

*The economic usage of such water bodies must be realized by scientific reasoning of their yearly fish-planting based on researches of species composition, quantity, biomass of basic components of forage base, bioproduction, peculiarities of ecosystem functioning. The expediency of biological melioration of NNP's ponds-coolers by introduction the white silver carp which can effectively reduce quantity of blue-green algae by transformation them in ichthyomass was determined.*

*It was found that the parameters of the population structure of the species can be mediated by the reflection of the influence of negative factors. Indicators of linear growth of the studied individuals and their average mass indicate the availability of optimal conditions for the existence of a herd of the white silver carp in the investigated water facility.*

*It is proposed to planting two-year-old-fish white silver carp with the body mass about 100-200 gr with fish density 292 ind/ha into nuclear power object's ponds-coolers that allows to reach fish productivity about 300 kg/ha.*

**Keywords:** *white silver carp, biomelioration, fish productivity, pond-cooler*

УДК 636.32/.38.082.12

## **ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ЛОКУСУ ВМР 15 У ПОРОДАХ ОВЕЦЬ ПІВДЕННОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ**

**Н. Б. ПИСАРЕНКО**, кандидат сільськогосподарських наук, науковий співробітник лабораторії генетики

**Інститут тваринництва степових районів ім. М. Ф. Іванова “Асканія-Нова” Національний науковий селекційно-генетичний центр з вівчарства**

*E-mail:* nadezhda.pisarenko13@gmail.com

**Анотація.** *Викладено результати досліджень поліморфізму локусу ВМР15, пов'язаного з багатоплідністю овець. Дослідження проводилося на вівцях асканійської тонкорунної, асканійської м'ясо-вовнової та романівської порід методом полімеразної ланцюгової реакції поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ).*

*Виділення геномної ДНК здійснювали з використанням набору реагентів ДНК Сорб-Б (Амплісенс) згідно рекомендацій виробника. ПЛР проводили з використанням програмованого ампліфікатора LabLine (Німеччина). Для рестрикції використовували рестриктазу Mph11031 (сайт розпізнавання - ATGCA↓T). Для розділення продуктів ампліфікації та рестрикції проводили горизонтальний електрофорез у 2 % агарозному гелі з додаванням бромистого етідію. Візуалізацію отриманих результатів здійснювали за допомогою трансільюмінатора в*

© Писаренко Н. Б., 2017

УФ світлі з подальшим документуванням електрофореграм цифровою фотокамерою.

Довжина продукту ампліфікації гену BMP15 становить 356 п.н. За наявності мутації у цьому локусі фермент Mph11031 не може впізнати сайт рестрикції. Проте за відсутності мутації фермент розпізнає сайт рестрикції і ділить ампліфікований фрагмент на два відрізки довжиною 152 та 204 п.н. У овець усіх досліджених порід за геном BMP15 не виявлено мутації, яка призводить до підвищення багатоплідності. Усі тварини мають гомозиготний генотип ++, що відповідає дикому типу овець.

Актуальність проведених досліджень полягає у тому, що на даний час на території України ще не вивчалася наявність мутації у локусі BMP 15 на вівцях Південного регіону України.

Мета досліджень – виявити поліморфізм (якщо він є) гена BMP 15 у овець асканійської тонкорунної, асканійської каракульської, асканійської м'ясо-вовнової та романівської порід методом ПЛР-ПДРФ.

У подальших дослідженнях планується вивчити поліморфізм гена GDF9.

**Ключові слова:** поліморфізм, локус, ген BMP 15, вівці, ПЛР-ПДРФ

**Актуальність.** Ефективність виробництва вівчарської продукції значною мірою визначається багатоплідністю овець, що робить її однією із найважливіших економічних ознак. Репродуктивні ознаки мають дискретну фенотипову експресію і виражаються лише у статевозрілих тварин, що призводить до зниження інтенсивності відбору за цими показниками. Застосування традиційних методів розведення, заснованих на фенотипових даних є трудомістким процесом та має низьку ефективність, у той час, як впровадження маркер-допоміжної селекції (MAS), в арсеналі якої є молекулярні методи досліджень, дозволить підвищити ефективність селекційної роботи спрямованої на поліпшення ознак відтворення.

У світі нараховується понад 900 порід овець, які істотно відрізняються між собою за своїми фізіологічними характеристиками, включаючи ступінь овуляції та плодючість [1]. Це робить вівцю ідеальною моделлю для вивчення механізму багатоплідності та її регулювання. Плодючість овець визначається в основному кількістю дозрілих фолікулів у кожному циклі статевої охоти або рівнем овуляції. Рівень овуляції може бути генетично регульований невеликою групою тісно пов'язаних генів або дією основного гену [2]. Вивчення поширення мутацій, що впливають на рівень прояву репродуктивних ознак у тварин різних популяцій є актуальною фундаментальною проблемою сучасної генетики сільськогосподарських тварин [3].

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Мутації з основними ефектами на частоту овуляції були виявлені в трьох генах родини трансформуючого фактора росту бета (TGF  $\beta$ ), до якої входить кістковий морфогенетичний білок (BMP15), фактор диференціювання та росту 9 (GDF9) і рецептор кісткового морфогенетичного білка IB (BMP-IB) [4].

Вперше мутація у гені BMP15 виявлена у овець породи Інвердейл (Inverdale). [5]. Оскільки ген знаходиться на X-хромосомі, то самець несе лише одну копію гена і передає її тільки своїм дочкам. Було виявлено, що окремі точкові мутації у гені BMP15 впливають на рівень овуляції [6]. Тварини, гомозиготні за цією мутацією були ановуляторні, тобто стерильні, тоді як гетерозиготні тварини мали рівень овуляції вищий на 0,8-2,4 у порівнянні з не-носіями у стаді [7, 8].

Повна довжина кодуючої послідовності гена BMP15 складає 1179 нуклеотидів та міститься у двох екзонах, розділених інтроном довжиною приблизно 5,4 кб.[9].

Механізм дії мутантного гена не цілком зрозумілий, але у носіїв мутації спостерігається збільшення кількості фолікулів, які мають менший діаметр і меншу частину гранульозних клітин, що відрізняється від показників у овець з генотипом дикого типу [10].

**Мета дослідження** – дослідити поліморфізм гена BMP 15 у овець асканійської тонкорунної, асканійської м'ясо-вовнової та романівської порід методом ПЛР-ПДРФ та встановити перспективність використання ДНК-досліджень для підвищення рівня багатоплідності овець, які розводяться в Південному регіоні України.

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження проведено у ДПДГ «Асканія-Нова» Чаплинського району Херсонської області на вівцях асканійської тонкорунної ( $n = 46$ ) та асканійської м'ясо-вовнової ( $n = 53$ ) порід та у приватному фермерському господарстві «7Г» Чаплинського району Херсонської області на романівській породі ( $n = 65$ ).

Визначення генотипу тварин проводилося методом ПЛР-ПДРФ. Виділення геномної ДНК проводилося з використанням набору реагентів ДНК Сорб-Б (Амплісенс) згідно рекомендаціям виробника.

Область гену кісткового морфогенетичного білка 15 (BMP15), що охоплює частину інтрона, була ампліфікована з використанням набору прямого та зворотного праймерів (табл. 1) [11]. Температуру відпалу праймерів перевіряли за допомогою сервісу Primers-BLAST.

### 1. Послідовність та властивості праймерів, використаних для ампліфікації ділянки гену BMP15

Праймер	Послідовність праймера (5'-3')	Молекулярна вага	ТМ (°C)	Довжина (нукл.)	Вміст GC (%)
ПРЯМИЙ (F)	TTCTCCGTCTAGGGGTATGAG	6468.29	62.57	21	52.40
ЗВОТНИЙ (R)	AGGGAACAAGAGCAAAGCGTTAGC	7468.92	64.57	24	52,00

ПЛР проводили з використанням програмованого ампліфікатора Libe Line за наступними температурними режимами: початкова денатурація 5 хв за 94 °C, з наступними 33 циклами: денатурація – 15 с за

94 °С, відпал праймерів – 30 с за 62 °С і синтез – 30 с за 72 °С. Завершує реакцію кінцевий синтез – 5 хв за 72 °С.

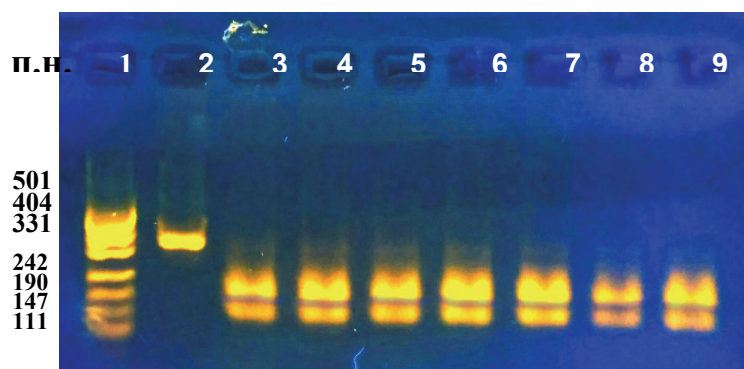
Для рестрикції гена BMP15 використовували рестриктазу *Mph11031* (сайт розпізнавання - ATGCA↓T) інкубацію проводили за *t* 37 °С 2-3 години.

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

Біометричну обробку даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення MS Excel.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Після рестрикції фрагменту гена BMP15 можливо отримати два алельні варіанти + та А. Алель А характеризується наявністю точкової мутації FecX<sup>1</sup> у положенні 299, що призводить до заміни амінокислоти Val на Asp (Т > А) [14]. У тварин з генотипом ++ після рестрикції виявляють два фрагменти довжиною 152 п.н. та 204 п.н. У носіїв генотипу АА сайт рестрикції для цієї рестриктази відсутній, а присутній нерестрикційний продукт ампліфікації розміром 356 п.н. Гетерозиготи з генотипом А+ мають одночасно три фрагменти – 152 п.н., 204 п.н. та 356 п.н.

На рисунку 1 показано розділення продуктів рестрикції гену BMP15 рестриктазою *Mph11031* у 2 % агарозному гелі. На другій доріжці знаходиться ПЛР-продукт, довжина якого становить 356 п.н. З третьої по п'яту доріжки фрагменти мають довжину 152 п.н. та 204 п.н., що свідчить про наявність сайту рестрикції.



**Рис. 1.** Електрофореграма розділення продуктів рестрикції гена BMP15: доріжка 1– ДНК-маркер *MspI* (501, 404, 331, 242, 190, 147, 111 п.н.); доріжка 2 - продукт ампліфікації (356 п.н.); 3-9 – генотип ++ (204 та 152 п.н.)

У всіх досліджуваних зразках встановлена одиночна рестрикційна картина, що складається з двох фрагментів довжиною 152 п.н. та 204 п.н. та вказує на відсутність поліморфізму у локусі BMP15.

**Висновки і перспективи.** За вивчення поліморфізму локусу BMP 15 у овець Південного регіону України встановлено наявність сайту рестрикції, що

свідчить про відсутність мутації у цьому гені. Усі тварини мають гомозиготний генотип ++, який відповідає нормальному дикому типу овець.

Враховуючи вищезазначене подальші генетичні дослідження необхідно спрямувати на вивчення поліморфізму третього члену родини трансформуючого фактора росту бета гена GDF9 (фактору диференціювання та росту 9).

#### **Список використаних джерел**

1. Terrill, C. E. The distribution of breeds as related to domestication and development of modern genotypes [Text] / C. E. Terrill, W. C. Foote, D. T. Bunch (Eds.) // The domestication of sheep; their ancestors, geography, time period and people involved, Proceedings of a Workshop by The International Sheep and Goat Institute, Utah State University, Logan, 1979. – P. 41–112.
2. Baird, D. T. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate [Text] / D. T. Baird, B. K. Campbell // Mol. Cell. Endocrinol, 1998. – Vol. 145. – P. 89-95. doi: 10.1016/S0303-7207(98)00174-9.
3. Davis, G. H. Fecundity genes in sheep [Text] / G. H. Davis/ – Animal Reproduction Science, 2004. – Vol. 82–83. – P. 247–253.
4. Hanrahan J. P. 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*) [Text] / J. P. Hanrahan, S. M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G. H. Davis, R. Powell, S. M. Galloway // Biol. Reprod, 2004. – Vol. 70. – P. 900–909.
5. Davis, G. H. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI/FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome [Text] / G. H. Davis, J. C. McEwan, P. F. Fennessy, K. G. Dodds, K. P. McNatty // Biol Reprod, 1992. – Vol. 46. – P. 636-640.
6. Galloway, S. M. Mutations in an oocyte-derived growth factor (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner, [Text] / S. M. Galloway, K. P. McNatty, L. M. Cambridge, M. P. E. Laitenen, J. L. Juengel, T. S. Jokiranta, R. J. McLaren, K. Luiro, K. G. Dodds., G. W. Montgomery, A. E. Beattie, G. H. Davis, O. Ritvos // Nat. Gen, 2000. – Vol. 25. – P. 279–283
7. Petrovic, M. P. Some important factors affecting fertility in sheep [Text] / M. P. Petrovic, V. Caro Petrovic, D. Ruzic Muslic, N. Maksimovic, Z. Ilic, B. Milosevic, J. Stojkovic // Biotechnology in Animal Husbandry, 2012. – Vol. 28 (3). – P. 517-528.
8. Bodin, L. Segregation of a major gene influencing ovulation in progeny of Lacaune meat sheep [Text] / L. Bodin, M. San Cristobal, f F. Lecer, P. Mulsant, B. Bib´e, D. Lajous, J. P. Belloc, F. Eychenne, Y. Amigues // Genet. Sel. Evol. 2002. – Vol. 34. – P. 447–464.
9. Davis, G. H. Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecXI) and Hanna (FecXH10) sheep, [Text] / G. H. Davis, G. D. Bruce, K. G. Dodds // Proc. Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics, 2001. – Vol. 14. – P. 175–178.
10. Davis, G. H. Major genes affecting ovulation rate in sheep. [Text] / G. H. Davis // Genet. Sel, 2005. – Vol. 37 (Suppl. 1). – P. 11–S23.
11. Shabir, M. Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies of BMP 15 gene in Corriedale and local Kashmir valley sheep (*Ovis aries*). [Text] / M. Shabir, T. A. S. Ganai // Gene, 2012. – Vol. 499. – P. 231–235.

## References

1. Terrill, C. E. Foote, W. C., Bunch, D. T. (1979). The distribution of breeds as related to domestication and development of modern genotypes. The domestication of sheep; their ancestors, geography, time period and people involved, Proceedings of a Workshop by The International Sheep and Goat Institute, Utah State University, Logan, 41–112.
2. Baird, D. T., Campbell, B. K. (1998). Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate. Mol. Cell. Endocrinol. 145, 89-95. DOI:10.1016/S0303-7207(98)00174-9.
3. Davis, G. H. (2004). Fecundity genes in sheep Animal Reproduction Science 82–83, 247–253.
4. Hanrahan, J. P. Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., Galloway, S.M. (2004). 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), Biol. Reprod. 70, 900–909.
5. Davis, G. H., McEwan, J. C., Fennessy, P. F., Dodds, K. G., McNatty, K. P. (1992). Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI/FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. Biol Reprod, 46:636-640.
6. Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P. E., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., McLaren, R. J., Luro, K., Dodds, K. G., Montgomery, G. W., Beattie, A. E., Davis, G. H., Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner, Nat. Gen. 25, 279–283
7. Petrovic, M. P., Caro Petrovic ,V., Ruzic Muslic, D., Maksimovic, N., Ilic, Z., Milosevic, B., Stojkovic, J. (2012). Some important factors affecting fertility in sheep Biotechnology in Animal Husbandry 28 (3), 517-528.
8. Bodin, L., SanCristobal, M., Lecerf, F., Mulsant, P., Bib´e, B., Lajous, D., Belloc, J.P., Eychenne, F., Amigues, Y. (2002). Segregation of a major gene influencing ovulation in progeny of Lacaune meat sheep, Genet. Sel. Evol. 34, 447–464.
9. Davis, G. H., Bruce, G. D., Dodds, K. G. (2001). Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecXI) and Hanna (FecXH10) sheep, in: Proc. Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics, 14, 175–178.
10. Davis, G. H. (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. Genet. Sel., 37 (1), 11–23.
11. Shabir, M., Ganai, T. A. S. (2012). Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies of BMP 15 gene in Corriedale and local Kashmir valley sheep (Ovis aries). Gene 499, 231–235.

## ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ЛОКУСА BMP 15 В ПОРОДАХ ОВЕЦ ЮЖНОГО РЕГИОНА УКРАИНЫ

Н. Б. Писаренко

*Аннотация.* Изложены результаты исследований полиморфизма локуса BMP15, связанного с многоплодием овец. Исследование проводилось на овцах асканийской тонкорунной, асканийской мясо-шерстной и

романовской породах методом полимеразной цепной реакции полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ).

Выделение геномной ДНК осуществляли с использованием набора реагентов ДНК Сорбо-Б (Амплиценс) согласно рекомендациям производителя. ПЦР проводили с использованием программируемого амплификатора LabLine (Германия). Для рестрикции использовали рестриктазу Mph11031 (сайт распознавания - ATGCA↓T). Для разделения продуктов амплификации и рестрикции проводили горизонтальный электрофорез в 2 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Визуализацию полученных результатов осуществляли с помощью трансиллюминатора в УФ свете с последующим документированием электрофореграм цифровой фотокамерой.

Длина продукта амплификации гена BMP15 составляет 356 п.н. При наличии мутации в этом локусе фермент Mph11031 не может узнать сайт рестрикции. Однако при отсутствии мутации фермент распознает сайт рестрикции и делит амплифицированный фрагмент на два отрезка длиной 152 п.н. и 204 п.н. У овец всех исследованных пород в гене BMP15 не обнаружено мутации, которая приводит к повышению многоплодия. Все животные имеют гомозиготный генотип ++, что соответствует дикому типу овец.

Актуальность проведенных исследований заключается в том, что в настоящее время на территории Украины еще не изучалось наличие мутации в локусе BMP 15 на овцах, которые разводятся в Южном регионе Украины.

Цель исследований - выявить полиморфизм (если он есть) гена BMP 15 у овец асканийской тонкорунной, асканийской мясо-шерстной и романовской пород методом ПЦР-ПДРФ.

В дальнейших исследованиях планируется изучить полиморфизм гена GDF9.

**Ключевые слова:** полиморфизм, локус, ген BMP 15 овцы, ПЦР-ПДРФ

## THE STUDY OF THE POLYMORPHISM OF LOCUS BMP 15 OF THE SHEEP IN THE SOUTHERN REGION OF UKRAINE

N. B. Pysarenko

**Abstract.** The results of investigations of polymorphism of the BMP15 locus associated with the prolificacy of sheep are presented. The Polymerase Chain Reaction of the Polymorphism of Lengths of the Restriction Fragments (PCR-PLRF) was used for the studying on the sheep of the Ascanian Fine Fleece, Ascanian Karakul, Ascanian Meat-and-Wool and Romanov Breeds.

The allotment of genomic DNA was performed using a set of Sorb-B (Amplicens) DNA reagents according to manufacturer's recommendations. PCR was performed using the programmable amplifier Lab Line (Germany). The restriction Mph11031 (recognition site - ATGCA↓T) was used for restriction. To

separate the products of amplification and restriction, horizontal electrophoresis was performed in 2 % agarose gel with the addition of bromide ethidium. The visualization of the obtained results was carried out using transilluminator in ultraviolet light, by followed documentation of the electrophoregrams by a digital camera.

The length of the amplification product of the BMP15 gene is 356 pairs of nucleotides. In the presence of a mutation in this locus, the enzyme Mph11031 cannot recognize the restriction site. However, in the absence of a mutation, the enzyme recognizes the restriction site and divides the amplified fragment into two segments of length 152 and 204 pairs of nucleotides. In the sheep of all the breeds studied, the BMP15 gene showed no mutation, which leads to an increase in prolificacy. All animals have a homozygous genotype ++, which corresponds to the wild type of sheep.

The relevance of the conducted studies is that at present in Ukraine, the presence of a mutation in the BMP 15 locus on the sheep of the Southern region of Ukraine has not been studied yet.

The aim of the research is to reveal the polymorphism (if any) of the gene BMP15 in the sheep of the Ascanian Fine Fleece, Ascanian Karakul, Ascanian Meat-and-Wool and Romanov breeds using the PCR-PLRF method.

In future studies, it is planned to study the polymorphism of the GDF9 gene.

**Keywords: polymorphism, locus, BMP 15 gene, sheep, PCR-PLRF**

УДК 636.32/.38.082.265

## **ПРОМИСЛОВЕ СХРЕЩУВАННЯ У ВІВЧАРСТВІ ЗА УЧАСТІ ПОРОДИ ШАРОЛЕ**

**В. І. ПОХИЛ**, кандидат сільськогосподарських. наук, доцент кафедри технології виробництва продукції тваринництва

**О. М. ПОХИЛ**, кандидат сільськогосподарськ их. наук доцент кафедри переробки продукції тваринництва

**О. В. ЛІНСЬКИЙ**, пошукач\*

**О. Ю. ГОЛИНСЬКА**, студент\*

**Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет**

*E-mail: v\_pohil@ukr.net*

**Анотація.** Наведено дані динамічної зміни живої маси піддослідного молодняка, отриманого за чистопородного розведення та міжпородного схрещування. Одним із методів покращення м'ясного напрямку у вівчарстві є промислове схрещування, ефективність якого

---

© В.І. Похил, О.М. Похил, О.В. Лінський, О.Ю. Голинська, 2017

\* Науковий керівник – кандидат сільськогосподарських. наук, доцент В. І. Похил