

## **ОСОБЛИВОСТІ ПОЛІМОРФІЗМУ ОКРЕМИХ QTL-ГЕНІВ ОВЕЦЬ ПІВДЕННОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ**

**В. М. Іовенко, К. В. Скрепець,  
Н. Б. Писаренко, Д. С. Харічев**  
vn\_iov@i.ua

Інститут тваринництва степових районів імені М. Ф. Іванова  
«Асканія-Нова» - Національний науковий селекційно-генетичний  
центр з вівчарства  
вул. Соборна, 1, смт Асканія-Нова, Чаплинський р-н,  
Херсонська обл., 75230, Україна

*На даний час більше ніж у 25 передових країнах ведуться геномні дослідження на різних видах тварин. Найбільш вивченими видами, згідно генних карт баз даних QTLdb, є велика рогата худоба, свині, вівці, кури та коні. На жаль, в Україні маркер-залежна селекція використовується лише в галузі скотарства та свинарства, у вівчарстві цей напрямок селекції майже не застосовується. Тому метою наших досліджень було вивчення поліморфізму генів FesB,  $\beta$ -LG та MSTN, що визначають рівень розвитку селекціонованих ознак, та дослідити генетичну структуру порід овець південного регіону України різного напрямку продуктивності.*

*Досліджено поліморфізм структурних генів овець асканійської тонкорунної, асканійської м'ясо-вовнової, асканійської каракульської та романівської порід методом ПЛР-ПДРФ. Рестрикцію проводили з використанням рестриктаз Avall, RsaI та HaeIII. Встановлено два алельні варіанти гену BLG, котрі утворюють три генотипи: AA, AB та BB. Найбільшого розповсюдження отримали гетерозиготні генотипи. У овець асканійської каракульської породи їх концентрація становить 44,4%; у асканійської тонкорунної – 57,7%. Гомозиготи BB виявлено тільки у 11,2%–11,6% тварин відповідно. В результаті такого розподілу генотипів спостерігається перевага алелю А, частота якого варіює від 0,596 до 0,667 у порівнянні з алелем В (0,333–0,404).*

*Гени FesB та MSTN у овець піддослідних порід знаходяться у мономорфному стані.*

**Ключові слова:** вівці, QTL-гени, поліморфізм, генетична структура.

# **THE PECULIARITIES of POLYMORPHISM of SEPARATE QTL-GENES in the SHEEP of the SOUTHERN REGION of UKRAINE**

**V.M. Iovenko, K.V. Skrepets, N.B. Pysarenko, D.S. Kharichev**  
vn\_iov@i.ua

Ascania Nova Institute of Animal Breeding in the Steppe Regions  
named after M. F. Ivanov – National Scientific Selection-Genetics  
Center for Sheep Breeding  
1, Soborna Street, Askania Nova, Chaplynka district,  
Kherson region, 75230, Ukraine

*At present, more than 25 advanced countries are carrying out genomic studies of various animal species. The most studied species, according to the genetic maps of QTLdb databases, are breeds of cattle, pigs, sheep, hens and horses. The genomic studies are used only in the field of cattle breeding and pig breeding in Ukraine, unfortunately this direction of selection is almost not used in sheep breeding. Therefore, the aim of our studies was the studying of the polymorphism of the FecB, BLG and MSTN genes determining the level of development of the selection traits, and the studying of the genetic structure the breeds of sheep of southern region of Ukraine, which have different directions of productivity.*

*The polymorphism of structural genes of sheep of Ascanian fine-fleece, Ascanian meat and wool, Ascanian Karakul and Romanov breeds has been studied by PCR-RFLP method. The restriction was performed using the restriction enzymes Avall, RsaI and HaeIII. Two allelic variants of the gene BLG were determined, they form three genotypes: AA, AB, BB. The most widely spread heterozygous genotypes. In sheep of the Ascanian Karakul breed, their concentration is 44.4%, and in the Ascanian fine-fleece breed - 57.7%. The homozygotes of BB are the least widespread (11.2% - 11.6%, respectively). As a result of this distribution of genotypes, the advantage of the A allele is observed, the frequency of which varies from 0.596 to 0.667 in comparison with the allele B.*

*The genes FecB and MSTN of the sheep of the studied breeds are in a monomorphic state.*

**Keywords:** sheep, QTL-genes, polymorphism, genetic structure.

# ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ОТДЕЛЬНЫХ QTL-ГЕНОВ ОВЕЦ ЮЖНОГО РЕГИОНА УКРАИНЫ

В. Н. Иовенко, К. В. Скрепец,  
Н. Б. Писаренко, Д. С. Харичев  
vn\_iov@i.ua

Институт животноводства степных районов имени М.Ф. Иванова  
«Аскания-Нова» - Национальный научный селекционно-генетический центр по овцеводству  
ул. Соборная, 1, пгт. Аскания-Нова, Чаплинский р-н,  
Херсонская обл., 75230, Украина

*В настоящее время более чем в 25 передовых странах ведутся геномные исследования различных видов животных. Наиболее изученными видами, согласно генетическим картам баз данных QTLdb, являются породы крупного рогатого скота, свиней, овец, кур и лошадей. К сожалению, в Украине маркер-зависимая селекция используется только в области скотоводства и свиноводства, в овцеводстве это направление селекции почти не применяется. Поэтому целью наших исследований было изучение полиморфизма генов FesB, BLG и MSTN, определяющих уровень развития селекционных признаков, и исследование генетической структуры пород овец южного региона Украины разного направления продуктивности.*

*Исследован методом ПЦР-ПДРФ полиморфизм структурных генов овец асканийской тонкорунной, асканийской мясошерстной, асканийской каракульской и романовской пород. Рестрикцию проводили с использованием рестриктаз Avall, RsaI и HaeIII. Установлены два аллельные варианта гена BLG, которые образуют три генотипа: AA, AB и BB. В исследуемых популяциях обнаружены все генотипы: гомозиготы AA, гетерозиготы AB и гомозиготы BB. Наибольшее распространение получили гетерозиготные генотипы. У овец асканийской каракульской породы их концентрация составляет 44,4%; а у асканийской тонкорунной породы – 57,7%. Гомозиготы BB выявлены соответственно только у 11,2% и 11,6% животных. В результате такого распределения генотипов наблюдается преимущество аллеля А, частота которого варьирует от 0,596 до 0,667 по сравнению с аллелем В.*

*Гены FesB и MSTN у овец исследуемых пород находятся в мономорфном состоянии.*

**Ключевые слова:** овцы, QTL-гены, полиморфизм, генетическая структура.

Використання у галузі вівчарства генетичного аналізу із застосуванням ДНК-технологій на практиці показало, що впровадження маркер-залежної селекції може значно скоротити тривалість оцінки племінних тварин та підвищити рівень розвитку їх селекційних ознак (відтворювальна функція, стійкість до захворювань, приріст живої маси, якість м'яса, кількісні та якісні показники вовнової продуктивності, тощо). На даний час більше ніж у 25 передових країнах ведуться генетичні дослідження на різних видах тварин. Найбільш вивченими видами, згідно генних карт QTL db, є велика рогата худоба, свині, вівці, кури та коні. На жаль, в Україні маркер-залежна селекція використовується лише в галузі скотарства та свинарства, у вівчарстві цей напрям селекції майже не застосовується. Тому метою наших досліджень було визначити алельний та генотиповий стан генів FecB,  $\beta$ -LG та MSTN, що визначають рівень розвитку селекціонованих ознак, та дослідити їх поліморфізм у порід овець південного регіону України різного напрямку продуктивності.

На сьогодні, згідно з базою даних Sheep, QTLdb виявлено близько 830 генів, пов'язаних з продуктивними ознаками, але важливих структурних генів, які використовують у селекційній практиці, не так багато.

Ген Бурула (FecB). Суть дії цього гена полягає у підвищенні швидкості овуляції, яка призводить до збільшення приплоду у вівці. У овець з геном Бурула дозріває відразу 4-12 яйцеклітин, що в результаті призводить до народження 4-10 ягнят [1, 2].

Тварини можуть успадковувати цей ген як від одного з батьків (гетерозиготний), так і від обох (гомозиготний). Одна копія гена Бурула збільшує швидкість овуляційного циклу в середньому на 1,6 за цикл, який зазвичай прирівнюється до одного додатково народженого ягняти. Дві копії гена Бурула збільшують середню швидкість овуляції на 3,2 за цикл, це прирівнюється до 1-2 додатково народжених ягнят [3, 4, 5].

Ген, що кодує  $\beta$ -лактоглобулін ( $\beta$ -LG). Поліморфізм білків молока та їх вплив на його якісні показники викликав інтерес науковців. Було виявлено, що найбільш важливими білками молока є  $\beta$ -лактоглобулін та казеїн.  $\beta$ -лактоглобулін представляє собою дуже цінний компонент молока, необхідний для росту молодняка, тому є головним білком молочної сироватки. Цей ген складається з 7 екзонів, що охоплюють близько 4000 п.н. Довжина ланцюга білка становить 178 амінокислот та розташовується на третій хромосомі. У овець виявлено три його генетичних варіанти – А, В та С. Генотип ВВ пов'язаний з високим надоем молока, у той час як генотипи АА та АВ впливають на його хімічний склад та придатність до вироблення сирів [6, 7, 8].

Міостатин (MSTN), відомий як, фактор зростання і диференціювання 8, скорочено GDF-8. Це білок, який пригнічує ріст і диференціювання м'язової тканини. Утворюється в скелетних м'язах, потім виділяється в кров, впливаючи на м'язи за рахунок зв'язування з рецепторами ACVR2B. Міостатин впливає як на величину, так і на структуру м'язових волокон. Дослідження на тваринах свідчать, що блокування дії міостатина призводить до значного збільшення сухої м'язової маси з практично повною відсутністю жирової тканини.

Вівці, гомозиготні за геном міостатину, мають до 10% більше м'язової маси та на 10% менше жирової тканини в туші [9, 10].

**Матеріал і методика досліджень.** Дослідження поліморфізму генів Fes B, MSTN та  $\beta$ -LG проводилось у лабораторії генетики Інституту тваринництва степових районів імені М.Ф. Іванова «Асканія-Нова» на вівцях асканійської м'ясо-вовнової, асканійської тонкорунної, асканійської каракульської та романівської порід методом ПЛР-ПДРФ. Кількість піддослідних тварин показано у таблиці 1.

**Таблиця 1. Кількість піддослідних тварин**

| Порода                    | Гени  |      |             |
|---------------------------|-------|------|-------------|
|                           | Fes B | MSTN | $\beta$ -LG |
| Асканійська м'ясо-вовнова | 17    | 17   | -           |
| Асканійська тонкорунна    | 18    | -    | 26          |
| Асканійська каракульська  | 9     | 9    | 9           |
| Романівська               | 50    | -    | -           |

Виділення геномної ДНК проводили за допомогою комплекта реагентів для екстракції ДНК „ДНК-сорб В”, згідно рекомендаціям виробника. ПЛР проводили з використанням програмованого ампліфікатора Libe Line.

Для ампліфікації фрагмента гена FesB використовували праймери:

F: 5'-CCAGAGGACAATAGCAAAGCAAA-3'

R: 5'-CAAGATGT-TTTCATGCCTCATCAACACGGTC-3'.

ПЛР проводили за наступними температурними режимами: початкова денатурація 5 хв. при 94°C, з наступними 33 циклами: денатурація – 15 сек. при 94°C, відпал праймерів – 30 сек. при 60°C і синтез – 30 сек. при 72°C. На завершальному етапі реакції кінцевий синтез складав 5 хв. при температурі 72°C. Довжина ампліфікованого

фрагменту дорівнювала 190 п.н. Для аналізу поліморфізму локусу FesB використовували рестриктазу Avall (сайт рестрикції G/GACC) при t 37 °C 12 год.

Для ампліфікації фрагмента гена  $\beta$ -LG використовували наступні праймери:

F: 5'-TTGGGTTTCAGTGTGAGTCTGG-3'

R: 5'-AAAA-GCCCTGGGTGGGCAGC-3'.

Температурний режим ампліфікації гена  $\beta$ -LG: Hotstart – 2хв. 74°C; початкова денатурація – 5 хв. при 95°C; 33 цикла: денатурація – 40 с при 95 °C; відпал праймерів – 40 с при 67°C; синтез – 40 с при 72 °C; термінальна елонгація – 5 хв. при 72 °C. Для рестрикції використовували рестриктазу RsaI (сайт рестрикції GT/AC).

Для ампліфікації фрагмента гена MSTN використовували праймери:

F: 5'-CCGGAGAGACTTTGGGCTTGA-3'

R: 5'-TCATGAGC-ACCCACAGCGGTC-3'.

Температурний режим ампліфікації гена MSTN: початкова денатурація – 4 хв. при 95°C; 35 циклів: денатурація – 30 с при 95 °C; відпал праймерів – 45 с при 72°C; синтез – 40 с при 72 °C; термінальна елонгація – 5 хв. при 72 °C. Для рестрикції гена  $\beta$ -LG використовували рестриктазу HaeIII (сайт рестрикції AG/CT).

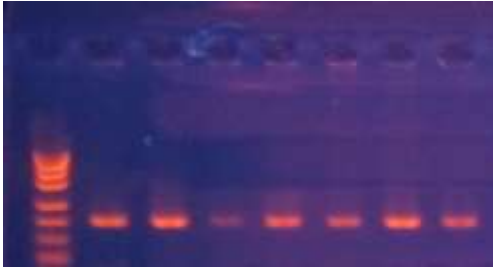
Для розділення продуктів ампліфікації та рестрикції проводили горизонтальний електрофорез у 2%-3% агарозному гелі з додаванням бромистого етідію. Візуалізацію отриманих результатів здійснювали за допомогою трансільюмінатора в УФ світлі з подальшим документуванням електрофореграм цифровою фотокамерою. Диференціацію ампліконів за розмірами проводили за допомогою маркера молекулярних мас GeneRuler TM 100bp DNA Ladder (Fermentas) та pUC19/Msp I (СибЭнзим).

**Результати досліджень.** Після рестрикції фрагменту гена FesB можливо отримати два алельні варіанти + та В. Алель В характеризується наявністю точкової мутації Q249R у положенні 746, що призводить до заміни амінокислоти Gln на Arg (CAG>CGG).

У тварин з генотипом BB після рестрикції виявляють фрагмент довжиною 160 і 30 п.н. У носіїв генотипу ++ сайт рестрикції для цієї рестриктази відсутній, а присутній нерестрикційний продукт ампліфікації, який має розмір 190 п.н. Гетерозиготи з генотипом В/+ мають одночасно три фрагменти 30 п.н., 160 п.н. та 190 п.н.

На рисунку 1 показано розділення продуктів рестрикції гену FesB рестриктазою Avall у 3 % агарозному гелі. Усі фрагменти мають довжину 190 п.н., що свідчить про відсутність сайту рестрикції.

1 2 3 4 5 6 7 8



Доріжки: 1– ДНК-маркер  
MspI (501, 404, 331, 242,  
190, 147, 111 п.н.); 2 - про-  
дукт ампліфікації (190 п.н.);  
3-8 – генотип ++ (190 п.н.)

Рис. 1. Електрофореграма розділення продуктів рестрикції гена FecB

У овець усіх досліджених порід за геном FecB не виявлено мутації, яка призводить до підвищення багатоплідності. Усі тварини мають гомозиготний генотип ++, що відповідає дикому типу (табл. 2).

**Таблиця 2. Частота алелів і генотипів досліджених порід овець за локусом FecB**

| Порода                    | n  | Алель |   | Генотип |    |    |
|---------------------------|----|-------|---|---------|----|----|
|                           |    | +     | B | ++      | +B | BB |
| Асканійська м'ясо-вовнова | 17 | 1,0   | 0 | 1,0     | 0  | 0  |
| Асканійська тонкорунна    | 18 | 1,0   | 0 | 1,0     | 0  | 0  |
| Асканійська каракульська  | 9  | 1,0   | 0 | 1,0     | 0  | 0  |
| Романівська               | 50 | 1,0   | 0 | 1,0     | 0  | 0  |

Вважаємо, що відсутність цієї мутації є характерною генетичною особливістю не лише для овець сканійської селекції а й взагалі для усіх порід, що розводять на території України.

Для інтродукції мутантного алелю B у популяції потрібно проводити схрещування маток з баранами-плідниками, які належать до порід з високою багатоплідністю та мають генотип FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>B</sup>. Однак, у результаті проведених досліджень на вівцях найбільш плодючої романівської породи носіїв мутації виявлено не було. Тому подальші генетичні дослідження локусів, що детермінують відтворювальні здатності овець, повинні спрямовуватися на вивчення генетичних особливостей за генами багатоплідності BMP-15 та GDF-9.

За результатами ПЛР-ПДРФ аналізу встановлено генетичну структуру популяцій овець досліджених порід за геном  $\beta$ -LG, яка представлена у таблиці 3.

**Таблиця 3. Частота алелів і генотипів за геном  $\beta$ -LG**

| Порода                   | n  | Алель |       | Генотип, % |      |      |
|--------------------------|----|-------|-------|------------|------|------|
|                          |    | A     | B     | AA         | AB   | BB   |
| Асканійська тонкорунна   | 18 | 0,667 | 0,333 | 44,4       | 44,4 | 11,2 |
| Асканійська каракульська | 9  | 0,596 | 0,404 | 30,7       | 57,7 | 11,6 |

У піддослідних популяціях виявлено усі генотипи. Найбільшого розповсюдження отримали гетерозиготи АВ, концентрація котрих в асканійській каракульській породі складає 0,444, в асканійській тонкорунній – 0,577, а найменшого – гомозиготи ВВ (0,112 та 0,116 відповідно). Частота алелю А була вищою у обох порід і варіювала від 0,596 до 0,667.

Довжина продукту ампліфікації гену  $\beta$ -LG становить 452 п.н. Тварини з генотипом АА мають три сайти рестрикції, тому на фореграмі, взаємності від генотипу, виявляють три, чотири або п'ять рестрикційних фрагменти довжиною 236 п.н., 175п.н., 170п.н., 66 і 41 п.н. Для генотипу АВ характерна присутність чотирьох сайтів рестрикції, що призводить до формування п'яти фрагментів довжиною 236 п.н., 175 п.н., 170 п.н., 66 і 41 п.н. Генотип ВВ має два сайти рестрикції та три ділянки довжиною 236 п.н., 175 п.н. та 41 п.н. (рис. 2).

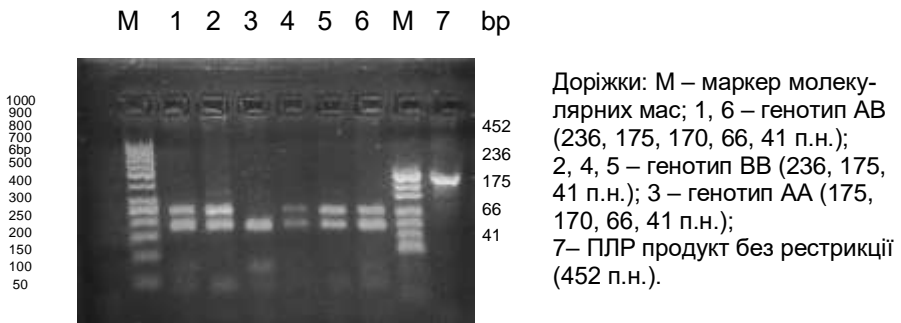


Рис. 2. Електрофореграма розділення продуктів рестрикції гену  $\beta$ -LG



Таким чином виявлено, що  $\beta$ -LG є поліморфним геном з перевагою генотипу АВ та алелю А.

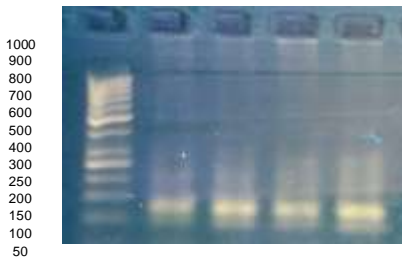
У овець досліджених порід за геном MSTN не виявлено мутації, яка призводить до підвищення м'язової маси. Усі тварини мають гомозиготний генотип mm (табл. 4).

**Таблиця 4. Частота алелів і генотипів досліджених порід овець за локусом MSTN**

| Порода                    | n  | Алель |   | Генотип |    |    |
|---------------------------|----|-------|---|---------|----|----|
|                           |    | m     | M | mm      | mM | MM |
| Асканійська м'ясо-вовнова | 17 | 1,0   | 0 | 1,0     | 0  | 0  |
| Асканійська каракульська  | 9  | 1,0   | 0 | 1,0     | 0  | 0  |

Продукт ампліфікації цього гену має довжину 337п.н. У тварин, носіїв гомозиготного генотипу mm, при електрофорезі визначають три фрагменти 131, 123 та 83 п.н. У гетерозигот mM виявляють чотири рестрикційні фрагменти довжиною 337, 131, 123, 83 п.н. Генотип MM характеризується однією зоною, яка дорівнює довжині ПЛР-продукту 337 п.н.

п.н.    М    1    2    3    4



Доріжки: 1– маркер молекулярних мас;  
2-8 –генотип mm (131, 123, 83 п.н.).

**Рис. 3. Електрофореграма розділення продуктів рестрикції гену MSTN**

Слід відзначити, що тварин, носіїв мутації за геном міостатину, можна виявити візуально, вони фенотипово вирізняються серед інших особин будовою тіла з ярко вираженими м'язами.

**Висновки.** Визначено алельний та генотиповий стан генів FecB,  $\beta$ -LG, MSTN, що визначають рівень розвитку окремих селекційних

ознак овець. За геном  $\beta$ -LG виявлено поліморфізм, що дозволяє в подальшому провести порівняння продуктивних ознак тварин з різними генотипами та виявити бажані варіанти. Генетичні локуси FecB та MSTN виявилися інваріантними, тобто мономорфними і подальші їх дослідження з метою пошуку зв'язків з продуктивними ознаками овець вважаємо не доцільними.

### Список використаної літератури

1. Зиновьева Н. А. ДНК-маркеры плодовитости овец / Н. А. Зиновьева, Е. А. Гладырь // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2006. – № 3. – С. 30–38.
2. Genetic polymorphism FecB and BMP15 genes and its association with litter size in Sangsari sheep breed of Iran / M.M. Kasiriyin, H. Hafezeyan, H. Sayahzadeh at al. // Journal of Animal and Veterinary Advances. – 2009. – № 8. – P. 1025–1031.
3. Use of the FecB (Booroola) gene in sheep-breeding programs: Proceedings of the Helen Newton Turner Memorial International Works hopheldin Pune (Maharashtra, India, 10–12 November 2008) / ACIAR Proceedings. – Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2009. – № 133. – 238 p.
4. Feng Guan. Polymorphism of FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb grow than development / Feng Guan, Shou-Ren Liu, Guo-Qing Shi at al. // Animal Reproduction Science. – 2007. – Vol. 99. – P. 44–52.
5. The Boorola Fecundity (FecB) gene maps to sheep chromosome 6 / G.W. Montgomery, G. Doodsatal // Genomics. – 1994. – Vol. 22. – P.148 – 153.
6. Sheep milk protein polymorphism and its effect on milk performance of Polish Merino / S.Mroczkowski, K.Korman, G.Erhardt at al. // Arch. Tierz. – 2004. – Vol. 47. – P. 114-121.
7. Polymorphism of  $\beta$ -Lactoglobulin Gene in Iranian Sheep Breeds Using PCR-RFLP / G. Elyasi, J. Shodja, M.R. Nassiry at al. // Journal of molecular Genetics. – 2010. – Vol. 2.(1). – P. 6–9.
8. Луполова Т. А. Генетический полиморфизм лактопротеинов и влияние локуса  $\beta$ lg на показатели молочной продуктивности овец каракульской породы / Т. А. Луполова, В. С. Петку // Весці Нацьянальнай академії. – 2009. – № 2. – С.87–90.
9. Fahrenkrug, S.C. Technical Note: Direct Genotyping of the Double-Muscling Locus (mh) in Piedmontese and Belgian Blue Cattle by Fluorescent PCR / S.C. Fahrenkrug [et al.] // Animal Science. – 1999. – Vol. 77. – P. 2028–2030.
10. Kolosov Yu. Sheep Breeding Resources in Rostov Region / Yu.Kolosov, L.Getmantseva, N.Shirockova // World Applied Sciences Journal. – 2013. – Т. 23. № 10. – С. 1322–1324.