

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ GH, CAST У ОВЕЦ В СВЯЗИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

ЧИЖОВА Людмила Николаевна, ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ»

СУРЖИКОВА Евгения Семеновна, ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ»

ЗАБЕЛИНА Маргарита Васильевна, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

ЛУЦИВА Екатерина Дмитриевна, ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ»

ЕФИМОВА Нина Ивановна, ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ»

Прогресс в биотехнологии, молекулярной генетике позволяет дать объективную оценку генетического потенциала, прогнозировать устойчивость организма животных к заболеваниям, неблагоприятным факторам среды на ранних этапах постнатального онтогенеза. Одним из преимуществ ДНК-диагностики является возможность оценки животных уже при рождении, что позволяет объективно оценить перспективность молодняка и провести отбор животных для включения в селекционный процесс в ранний период онтогенеза. В этой связи изучали полиморфизм генов соматотропина – GH, кальпастатина – CAST и его связь с показателями иммунной реактивности ягнят разных генотипов. Использованием метода ПЦР – ПДРФ выявлен полиморфизм генов GH, CAST, представленный двумя аллелями GH^A; GH^B и CAST^M; CAST^N с разной частотой встречаемости и тремя генотипами: GH^{AA}, GH^{BB}, GH^{AB}; CAST^{MM}, CAST^{NN}, CAST^{MN}. Выявлены генотипы-носители маркерных аллелей. Иммунную реактивность оценивали по уровню иммунокомpetентных клеток (T-, В-лимфоцитов) и соотношению их субпопуляций (T-хелперов; T-супрессоров). Установлена взаимосвязь величины живой массы, среднесуточных приростов, иммунной реактивности разных генотипов. Выявлено превосходство по величине живой массы ягнят с генотипами GH^{BB} и GH^{AB} по сравнению с GH^{AA} CAST^{MN}, составившее в среднем 0,9 и 5,8 %.

Введение. В решении проблемы сохранения ценного генофонда отечественных пород сельскохозяйственных животных, в том числе и овец, абсолютный приоритет отдается повышению сохранности молодняка, качественному улучшению его племенной ценности, повышению продуктивности [3, 6]. Овцеводство несет значительный экономический ущерб из-за рождения слабого, нежизнеспособного молодняка, гибели его на ранних этапах онтогенеза. На решение этой проблемы направлены усилия многих ученых и практиков [8]. В этой связи поиск методологических подходов, позволяющих получить объективные информационные критерии для оценки прогноза устойчивости молодняка к заболеваниям, неблагоприятным факторам среды и способности к максимальной реализации своего генетического потенциала, является одной из актуальных задач овцеводства.

Научным сообществом доказано, что в формировании жизнедеятельности организма главенствующая роль отводится иммунной системе, этому сложному биологическому комплексу, в основе которого лежит целый ряд разных механизмов, направленных на сохранение генетической индивидуальности особи. Большое значение в иммунологическом надзоре отводится иммунокомпетентным клеткам (T-, В-лимфоцитам) и их субпопуляциям (T-хелперам и T-супрессорам) для обеспечения динамического постоянства внутренней среды организма [7].

С развитием молекулярной биологии, генетики и ДНК-технологий стало возможным решение многих задач практической селекции в овцеводстве, в том числе выявление высокопродуктивных генотипов, хорошо адаптированных к условиям окружающей среды [1]. Работа по идентификации генов, связанных с продуктивными качествами овец, продолжается. К генетическим маркерам проявляется большой интерес. Белковый продукт генов-кандидатов выполняет существенную роль в регуляции или формировании физиологово-биохимических процессов [2].

GH-гормон роста (соматотропин) является одним из главных регуляторов соматического развития животных. Локализуется он в третьем экзоне и продуцируется передней долей гипофиза. Его регуляторная функция заключается в прямом действии на органы-мишени, имеющие специальные рецепторы на плазматических мембранах. Также в модифицирующем, «пермиссивном» состоянии он оказывает влияние на эффективное действие других гормонов и биологически активных соединений [4, 5].

CAST-ген (кальпастатин) оказывает существенное воздействие на функции клеток и обеспечивает регуляцию жизненно важных процессов. Расположение его у овец находится в области пятой хромосомы, а размер составляет около 100 тыс. п. о. В первом экзоне было обнаружено два аллельных варианта, всего этот ген включает в себя четыре экзона [9]. Ген CAST, входя в состав каль-



панинового семейства ферментов, является специфичным ингибитором кальций-зависимых протеаз, то есть выраженность структуры мышечной ткани, и нежность мяса находятся под его контролем [10].

Цель данной работы – изучить полиморфизм генов GH, CAST и определить его роль в формировании иммунной реактивности овец.

Методика исследований. Исследования проводили в СПХ «Русь» Изобильненского района Ставропольского края на овцах ставропольской породы. Биоматериалом исследований являлась ДНК крови ягнят (ярки, $n = 100$). Для выделения ДНК использовали набор реагентов «DIAtomtDNAPrep» (IsoGeneLab, Москва). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали наборы GenePakPCRCore (IsoGeneLab, Москва). Генотипирование исследуемого поголовья по генам GH, CAST проводили методом ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Полимеразно-цепные реакции осуществляли в объеме 20 мкл реакционной смеси с использованием специфических праймеров на программируемом четырехканальном термоциклире «Терцик» фирмы «ДНК-технология» (Россия): GH: F: 5'- gga gga agg aag gga tga a -3' R: 5' - cca agg gag gga gag aca ga- 3'. Режим отжига 60 °C. Для рестрикции применяли эндонуклеазу Hae III. CAST: F: 5' -tgg ggc cca atg acg cca tcg atg -3; R: 5' - ggt gga gca cct ctg atg acc -3'. Режим отжига 62 °C. Для рестрикции применялась MspI – эндонуклеаза.

В ультрафиолетовом свете после окрашивания этидием бромида, путем электрофореза, определяли длину и число фрагментов рестрикции в агарозном геле концентрацией 1,8–3,8 %. Стандартный набор M50 «GenePakDNAMarkes» (IsoGeneLab) использовали в качестве маркера молекулярных масс. Методом спонтанного розеткообразования в соответствии с рекомендациями И.П. Кондрахина, Н.В. Курилова в периферической крови определяли уровень Т- и В-лимфоцитов.

В лицензированной лаборатории иммуногенетики и ДНК-технологий ВНИИОК – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ» (Свидетельство ПЖ – 77N008326 от 18.04.2018г.) проводили ДНК-исследования.

Результаты исследований. По результатам генотипирования опытных групп молодняка установлено, что полиморфизм генов соматотропина (GH), кальпастатина (CAST) представлен двумя аллелями GH^A и GH^B; CAST^M и CAST^N с разной чистотой встре-

чаемости: с низкой – аллели GH^B и CAST^N, составивший 0,12; 0,18, с высокой – GH^A и CAST^M – 0,88; 0,82 соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Аллельный спектр генов GH и CAST молодняка овец ставропольской породы

Ген	Частота встречаемости				
	генотип			аллель	
GH	AA	BB	AB	A	B
	0,83	0,07	0,10	0,88	0,12
CAST	MM	NN	MN	M	N
	0,70	0,06	0,23	0,82	0,18

Выявленная закономерность нашла отражение в частоте встречаемости гомозиготных GH^{AA}, GH^{BB}; CAST^{MM}, CAST^{NN} и гетерозиготных GH^{AB}; CAST^{MN}: 0,83; 0,07; 0,70; 0,06; 0,10; 0,23 соответственно.

Сравнительный анализ показателей роста и развития ягнят свидетельствует о превосходстве носителей гомозиготных генотипов GH^{BB} и CAST^{NN} по величине живой массы и среднесуточных приростов в 4-месячном возрасте на 5,8; 6,1 и 5,4; 5,9 % соответственно по сравнению со сверстниками гомозиготных генотипов GH^{AA} и CAST^{MM} ($P < 0,05$). Так как Т- и В-лимфоцитам отводится основная роль в формировании иммунной реактивности, то изучали и проводили сравнительный анализ этих клеток, а также их субпопуляций (Т-супрессоров и Т-хеллеров) в периферической крови ягнят разных генотипов. Установлено, что в крови ягнят носителей генотипов GH^{BB} и CAST^{NN} циркулировало большее количество Т- и В-клеток по сравнению с носителями генотипов GH^{AA} и CAST^{MM} – на 15,3 и 12,5 % соответственно ($P < 0,01$). Что касается субпопуляций, то оказалось, что в их крови Т-супрессоров циркулировало меньше (в среднем на 20,9 и 21,1 %), но больше (на 8,0 и 11,5 %) Т-хеллеров ($P < 0,01$), табл. 2. Выявленная закономерность нашла отражение в величине иммунорегуляторного индекса (ИРИ) – отношении Т-хеллеров к Т-супрессорам. Он оказался выше (в среднем на 23,7 и 20,3 %) по сравнению с ягнятами носителями гомозиготных генотипов GH^{AA} и CAST^{MM} ($P < 0,01$).

Заключение. Анализ показателей клеточного иммунитета свидетельствует о том, что реактивность каждого генотипа индивидуальна и зависит, вероятно, от его генетической программы, которая позволяет ему реагировать на неблагоприятные факторы внешней среды путем интенсивной выработки большего количества Т- и В-лимфофи-

Таблица 2

Показатели продуктивности, иммунной реактивности ягнят разных генотипов

Ген	Живая масса, кг		Среднесуточный прирост, г	Иммунная реактивность, 10 ³ /л				ИРИ
	Генотип	при рождении		Т-лимфоциты	В-лимфоциты	Т-супрессоры	Т-хеллеры	
GH	AA	3,24±0,11	23,87±0,69	171,9 ±4,78	0,61±0,13	0,48±0,08	0,34±0,03	0,24±0,07
	BB	3,38±0,09	25,36±0,89	183,2 ±5,29	0,72±0,22	0,56±0,09	0,27±0,04	0,25±0,08
	AB	3,32±0,11	24,05±0,72	172,8 ±4,93	0,67±0,19	0,51±0,11	0,30±0,06	0,26±0,05
CAST	MM	3,27±0,07	24,43±0,77	176,3 ±3,19	0,56 ±0,08	0,32±0,04	0,38±0,07	0,24±0,04
	NN	3,33±0,12	25,81±0,62	187,3 ±4,25	0,64 ±0,05	0,38±0,06	0,33±0,05	0,26±0,06
	MN	3,21±0,08	25,11±0,72	182,5 ±5,06	0,59±0,11	0,34±0,07	0,35±0,06	0,24±0,04



тов, Т-хелперов, но меньшего – Т-супрессоров. Это позволит организму корректировать недостаток адаптивно-компенсаторных механизмов в процессе формирования фенотипа на всех этапах онтогенеза.

Комплекс показателей, характеризующий уровень защитного потенциала организма овец, может послужить одним из оценочных критериев его жизнеспособности и будущей продуктивности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Биотехнологические методы изучения полиморфизма гена гормона роста / Ю.А. Колосов [и др.] // Дальневосточный аграрный вестник. – 2017. – № 2 (42). – С. 82–86.
- Исследование полиморфизма генов гормона роста, лептина у овец породы советский меринос / М.И. Селионова [и др.] // Вестник АПК Ставрополья. – 2019. – № 3(35). – С. 25–29.
- Михайлenco A.K., Чижова L.N., Чотчаева Ч.Б. Иммунная реактивность овец в разных условиях содержания и ее коррекция // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2016. – № 3. – С. 64–66.
- Новая порода овец российский меринос / Х.А. Амерханов [и др.] // Сельскохозяйственный журнал. – 2018. – № 11. – С. 42–48.
- Особенности полиморфизма генов гормона роста (GH), кальпаина (CAPN1) быков-производителей мясных пород / М.И. Селионова [и др.] // Вестник мясного скотоводства. – 2017. – № 2(98). – С. 65–70.
- Оценка полиморфизма C337G гена FSHR в популяции черно-пестрого голштинизированного скота / А.В. Бабий [и др.] // Аграрный научный журнал. – 2018. – № 12. – С. 3–6.
- Селионова М.И., Чижова Л.Н., Семенов В.В. Система комплексной оценки генетического потенциала племенных животных. – Ставрополь: ВНИИОК, 2015. – 50 с.

8. Effect of GH gene polymorphisms on biometric traits in Makooei sheep / A. Hajihosseini et al. // Biological Research., 2013, No. 4 (6), PP. 351–355.

9. Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds / M. Sulema et al. // Afrikan J. Biotechnol., 2012, No. 3, P. 242–244.

10. Polymorphism of Calpastatin, Calpain and myostatin genes in native Dalagh sheep in Iran / M.A. Azari et al. // Slovak J. Anim. Sci., 2012, Vol. 45, No.1, P. 111–116.

Чижова Людмила Николаевна, д-р с.-х. наук, проф., главный научный сотрудник лаборатории иммуногенетики и ДНК-технологий, ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», Россия.

Суржикова Евгения Семеновна, канд. с.-х. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики и ДНК-технологий, ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», Россия.

356241, Ставропольский край, г. Михайловск, ул. Никонова, 49.

Тел.: (8652) 71-72-18.

Забелина Маргарита Васильевна, д-р биол. наук, проф. кафедры «Технология производства и переработки продукции животноводства», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

410005, г. Саратов, ул. Соколовая, 335.

Тел.: (8452) 65-47-52.

Луцива Екатерина Дмитриевна, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики и ДНК-технологий, ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», Россия.

Ефимова Нина Ивановна, канд. с.-х. наук, ведущий научный сотрудник отдела овцеводства, ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», Россия.

356241, Ставропольский край, г. Михайловск, ул. Никонова, 49.

Тел.: (8652) 71-72-18.

Ключевые слова: генофонд; генетический потенциал; иммунная система; ДНК-технологии; генетические маркеры; полиморфизм генов.

POLYMORPHISM OF GH, CAST GENES IN SHEEP IN CONNECTION WITH RESISTANCE INDICATORS

Chizhova Lyudmila Nikolaevna, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution “North Caucasian Agrarian Center”, Russia.

Surzhikova Evgeniya Semenovna, Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher, All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution “North Caucasian Agrarian Center”, Russia.

Zabelina Margarita Vasilievna, Doctor of Biological Sciences, Professor of the chair “Technology of Production and Processing of Livestock Products”, Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov, Russia.

Lutsiva Ekaterina Dmitrievna, Post-graduate Student, All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution “North Caucasian Agrarian Center”, Russia.

Efimova Nina Ivanovna, Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher, All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution “North Caucasian Agrarian Center”, Russia.

Key words: gene pool; genetic potential; immune system; DNA technologies; genetic markers; gene polymorphism.

The article is devoted to one of the important problems of improving the safety and vitality of young animals. Progress in biotechnology and molecular genetics allows one to give an objective assessment of the genetic potential, to predict the resistance of

the animal organism to diseases, unfavorable environmental factors at the early stages of postnatal ontogenesis. One of the advantages of DNA diagnostics is the ability to assess animals at birth. DNA diagnostics allows to obtain a large amount of information in a short time, as well as to determine the polymorphism of genes that control the characteristics of productivity in sheep. This allows you to objectively assess the prospects of young animals and select animals for inclusion in the selection process, in the early period of ontogenesis. In this regard, the goal was set to study the polymorphism of the somatotropin - GH, calpastatin - CAST genes and its relationship with the parameters of the immune reactivity of lambs of different genotypes. Using the PCR-RFLP method, polymorphism of genes, GH, CAST, represented by two GHA alleles, was revealed; GHB and CASTM; CASTN with different frequency of occurrence and three genotypes: GHAA, GHBB, GHAB; CASTMM, CASTNN, CASTMN. Taking into account the results of genotyping, experimental groups were formed: I - carriers of GHAA; II - GHBB; III - GHAB; IV - CASTMM; V - CASTNN; VI - CASTMN genotype. The genotypes of the carriers of marker alleles were revealed. Immune reactivity was assessed by the level of immunocompetent cells (T-, B-lymphocytes) and the ratio of their subpopulations (T-helpers; T-suppressors). The relationship between the size of live weight, average daily gains, and immune reactivity of different genotypes was established. The superiority in terms of live weight of lambs with genotypes GHBB and GHAB compared to GHAA CASTMN; which averaged 0.9 and 5.8%. The revealed regularity can serve as an evaluative criterion of the viability and productivity of sheep at an early age.

