

4
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Cetonia aurata (Linnaeus, 1761)
Золотистая бронзовка
Шовкун Д.Ф.



2019

УЧРЕДИТЕЛЬ
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Д.Б. Косян, Е.А. Русакова, 2019

УДК 575.822

Д.Б. Косян, Е.А. Русакова

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА LEP/A80V С РОСТОВЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН, Оренбург, Россия

Цель. Изучение взаимосвязи полиморфизма гена LEP/A80V с ростовыми характеристиками бычков герефордской породы.

Материалы и методы. Проведен анализ влияния полиморфизма гена LEP/A80V на рост и развитие бычков герефордской породы. Протокол выделения ДНК проводили в соответствии с инструкцией коммерческого набора для выделения геномной ДНК из цельной крови «ДНК-Экстран-1». ПЦР в реальном времени проводилась с использованием анализатора нуклеиновых кислот «АНК-32» («Синтол», Россия). Относительная скорость роста подопытных животных вычислялась по формуле С. Броди.

Результаты. При анализе данных установлено, что разница в массе наблюдается, начиная с 8 месяцев. Живая масса животных II (LEP^{CT}) и III (LEP^{TT}) групп была выше на 4,76 и 2,38 %, соответственно, относительно аналогов из I (LEP^{CC}) группы. В 12 месяцев масса животных II (LEP^{CT}) группы была выше на 7,14% и ниже на 1,97 % в III (LEP^{TT}) группе при сравнении с I (LEP^{CC}) группой. На момент окончания эксперимента (18 мес) масса животных II (LEP^{CT}) группы была выше на 7,64 % на фоне снижения массы бычков III (LEP^{TT}) группы на 1,16 %, относительно аналогов из I (LEP^{CC}) группы. При анализе динамики среднесуточных приростов установлено, что в возрастной период 16-18 мес наблюдается максимальный прирост живой массы животных. При расчете абсолютного прироста живой массы бычков установлено, что животные II (LEP^{CT}) группы характеризовались более высокими результатами. Установленные различия по показателю относительной скорости роста между группами были отмечены на протяжении всего экспериментального исследования. Анализ динамики роста бычков демонстрирует, что между носительством мутации LEP/A80V и интенсивностью роста есть взаимосвязь, а гетерозиготное состояние (LEP^{CT}) находится в определенной связи с высокой энергией роста.

Заключение. При анализе гомо- и гетерозиготного проявления гена LEP/A80V, отмечена явная разница в показателях в группе экспериментальных животных гетерозиготных по аллелю T (II (LEP^{CT}) группа). Разница между животными гомозиготными по аллелю C (I (LEP^{CC}) группа) и гомозиготными по аллелю T (III (LEP^{TT}) группа) была незначительной.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, полиморфизм гена LEP, рост и развитие, интенсивность роста.

D.B. Kosyan, E.A. Rusakova

RELATIONSHIP OF LEP/A80V GENE POLYMORPHISM WITH GROWTH CHARACTERISTICS OF CATTLE

Federal Research Center of Biological Systems and Agrotechnologies of RAS, Orenburg, Russia

Objective. Study of the relationship of LEP/A80V gene polymorphism with growth characteristics of Hereford bulls.

Materials and methods. The influence of LEP/A80V gene polymorphism on the growth and development of Hereford bulls was analyzed. The DNA isolation Protocol was carried out in accordance with the instructions of the commercial kit for the isolation of genomic DNA

from whole blood "DNA-Extran-1". Real-time PCR was performed using the ANK-32 nucleic acid analyzer («Syntol», Russia). The relative growth rate of experimental animals was calculated by S. Brody's formula.

Results. When analyzing the data, it was found that the difference in weight is observed starting from 8 months. The live weight of animals of groups II (LEP^{CT}) and III (LEP^{TT}) was higher by 4,76 and 2,38%, respectively, relative to analogues of group I (LEP^{CC}). At 12 months, group II (LEP^{CT}) animal mass was 7,14% higher and 1,97% lower in group III (LEP^{TT}) when compared to group I (LEP^{CC}). At the end of the experiment (18 months), the mass of animals of group II (LEP^{CT}) was higher by 7,64 % against the background of a decrease in the mass of bulls of group III (LEP^{TT}) by 1,16 %, relative to analogues of group I (LEP^{CC}). When analyzing the dynamics of average daily increments, it was found that in the age period of 16-18 months, the maximum increase in live weight of animals was observed. When calculating the absolute increase in live weight of bulls, it was found that animals of group II (LEP^{CT}) were characterized by higher results. The established differences in the relative growth rate between the groups were observed throughout the experimental study. Analysis of the growth dynamics of bulls shows that there is a relationship between the carrier of the LEP/A80V mutation and the growth intensity, and the heterozygous state (LEP^{CT}) is in a certain relationship with high growth energy.

Conclusions. In the analysis of Homo-and heterozygous manifestations of the LEP/A80V gene, there was a clear difference in the indicators in the group of experimental animals heterozygous allele T (II (LEP^{CT}) group). The difference between animals homozygous for allele C (I (LEP^{CC}) group) and homozygous for allele T (III (LEP^{TT}) group) was insignificant.

Key words: cattle, polymorphisms LEP gene, growth and development, the intensity of growth.

Введение

Повышение продуктивности является одной из основных и важных задач в животноводстве. Традиционные методы размножения привели к увеличению прироста некоторых признаков, но прирост нелегко достижим в чертах с низкой наследуемостью [1-3]. Использование генетических же вариаций, лежащих в основе желаемых фенотипов, является целью современных производителей животных [4,5].

Увеличение уровня доступности применения молекулярных маркеров животных сельского хозяйства позволяет проводить подробный анализ и оценку генетического разнообразия скота. Вследствие чего, возникает возможность выявить гены, оказывающие влияние на экономически важные признаки сельскохозяйственных животных. Большинство молекулярных маркеров, используемых в настоящее время, являются микросателлитными маркерами (простые тандемные повторы, STR). Их использование является необходимым условием для идентификации позиционных и функциональных

генов-кандидатов, ответственных за количественные признаки [6-8].

Ген LEP отвечает за синтез гормона, называемого лептином [9]. Лептин – это 167-аминокислотный белок (16 кДа), расположен на четвертой хромосоме в геноме крупного рогатого скота (описано около 60 его SNP полиморфизмов) [10]. Гормон синтезируется жировой тканью (клетками адипоцитами) и участвует в регуляции потребления корма и массы тела, энергетического баланса, фертильности и иммунных функций [11, 12], играет важную роль в обмене веществ, особенно в отложении жира в организме; он участвует в регуляции пищевого поведения и может влиять на иммунную и репродуктивную функции [13], а также на рост и строение животных [14, 15].

В связи с этим целью данного исследования стало изучение взаимосвязи полиморфизма гена LEP/A80V с ростовыми характеристиками бычков герефордской породы.

Материалы и методы

В ходе работы была проведена серия экспериментальных исследований по выявлению биологической взаимосвязи наличия гена LEP/A80V с хозяйственно-полезными характеристиками бычков герефордской породы с целью дальнейшей разработки инновационных методов комплексного анализа и ранней диагностики продуктивных качеств КРС. Для реализации поставленных задач в условиях СПК «Дружба» Апанасенковского района, Ставропольского края методом пар-аналогов было отобрано и генетически проанализировано 15 голов бычков герефордской породы в возрасте 1 месяца. Исходя из полученных данных были сформированы три группы животных (n=5) с различным сочетанием аллелей. Гомозиготные по аллелю С гена LEP (LEP^{CC}) – I группа; гетерозиготные по аллелю Т (LEP^{CT}) – II группа; гомозиготные по аллелю Т (LEP^{TT}) – III группа.

Образцы ДНК получали из цельной крови, которую в объеме 5 мл отбирали у животных (n=15) с помощью одноразового прибора и антикоагулянта (1,5 м ЭДТА). Протокол выделения ДНК проводили в соответствии с инструкцией коммерческого набора для выделения геномной ДНК из цельной крови «ДНК-Экстран-1» («Синтол», Россия). Качество и количество нуклеиновой кислоты измеряли с помощью спектрофотометра nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Геномная ДНК каждого животного хранилась при температуре -20°C.

Для процесса амплификации фрагмента гена LEP/A80V использовали

праймеры (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика используемых праймеров

Ген	Название SNP	Расположение	GenBank (регистрационный номер и позиция)	Генотип
LEP	A80V	Экзон 3	AF536174.1	C/T

ПЦР в реальном времени проводилась с использованием анализатора нуклеиновых кислот «АНК-32» («Синтол», Россия) в объеме рабочего раствора 25 мкл, который содержал: KCl – 25,0 мМ; хлорид магния (MgCl₂) – 1,5 мМ; трис-HCl (8,5 рН) – 60,0 мМ; меркаптоэтанол (C₂H₆SO) – 10 мМ; дНТФ – 0,2 мМ; тритонX-100 – 0,1 мМ; Taq ДНК полимеразы – 1 ед. и каждый из праймеров по 0,5 мкМ. Процесс амплификации гена LEP (A80V) производился по следующему режиму (табл. 2).

Таблица 2. Схема проведения амплификации ДНК

№	Температура, °С	Режим
1	95	120 сек x 1
2	64	40 сек x 40
3	95	20 сек x 40

Животные находились в одинаковых условиях на протяжении всего периода экспериментального исследования. На подсосе – до возраста 7 месяцев; перевод бычков на стойловое содержание был осуществлен после отбивки. Содержание было беспривязным, осуществлялся свободный доступ к воде. В стойловый период кормление животных производилось несколько раз в день, учет поедаемости кормов (в два смежных дня) производился 1 раз в течение двух недель. Уровень кормления во всех сравниваемых группах был одинаковым и вполне соответствовал потребностям растущего молодняка. Контроль роста подопытных животных проводился путем ежемесячного индивидуального взвешивания (утром до кормления). На основании этих данных были рассчитаны среднесуточный прирост массы тела, относительная скорость роста в отдельные возрастные периоды. Относительная скорость роста подопытных животных вычислялась по формуле С. Броди, с учетом начальной и конечной живой массы животных.

При достижении животными возраста 14 месяцев эксперимент был завершен.

Статистическая обработка. Все полученные в ходе исследования

данные были подвергнуты статистической обработке. Статистический анализ проводили путем сравнения опытных групп с контрольной группой, используя SPSS 19.0 программного обеспечения (IBM Corporation) и Statistica 10. Значение с $P \leq 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено, что наличие полиморфизма по гену LEP/A80V влияет на ростовые характеристики животных. При рождении животные всех исследуемых групп характеризовались сходной живой массой. При анализе данных установлено, что разница в живой массе наблюдается, начиная с 8 месяцев (рис. 1).

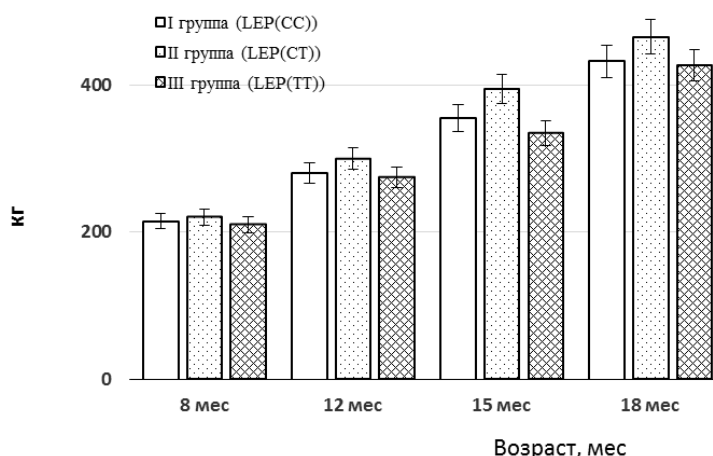


Рис. 1. Живая масса бычков герефордской породы с различными генотипами полиморфизма гена LEP/A80V, кг.

Так, живая масса животных II (LEP^{CT}) и III (LEP^{TT}) групп была выше на 4,76 и 2,38%, соответственно, относительно аналогов из I (LEP^{CC}) группы. При сравнении животных II (LEP^{CT}) и III (LEP^{TT}) групп превосходство остается на стороне II (LEP^{CT}) группы и составляет 2,27%. В 12 месяцев живая масса животных II (LEP^{CT}) группы была выше на 7,14% и ниже на 1,97% в III (LEP^{TT}) группе при сравнении с I (LEP^{CC}) группой. В годовалом возрасте разница по данному показателю между животными II (LEP^{CT}) и III (LEP^{TT}) групп составила 8,33% с приоритетом животных из II (LEP^{CT}) группы.

С увеличением возраста животного разница по массе продолжала увеличиваться. В 15 месяцев живая масса бычков II (LEP^{CT}) группы, в сравнении бычками I (LEP^{CC}) группы, была выше на 11,3%. В III (LEP^{TT}) группе живая масса в этом возрасте была на 5,63% ниже, чем в I (LEP^{CC}) группе. В этом

возрасте разница по данному показателю между животными II (LEP^{CT}) и III (LEP^{TT}) групп составила 15,2% с приоритетом животных из II (LEP^{CT}) группы. На момент окончания эксперимента (18 мес) живая масса животных II (LEP^{CT}) группы была выше на 7,64% на фоне снижения массы бычков III (LEP^{TT}) группы на 1,16%, относительно аналогов из I (LEP^{CC}) группы. Разница между живой массой животных II (LEP^{CT}) и III (LEP^{TT}) групп составила 8,17% в пользу животных из II (LEP^{CT}) группы.

При анализе динамики среднесуточных приростов установлено, что в возрастной период 16-18 мес наблюдается максимальный прирост живой массы животных, при неодинаковом распределении между группами. Так, данный показатель в I (LEP^{CC}) группе составил 770 г, во II (LEP^{CT}) группе – 803 г, а в III (LEP^{TT}) группе – 787 г. Разница между I (LEP^{CC}) и III (LEP^{TT}) группами была незначительной, а животные II (LEP^{CT}) группы по данному показателю превышали своих сверстников из I (LEP^{CC}) группы на 4,11%, из III (LEP^{TT}) группы – 1,99% (рис. 2).

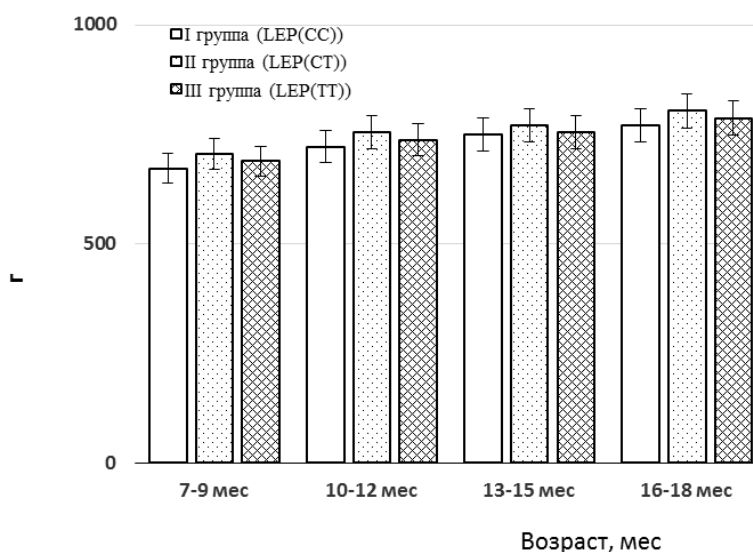


Рис. 2. Динамика среднесуточных приростов бычков герефордской породы с различными генотипами полиморфизма гена $LEP/A80V$, г.

При расчете абсолютного прироста живой массы бычков установлено, что животные II (LEP^{CT}) группы характеризовались более высокими результатами в сравнении с I (LEP^{CC}) и III (LEP^{TT}). Так, в период с 0-го по 8-й месяц этот показатель во II (LEP^{CT}) группе был равен 457,0 кг, разница с I (LEP^{CC}) и III (LEP^{TT}) группами составила 12,7 и 14,9%, относительно животных из II (LEP^{CT}) группы. С увеличением времени разница по данному показателю увеличивалась (рис. 3).

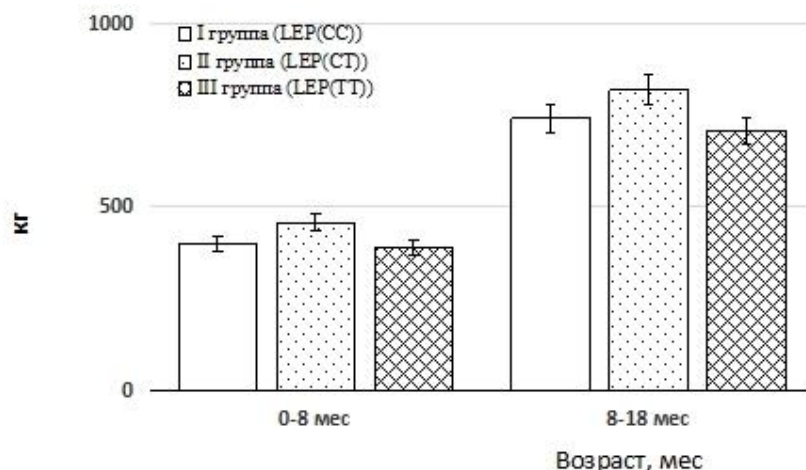


Рис. 3. Абсолютный прирост бычков герефордской породы с различными генотипами полиморфизма гена LEP/A80V, кг.

Максимальные значения прироста были достигнуты в период 8-18 месяцев, при наибольшем значении данного показателя во II (LEP^{CT}) группе (817 кг).

По итогам исследований была проведена оценка относительной скорости роста бычков (табл. 1).

Таблица 2. Динамика относительной скорости роста бычков герефордской породы с различными генотипами полиморфизма гена LEP/A80V, %

Возрастной период, мес.	Группа		
	I группа (LEP ^{CC})	II группа (LEP ^{CT})	III группа (LEP ^{TT})
7-9 мес	18	20	19
10-12 мес	16	17	16
13-15 мес	13	14	13
16-18 мес	11	12	11

Установленные различия по показателю относительной скорости роста между группами были отмечены на протяжении всего экспериментального исследования, при этом наиболее значительные изменения были характерны для периода 7-9 месяцев.

Закономерно, что величина данного показателя во II (LEP^{CT}) группе оказалась наибольшей и превышала значение этого показателя на 2,0% в I (LEP^{CC}) группе и на 1,0% – в III (LEP^{TT}) группе. Между тем в последующие периоды: 10-12, 13-15 и 16-18 месяцев, I (LEP^{CC}) группа не уступала аналогам из II (LEP^{CT}) и III (LEP^{TT}) групп. Это связано с меньшей живой массой

бычков I (LEP^{CC}) группы в начале оцениваемых периодов. При анализе динамики роста в приоритете находятся абсолютные, а не относительные величины.

Заключение

Таким образом, при анализе гомо- и гетерозиготного проявления гена $LEP/A80V$, отмечена явная разница в показателях в группе экспериментальных животных гетерозиготных по аллелю T (II (LEP^{CT}) группа). Разница между животными гомозиготными по аллелю C (I (LEP^{CC}) группа) и гомозиготными по аллелю T (III (LEP^{TT}) группа) была незначительной.

(Исследования выполнены в соответствии с планом НИР на 2019-2021 гг. ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН в рамках тематического плана по госзаданию № 0761-2019-0009)

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковалюк Н.В., Гырнец Е.А. Полиморфизм аллелей гена LEP как генетический маркер функционального долголетия крупного рогатого скота. Химия и биология. 2016. №. 6(24): 56-60.
2. Sedykh T.A., Gizatullin R.S., Dolmatova I.Yu. et. al. Effects of polymorphism in $TG5$ and LEP genes on meat productivity of Hereford and Limousin bull calves Russian. Agricultural Sciences. 2016. 42: 361-366.
3. Sharipov A.A., Shakirov Sh.K., Yulmeteva L.I. et. al. Molecular genetic aspects of beef cattle breeding for meat marbling. Vestn. Myasn. Skotovod. 2014. 2(85): 59-64.
4. Dubern B., Clement K. Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. Biochimie. 2012. 94(10): 2111-2115.
5. Farooqi I.S., Matarese G., Lord G.M. et. al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. J Clin Invest. 2002. 110(8): 1093-103.
6. Komisarek J. Impact of LEP and $LEPR$ gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein – Friesian cattle. Animal Science Papers and Reports. 2010. 10: 133-141.
7. Hashemi A., Mardani K., Farhadian M. et. al. Allelic polymorphism of Makoei sheep leptin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism African. Journal of Biotechnology. 2011. 10(77): 17903-17906.
8. Yoon D.H., Cho B.H., Park B.L. Highly polymorphic bovine leptin gene. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2005. 18(11): 1548-1551.
9. Szyda J., Komisarek J. Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle. J. Dairy sci. 2007. 90: 2971-2979.
10. Giblin L.A., Butler S.T., Kearney B.M. et. al. Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires. BMC Genetics 2010. 11: 73-78.
11. Boucher D.A., Palin M.F., Castonguay H.F. et. al. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (LEP) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. Can. J. Anim. Sci. 2006. 86: 31-35.
12. Liefers S.C., Pas M.F., Veerkamp R.F. Associations between Leptin Gene Polymorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed Intake, and Fertility in Holstein Heifers. J. Dairy Sci. 2002. 85: 1633-1638.
13. Shojaei M.V., Abadi M.M., Fozzi M.A. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. J. Cell Mol. Res. 2011. 2: 67-73.
14. Bahrami A., Behzadi S., Miraei-Ashtiani S.R. Genetic polymorphisms and protein structures

in growth hormone, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 1 and leptin in Mehraban sheep. Gene. 2013. 527: 397-404.

15. Qureshi Z.I., Farid A.H., Babar M.E. et. al. Leptin gene polymorphism in Lohi, Kajli and Spili breeds of sheep. Pak. Vet. J. 2015. 35: 321-324.

Поступила 12 декабря 2019 г.

(Контактная информация:

Косян Дианна Багдасаровна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук»; адрес: г. Оренбург, 9 Января, 29; kosyan.diana@mail.ru;

Русакова Елена Анатольевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук»; адрес: г. Оренбург, 9 Января, 29, тел.: +7(919)860-24-78; elenka_rs@mail.ru)

LITERATURA

1. Kovalyuk N.V., Gyrnets E.A. LEP gene mall polymorphism as a genetic marker of functional cattle longevity. Chemistry and biology. 2016.No. 6 (24): 56-60.
2. Sedykh T.A., Gizatullin R.S., Dolmatova I.Yu. et. al. Effects of polymorphism in TG5 and LEP genes on meat productivity of Hereford and Limousin bull calves Russian. Agricultural Sciences.2016. 42: 361–366.
3. Sharipov A.A., Shakirov Sh.K., Yulmeteva L.I. et. al. Molecular genetic aspects of beef cattle breeding for meat marbling. Vestn. Myasn. Skotovod. 2014. 2(85): 59–64.
4. Dubern B., Clement K. Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. Biochimie. 2012. 94(10): 2111-2115.
5. Farooqi I.S., Matarese G., Lord G.M. et. al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. J Clin Invest. 2002. 110(8): 1093-103.
6. Komisarek J. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein – Friesian cattle. Animal Science Papers and Reports. 2010. 10: 133–141.
7. Hashemi A., Mardani K., Farhadian M. et. al. Allelic polymorphism of Makoei sheep leptin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism African. Journal of Biotechnology. 2011. 10(77): 17903-17906.
8. Yoon D.H., Cho B.H., Park B.L. Highly polymorphic bovine leptin gene. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2005. 18(11): 1548-1551.
9. Szyda J., Komisarek J. Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle. J. Dairy sci. 2007. 90: 2971-2979.
10. Giblin L.A., Butler S.T., Kearney B.M. et. al. Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires. BMC Genetics 2010. 11: 73-78.
11. Boucher D.A., Palin M.F., Castonguay H.F. et. al. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (LEP) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. Can. J. Anim. Sci. 2006. 86: 31-35.
12. Liefers S.C., Pas M.F., Veerkamp R.F. Associations between Leptin Gene Polymorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed Intake, and Fertility in Holstein Heifers. J. Dairy Sci. 2002. 85: 1633–1638.
13. Shojaei M.V., Abadi M.M., Fozzi M.A. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. J. Cell Mol. Res. 2011. 2: 67-73.
14. Bahrami A., Behzadi S., Miraei-Ashtiani S.R. Genetic polymorphisms and protein structures in growth hormone, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 1 and leptin in Mehraban sheep. Gene. 2013. 527: 397-404.

15. Qureshi Z.I., Farid A.H., Babar M.E. et. al. Leptin gene polymorphism in Lohi, Kajli and Spili breeds of sheep. Pak. Vet. J. 2015. 35: 321-324.

Образец ссылки на статью:

Косян Д.Б., Русакова Е.А. Взаимосвязь полиморфизма гена *lep/a80v* с ростовыми характеристиками крупного рогатого скота. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2019. 4. 9с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2019-4/Articles/DBK-2019-4.pdf>). DOI: **10.24411/2304-9081-2019-14028**