

УДК 636.082.12

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНОВ ПЛОДОВИТОСТИ BMP 15 И GDF9 У РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ ОВЕЦ

О.П. МАЛЮЧЕНКО^{1,2}, Я.И. АЛЕКСЕЕВ^{1,2}, Ю.А. МОНАХОВА²,
С.Н. МАРЗАНОВА³, Н.С. МАРЗАНОВ⁴

О ГНУ ВНИИСБ Россельхозакадемии;² ЗАО «Синтол»;
³ ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии имени академика К.И. Скрябина»;
⁴ ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии)

Применение системы молекулярных маркеров многоплодия и продуктивности овец позволяет облегчить и значительно ускорить селекционную работу, в короткие сроки создавать группы животных с заданными свойствами. С целью создания такой системы изучена молекулярная изменчивость двух генов из семейства β -фактора роста BMP15 и GDF9 у романовской породы овец. Фиксация аллеля дикого типа в изученной выборке, вероятно, является одним из факторов, обеспечивающим высокую продуктивность романовской породы.

Ключевые слова: романовская порода овец, плодовитость, BMP 15, GDF9.

Овцеводство на протяжении долгого времени является одной из основных, хорошо развитых и наименее трудоемких отраслей с.-х. производства. В настоящее время наибольшее развитие получает овцеводство мясошерстного и мясoshубного направлений, поскольку в современных условиях эффективность разведения овец, его рентабельность на 80% зависит от реализации производства баранины и только на 20% — от реализации шерсти и овчин. Одной из выдающихся пород мясoshубного направления, традиционно разводимых на европейском севере нашей страны, является романовская порода. Овцы этой породы характеризуются непревзойденным естественным многоплодием. При нормальных условиях кормления и содержания каждые 100 маток дают за одно ягнение 260 ягнят, а подбор наиболее эффективных родительских пар позволяет повысить этот показатель [1]. В этой связи применение генетических маркеров многоплодия и продуктивности, позволяющих облегчить и значительно ускорить селекционную работу, а также повысить эффективность использования животных, является весьма актуальной проблемой.

В то же время, благодаря широкому использованию овец в качестве модельного вида при изучении генетического контроля многоплодия, имеются многочисленные данные о связи генетической изменчивости определенных локусов с показателями многоплодия и продуктивности различных пород овец [2]. После описания в 1980 г. гена Бурула (BMP15/FecB) было открыто целое семейство генов, регулирующих признаки продуктивности и получивших общее название Fec-генов [4]. Коллективом авторов предпринята попытка разработать систему маркеров для романовской породы, используя последовательности двух генов этого семейства. Изменчивость выбранных локусов хорошо изучена на европейских [3], индийских и других местных породах овец по всему миру [7]. Первый выбранный ген кодирует фактор дифференциального роста тканей 9 (GDF9/FecG). Он локализован на пятой хромосо-

ме [6] и его мутантные аллели, различающиеся по пяти однонуклеотидным заменам, ассоциированы с пониженной фертильностью, а в гомозиготном состоянии приводят к стерильности особей. Аналогичная ситуация описана для второго тестируемого гена — одного из белков, регулирующих костный морфогенез (BMP15/FecX). Этот ген дополнительно интересен тем, что имеет сцепленное с полом наследование и локализуется на X-хромосоме [5, 6].

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы тканей 35 овец романовской породы, отобранных случайным образом в МУСХП «Прогресс» Воронежской обл. Выделение геномной ДНК производилось по стандартной методике с использованием набора ДНК-ЭКСТРАН-2, производства ЗАО «Синтол».

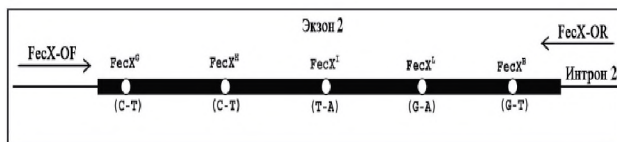
Генетическая изменчивость по тестируемым генам определялась методом частичного секвенирования последовательности ДНК. Предварительная амплификация фрагментов осуществлялась с использованием следующих пар праймеров: FecX-OF (5'-AAGAGGTAGTGAGGTTCTTGAGTTCT-3') и FecX-OR (5'-TGCACCTTTGCCGTCACCTGCATGTG-3') для гена BMP15/FecX; и G1-OF (5'-GCCTGGCTCTGTTTTCCSTATTAGCCTTG-3') и G8-OR (5'-CATCAGGCTCGATGGCCAAACACTATA-3') для гена GDF9/FecG. Реакция амплификации проводилась по следующей циклограмме: 95°C 5 мин, затем 30 циклов при 95°C — 15 с, 60°C — 30 с, 72°C — 50 с. Последовательности полученных ампликонов были установлены путем секвенирования на автоматическом анализаторе ABIPrism 3130x/ по стандартным методикам. Результаты секвенирования обрабатывались в программе SeqMan коммерческого пакета программ DNASTar.

Результаты и их обсуждение

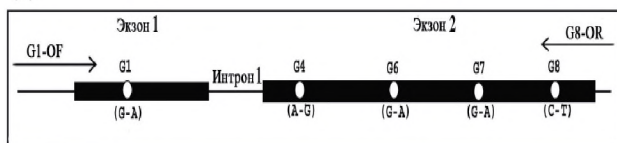
Праймеры для каждого гена были подобраны таким образом, чтобы амплифицируемый фрагмент содержал сайты всех описанных однонуклеотидных замен (SNP). Расположение известных замен и положение праймеров схематически изображено на рисунке. В данном случае, детекция полиморфизма путем секвенирования представляется наиболее удобным методом, который позволяет за одну реакцию определять генотип по всем исследуемым локусам.

Все полученные последовательности гена BMP15/FecX в тестируемых положениях имеют следующие нуклеотиды: FecX^G — цитозин, FecX^H — цитозин, FecX^I — тимидин, FecX^L — гуанин, FecX^B — гуанин. Это позволяет утверждать, что все исследованные образцы являются гомозиготами, несущими аллель дикого типа.

Аналогичные данные получены для последовательностей гена GDF9/FecG: G1 — гуанин, G4 — аденин, G6 — гуанин, G7 — гуанин, G8 — цитозин, что также соответствует «нормальному» аллелю.



(А)



(Б)

Известные однонуклеотидные замены, влияющие на индивидуальную продуктивность овец (А — ген BMP15; Б — ген GDF9)

Таким образом, мутации, приводящие к изменению показателей индивидуальной продуктивности, по исследованным генам не обнаружены. Возможно, они не характерны для романовской породы в целом. Вероятно, отсутствие мутаций по этим генам в популяциях является одним из факторов, обеспечивающим выдающуюся продуктивность породы.

Заключение

Анализ прочитанных последовательностей (фрагменты в 550 п.о. для гена BMP15/FecX и 650 п.о. для гена GDF9/FecG) выявил полную идентичность всех образцов и соответствие аллелю дикого типа. Отсутствие изменчивости по данным локусам делает их непригодными к использованию в качестве маркеров продуктивности для романовских овец. Для продолжения работы по созданию системы молекулярных маркеров индивидуальной продуктивности необходимо исследовать изменчивость других генов Рес-семейства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» ГК № 16.552.11.7032 от 29 апреля 2011 г. на оборудовании ЦКП «ВНИИСБ».

Библиографический список

1. *Ерохин А.И., Карасев Е.А., Ерохин С.А.* Романовская порода овец: состояние, совершенствование, использование генофонда. М., 2005. 329 с.
2. *Bindon B.M., Piper L.R., Hillarda M.A.* // Prolific Sheep. CAB International, UK: 1996. 283.
3. *Bodin L., Di Pasquale F., Fabre S., Bontoux M., Monget P., Ersani L., Mulsant P.* // Endocrinology, 2007. 148:393-400.
4. *Davis G.H., Montgomey G. W., Allison A.J., Kelly R. W., Bray A.R.* // New Zeland Journal of Agricultural Research, 1982. 25:525-529.
5. *Galloway S.M., McNatty K.P., Cambridge L.M., Laitinen M.P., Jennifer J.L., Jokiranta S., McLaren R.J., Luiro K, Dodds K.G., Montgomey G.W., Beattie A.E., Davis G.H., Ritvos O.* // Nature Genetics, 2000. 25:279-283.
6. *Hanrahan P.J., Gregan S.M., Mulsant P., Mullen M., Davis G.H., Powell R., Galloway S.M.* // Biology of Reproduction, 2004. 70:900-909.
7. *Polley S., De S., Brahma B., Mukherjee A., Vinesh P.V., Batabyal S., Arora J.S., Pan S., Samanta A.K., Datta T.K., Goswami S.L.* / Tropical Animal Health and Production, 2009. 42:985-993.

Рецензент — д. с.-х. н. В.И. Глазко

SUMMARY

Selection process in sheep can be simplified and accelerated by the introduction of fecundity molecular markers analysis. Using molecular markers, groups of animals with predetermined qualities can be created in rather short time. To develop such kind of an assay, we studied molecular variability of two genes from oocyte-specific growth factors family BMP 15 and GDF9 in Romanov sheep. Fixation of wild-type allele found in the population under study can be one of the factors determining high productivity of Romanov breed.

Key words: Romanov sheep, fecundity, BMP 15, GDF9.

Малюченко Олег Петрович — ст. науч. сотр. лаборатории анализа генетически модифицированных организмов ГНУ ВНИИСБ, старший научный сотрудник ЗАО «Синтол».

Алексеев Яков Игоревич — зав. лаб. анализа генетически модифицированных организмов ГНУ ВНИИСБ, руководитель ЦКП ВНИИСБ, научный директор ЗАО «Синтол».

Монахова Юлия Андреевна — науч. сотр. ЗАО «Синтол».

Марзанова Саида Нурбиевна — ст. науч. сотр. науч.-исслед. лаборатории инфекционной патологии и биотехнологии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени академика К.И. Скрябина.

Марзанов Нурбий Сафарбиевич — гл. науч. сотр. лаборатории генетики животных ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии.