egyptian sheep breeds // *Global Veterinaria*, 2014. 13(3). Pp. 419–424.
20. *Suleman M., Khan S.U., Riaz M.N., Yousaf M., Ishaq A.S.R., Ghafoor A.* Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds // *Afr. J. Biotechnol*, 2012. 11 (47). Pp. 10655–10660.

Юлдашбаев Юсупжан Артыкович – д. с.-х. н., проф., член-корр. РАН, декан факультета зоотехнии и биологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-02-36, e-mail: zoo@rgau-msha.ru).

Куликова Ксения Александровна – асп. кафедры частной зоотехнии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-02-36; e-mail: zoo@rgau-msha.ru).

Донгак Мария Ивановна – к. с.-х. н., доц. Тувинского государственного университета (667000, Республика Тыва, г. Кызыл, ул. Ленина, д. 36; тел./факс: 8 (39422) 2-19-69; тел.: (923) 268-24-83; e-mail: tgu@tuvsu.ru).

Хататаев Салауди Абдулхаджиевич – д. с.-х. н., проф., гл. науч. сотр. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела» (141212, Московская обл., Пушкинский р-н, пос. Лесные Поляны, ул. Ленина, стр. 13; факс: (495) 515-95-57, тел.: (903) 247-15-49; e-mail: vniiplem@mail.ru).

Калашникова Любовь Александровна – д. с.-х. н., проф., з ав. лабораторией ДНК-технологий ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела» (141212, Московская обл., Пушкинский р-н, пос. Лесные Поляны, ул. Ленина, стр. 13; факс: (495) 515-95-57, тел.: (903) 247-15-49; e-mail: vniiplem@mail.ru).

Хабибрахманова Язиля Аминовна – к. б. н., ст. науч. сотр. лаборатории ДНК-технологий ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела» (141212, Московская обл., Пушкинский р-н, пос. Лесные Поляны, ул. Ленина, стр. 13; факс: (495) 515-95-57, тел.: (903) 247-15-49; e-mail: vniiplem@mail.ru).

Павлова Ирина Юрьевна – к. б. н., ст. науч. сотр. лаборатории ДНК-технологий ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела» (141212, Московская обл., Пушкинский р-н, пос. Лесные Поляны, ул. Ленина, стр. 13; факс: (495) 515-95-57, тел.: (903) 247-15-49; e-mail: vniiplem@mail.ru).

Yusupzhan A. Yuldashbayev – DSc (Ag), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dean of the Faculty of Livestock Breeding Technology and Biology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; phone: +7 (499) 976-02-36; e-mail: zoo@rgau-msha.ru).

Kseniya A. Kulikova – a postgraduate student, the Department of Specific Livestock Breeding Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; phone: +7 (499) 976-02-36; e-mail: zoo@rgau-msha.ru).

Maria I. Dongak – PhD (Ag), Associate Professor; Tuvan State University (667000, Republic of Tyva, Kyzyl, Lenina Str., 36; phone/fax: +7 (39422) 2-19-69, phone: 8 (923) 268-24-83; e-mail: tgu@tuvsu.ru).

Salaudi A. Khatatayev – DSc (Ag), Professor, Key Research Associate, VNIIPlem (141212, Moscow region, Pushkin district, Lesnye Polyany, Lenina Str., 13; fax: +7 (495) 515-95-57; phone: 8 (903) 247-15-49; e-mail: vniiplem@mail.ru).

Lyubov' A. Kalashnikova – DSc (Ag), Professor, Head of the Laboratory of DNA technologies of Federal State Budgetary Research Institution VNIIPlem, Key Research Associate (141212, Moscow region, Pushkin district, Lesnye Polyany, Lenina Str., 13; fax: +7 (495) 515-95-57; e-mail: vniiplem@mail.ru).

Yazilya A. Khabibrakhmanova – PhD (Bio), Laboratory of DNA Technologies, Senior Research Associate, Federal State Budgetary Research Institution VNIIPlem (141212, Moscow Region, Pushkin District, Lesnye Polyany, Lenina Str., 13; fax: +7 (495) 515-95-57; e-mail: vniiplem@mail.ru).

Irina Yu. Pavlova – PhD (Bio), Laboratory of DNA Technologies, Senior Research Associate, Federal State Budgetary Research Institution VNIIPlem (141212, Moscow Region, Pushkin District, Lesnye Polyany, Lenina Str., 13; fax: +7 (495) 515-95-57; e-mail: vniiplem@mail.ru).