УДК 575.113:636.92

ДНК-ДІАГНОСТИКА ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНУ МІОСТАТИНУ КРОЛІВ НОВОЗЕЛАНДСЬКОЇ БІЛОЇ ПОРОДИ

Є.А. Шевченко, аспірант

Черкаська дослідна станція біоресурсів Інституту розведення і генетики тварин НААН

З використанням методу ПЛР-ПДРФ (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів) досліджено генетичну структуру кролів новозеландської білої породи за геном міостатину. Проведено аналіз популяційно-генетичних параметрів кролів.Показано перевагу частот зустрічності генотипу ТТ над СТ і СС в досліджуваній популяції тварин. Встановлено зв'язок алелей з м'ясною продуктивністю. Показано, що генотипи кролів, оцінені за геном міостатину, мають вплив на показники середньодобових приростів і масу парної тушки.

Ключові слова: кролі, міостатин, поліморфізм, алелі**,** генотип,селекція, продуктивність

Досить важливою проблемою підвищення ефективності вдосконалення порід кролів є вивчення генетичних детермінант формування високої продуктивності і використання генетичного моніторингу при управлінні селекційним процесом. Багатовікова практика ведення тваринництва, зокрема кролівництва, розробила різні методи створення та поліпшення порід, суть яких зводиться до виявлення та інтенсивного використання тварин з бажаними ознаками [1]. Такий підхід досить довго забезпечував високу ефективність селекційного процесу. Значна кількість селекційних програм по вдосконаленню порід, типів і ліній кролів розроблені саме на цій основі. Однак стає все більш очевидним, що нині традиційні методи розведення не можуть забезпечити необхідного селекційного прогресу в породах.Більш того, гостро постає питання про підвищення м`ясної продуктивності, відтворювальних якостей, життєздатності та їх стійкості до захворювань.

Сучасні генетичні підходи до вдосконалення порід засновані на поглибленій оцінці генотипу сільськогосподарських тварин і генетичного різноманіття популяцій за допомогою маркерних технологій, таких, як маркер-допоміжна селекція (MAS, або Marker-Assisted Selection) [2]. Використання маркерних генів для генетичної

експертизи походження вже увійшло у практику тваринництва багатьох країн і стало обов'язковим елементом племінної роботи. Нині актуальним завданням є вивчення можливостей використання маркер-допоміжної селекції у кролівництві та впровадження результатів наукових досліджень у практику племінної роботи.

Маркер-допоміжна селекція у кролівництві дозволяє більш ефективно проводити породотворчий процес, підбирати найбільш перспективні породи для створення нових високопродуктивних генотипів тварин[3].

Особливий інтерес серед ДНК-маркерів представляє ген міостатину (MSTN) у кролів, який асоційований з рівнем їхньої м`ясної продуктивності. Розмір послідовності цього ДНК маркера складає 80 п.н. У ньому присутня мутація С-Т в 34 позиції, що сприяє утворенню різних алельних варіантів. В цілому селекція з використання міостатину в якості молекулярного маркера набуває актуальності у світовому кролівництві.

Мета досліджень.Дослідити вплив генотипів кролів новозеландської білої породи за локусом міостатину на їхню м'ясну продуктивність.

Матеріали та методика досліджень. Для досліджень використовували зразки крові 60 голів кролів новозеландської білої породи. Тварини утримувались в умовах кролеферми СГПП ,,Марчук Н.В.", с. Ташлик Смілянського району Черкаської області.Кров відбирали з вушної вени в поліетиленові пробірки"Еппендорф"(по 1 мл), що містили 200 мкл 3,8%-го розчину цитрату натрію. Геномну ДНК з крові виділяли за стандартною методикою [4], використовуючи набір,,ДНК-сорб Б" (,,Амплісенс" Росія) за рекомендаціями виробника.

Генетичну паспортизацію кролів проводили шляхом ампліфікації відповідних ділянок геномної ДНК в полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів (синтезовані,,Біо Тех Лаб", Україна). Послідовність використаних праймерів наведена нижче:

Прямий праймер: 5'- ТАА CTG AAA AGA ACC CTC TAG TAG C - 3'

Зворотній праймер: 5'- TCG GTA GTT GTT TCC CAC TTT - 3'

Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 1мкл буфера для ДНК полімерази, 2 мкл суміші трифосфатів (,, Амплісенс "Росія), 40 пмоль відповідного праймера (0,4 мкл / реакцію), 0,42 ед.акт (0,1 мкл) ДНК-полімерази (,,Fermentas", Литва). Геномна ДНК додавалася в кількості 1,5 мкл (25 нг). Загальний об'єм ПЛР-суміші становив 10 мкл. Ампліфікаціюгеномної ДНК кролів з праймерами до міостатину проводили на програмованому чотирьохканальномутермоцикл ері ,,Терцик"(,, ДНК-технологія", Росія), дотримуючись таких умов: 180 секунд - денатурація при 95 ° С (,,гарячий старт"), 30 секунд денатурація при 95 °С, 30 секунд - відпал праймерів при 60 °С, 30

секунд - елонгація при 72 °С, 10 хвилин - синтез при 72 °С; 40 циклів ампліфікації Продукти ампліфікації (амплікони) піддавалися рестрикційному розщепленню ферментом AluI (3 одиниці активності, протягом ночі), потім електрофоретично розділяли в 3,5% агарозному гелі і фарбували бромистим етидієм з наступною візуалізацією в ультрафіолетових променях. Після проведення електрофорезу гель фотографували з використанням професійного цифрового фотоапарата Fujifilm S2500. Розмір ампліфікованих фрагментів визначали з використанням програмного забезпечення TotalLab 2.01.

Бонітування кролів новозеландської білої породи проводили згідно,,Інструкції з бонітування кролів" [5].

Статистичний аналіз проводився з використанням програмного пакета Statistica 6.0 і Excel (Microsoft Office 2010).

Результати досліджень. В ході проведення наукових досліджень були виявлені 11 особин генотипу СС, 22 - генотипу СТ та 27 - генотипу ТТ.

На рис. 1 представлені продукти рестрикції гена міостатину кролів новозеландської білої породи після обробки рестриктазою Alu I.

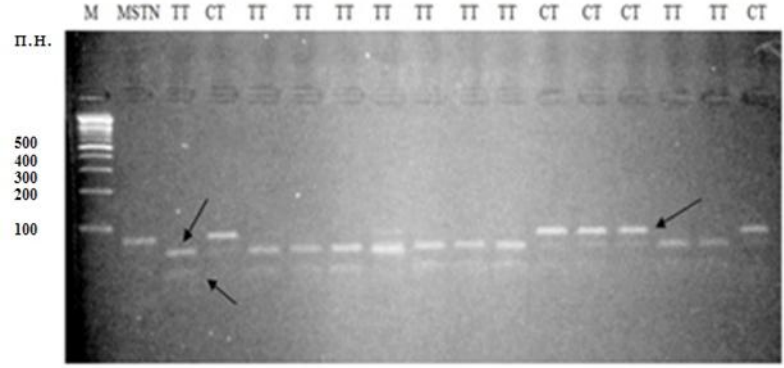

Рис. 1. Результати ПЛР-ПДРФ аналізу гена міостатина кролів новозеландської білої породи. Умовні позначення: М - молекулярний маркер О `geneRuler ™ ready-to-use (Fermentas), MSTN - геномна ДНК кролів не оброблена рестриктазою AluI

Примітка: стрілками позначені алельні варіанти гена миостатину кролів оброблену рестриктазою Alu I (розмір алельних варіантів ТТ - 24 п.н. і 56 п.н., СТ - 80 п.н. і 56 п.н.).

Аналіз генної рівноваги по Харді-Вайнбергу показав зміщення генної рівноваги по всіх досліджених генотипах ($p < 0,001$).

Результати аналізу розподілу генотипів і алелей досліджуваного ДНК-маркера у вибірці кролів представлені в таблиці.

Таблиця. Розподіл генотипів і алелей по відношенню до локусаміостатину у кролів новозеландської білої породи (n = 60)

ДНК-маркер	Частоти зустрічності				
	генотипів, %			алелей, %	
MSTN	CC	CT	TT	C	T
	0,18	0,37	0,45	0,53	0,47

Як показано в таблиці, частота зустрічності алеля С в гені міостатину склала 53 % і алеля Т – 47 %.Частоти генотипу СС в популяції кролів новозеландської білої породи склали 17,5%, генотипу СТ – 37,5% і генотипу ТТ – 45 %.

В якості ознак продуктивності, на які визначався вплив генотипів за геном MSTN кролів, виступали показники середньодобових приростів і маси парної тушки, витрат корму на одиницю приросту.

Проведенийоднофакторний дисперсійний аналіз м'ясної продуктивності кролів з різними генотипами дозволив виявитивисоку долю впливу гену MSTN на рівень середньодобових приростів та маси парної тушки, які відповідно склали $\eta^2 = 0,55$ ($p<0,05$) та $\eta^2 = 0,40$ (рівень значущості $p<0,05$). Доля впливу гену MSTN на рівень затрат корму на 1 кг приросту (60-120 днів) виявилася недостовірною. В якості тенденції слід відмітити перевагу кролів з генотипом ТТ над однолітками з генотипами СС за рівнем середньодобових приростів, які при цьому, носили найбільш виражений характер і були вищими на 12 % ($p<0,05$).

Висновки. За результатами проведення ДНК-діагностикигенотипу кролів новозеландської білої породи встановлено, що усі досліджені тварини виявилися поліморфними за геном MSTN, пов'язаним з їхніми м'ясними якостями.

Дослідження поліморфізму кролів за локусом міостатину показало наявність двох алелей С і Т.

Проведений популяційно-генетичний аналіз кролів характеризувався такими параметрами: частоти генотипів за локусом MSTN СС, СТ і ТТ становили 0,18; 0,37 і 0,45, а частоти алелів С і Т склали 0,53 і 0,47.

В ході проведення науких дослідженьбув визначений вплив генотипу за геном міостатину на показники середньодобових приростів, який становив $\eta^2 = 0,55$ ($p<0,05$)

Таким чином, проведені дослідження поліморфізму кролів слід розширювати, а результати використовувати при проведенні

селекційної роботи з метою збільшення кількості тварин в популяції з бажаним генотипом за геном міостатину.

Лабораторіям молекулярно-генетичної експертизи для накопичення в стадах бажаних комплексних генотипів рекомендуємо проводити генетичне тестування кролів за геном міостатину.

Список використаної літератури

1. Бащенко М. І. Кролівництво : монографія / М. І. Бащенко, О. Ф. Гончар, Є. А. Шевченко – Черкас. ін-т агропром. вир-ва. - Черкаси : Черкаський ін-т АПВ, 2010. – 304 с.

2. Khalil M. H. Methods criteria, techeniques, and genetic responsees for rabbit selection: review / M. H. khalil, A. M. Al - Saef // In Proc 9th World Rabbit Congress – Italy, Verona, 2008. – p. 1 – 22.3.

3. Fontanezi L. Analysis of candidate genes for meat production traits in domestic rabbit breeds / L. Fontanezi, M. Tazolli, E. Scotti, V. Russo // 9th World rabbit congress, Verona, Italy, 2008. – p. 79 – 84.

4.Sambrook J.Molecular Cloning / J. Sambrook., D. Russel – N. Y.: Cold spring Harbor Lab. Press, 2001. - 2222 p.

5. Інструкція з бонітування кролів – Офіц. вид., чинний від 25.09.2003 N 351 – К., 2003. – 86 с. – (Нормативне виробничо-практичне видання).