

ПОЛИМОРФИЗМ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН ГЕНА МИОСТАТИНА У КУР УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

С. В. РУДАЯ, Е. В. РЯБИНИНА, В. А. МЕЛЬНИК,
Л. М. ПАЛЬВАЛЬ

Государственная опытная станция птицеводства Национальной академии аграрных наук Украины, с. Борки, Украина, 63421

(Поступила в редакцию 14.01.2021)

Проанализированы две популяции кур украинской селекции разного направления продуктивности по двум однонуклеотидным заменам в экзоне 1 гена миостатина AG в положении 2109 и GC – в положении 2244.

В популяции кур мясо-яичного направления продуктивности по замене MST2109 чаще всего встречались особи с генотипом G₁G₁, в результате чего установлено смещение в частоте аллелей в сторону преимущественного распространения аллеля G₁ в изученной группе кур и нарушения генетического равновесия ($\chi^2 = 6,74$) по этому локусу. По замене MST2244 большинство птицы было представлено особями с генотипом CC с повышенной частотой встречаемости в группе аллеля С.

В другой популяции яично-мясного направления продуктивности доминировали особи с генотипом AG₁ – частота встречаемости была на уровне 0,68 по замене MST2109. По замене MST2244 преобладали особи с генотипом CG₁ (0,51) при повышенной частоте встречаемости аллеля G₂ (0,715) в исследованной группе птицы.

Доказано, что птица мясо-яичного направления продуктивности линии Г2 породы Плимутрок белый и яично-мясного направления продуктивности линии 14 породы Полтавская глинистая украинской селекции значительно отличается по исследованному SNP гена миостатина. В частности, куры мясо-яичного направления продуктивности имели высокую частоту аллеля G – 0,94 (MST2109) и аллеля С – 0,875 (MST2244). Тогда как у кур яично-мясного направления продуктивности, наоборот, наблюдали повышенную частоту аллеля А – 0,57 (MST2109) и аллеля G – 0,715 (MST2244).

Установили, что локусы гена миостатина по двум однонуклеотидным заменам в экзоне 1 являются полиморфными в исследованных популяциях кур разного направления продуктивности украинской селекции. Это позволяет использовать эти замены в дальнейших исследованиях по определению генетической характеристики различных популяций кур, а также для установления связи между SNP и хозяйственно-полезными признаками.

генетическая структура, полиморфизм, генотип, ген, аллель, популяция, рестрикция.

Two populations of Ukrainian-bred chickens of different productivity trends were analyzed for two single-nucleotide substitutions in exon 1 of the myostatin gene AG at position 2109 and GC at position 2244. In the population of meat-producing chickens for the replacement of MST2109, individuals with the G₁G₁ genotype were most often found, so that a shift in the allele frequency towards the preferential distribution of the G₁ allele in the studied group of chickens and the disturbance of genetic equilibrium ($\chi^2 = 6.74$) at this locus was established. For the replacement of MST2244, most chickens were represented by the CC genotype individuals with an increased frequency of occurrence in the C allele group.

In another population of chickens raised both for their eggs and meat, individuals with the

AG₁ genotype dominated – the frequency of occurrence was at the level of 0.68 for the replacement of MST2109. For the replacement of MST2244 prevailed CG₁ genotype individuals (0.51) with the G₂ allele overfrequency (0.715) in the studied group of birds.

It is proved that the White Plymouth Rock dual-purpose poultry of G2 line which is primarily suited to meat production but also lays well and the Poltava Clay, a Ukrainian breed of line 14 chickens kept for their eggs and meat, significantly differ according to the studied SNP of the myostatin gene. In particular, meat-producing chickens had a high G allele frequency – 0.94 (MST2109) and that of C allele – 0.875 (MST2244). Whereas in the egg-laying chickens, on the contrary, an increased A allele frequency – 0.57 (MST2109) and G allele overfrequency – 0.715 (MST2244) was observed.

It was established that the loci of the myostatin gene for two single-nucleotide substitutions in exon 1 are polymorphic in the studied populations of Ukrainian-bred chickens of different productivity directions. This allows us to use these substitutions in further studies to determine the genetic characteristics of different chicken populations, as well as to establish the relationship between SNP and utility traits.

Key words: genetic pattern, polymorphism, genotype, gene, allele, population, restriction.

Введение. В современном птицеводстве вместе с классическими методами селекции, которые основаны преимущественно на оценке и отборе особей по фенотипу, быстрыми темпами разрабатываются и внедряются методы геномной селекции, основанные на оценке по генотипу. Основой для проведения маркер ассоциированной селекции (MAS) является изучение генов-кандидатов, определение их влияния на фенотипические показатели, которые интересуют исследователя.

Целью современной селекции в птицеводстве является создание высокопродуктивных пород и линий. В связи с этим, различными методами исследуются генотипы пород и линий птицы для выявления высокоспецифичных маркеров яйценоскости и мясных качеств [1, 2, 3]. Определение этих молекулярно-генетических маркеров позволит проводить селекцию птицы на принципиально новых началах, потенциально стремительно усилит интенсивность селекции и обеспечит максимально эффективное раскрытие продуктивного потенциала [4]. К числу наиболее перспективных генов-кандидатов в направлении яичной продуктивности птицы относятся гены, функционирование которых связано с обеспечением основных физиологических функций организма [5]. Все чаще публикуются работы, направленные на поиск однонуклеотидных замен (SNP) в кодированной части отдельных генов с целью выявления их связи с хозяйственно-полезными признаками [6, 7, 8, 9]. Новый регуляторный фактор – миостатин (MSTN), который был выявлен в 1997 году, вызвал большой интерес исследователей [10]. Уже в первых исследованиях было установлено, что миостатин обладает рядом необычных свойств и ингибирует развитие мышечных тканей у животных. Исследования на курах и мышах показали, что блокирование действия миостатина приводит к значительному увеличению сухой мышечной массы с практически полным отсутствием жира [11, 12, 13].

Миостатин относится к факторам роста – класс небольших природных пептидов и белков, участвующих в сигнальных системах организма эукариот, связываясь с рецепторами на поверхности клеток с главной целью стимулирования роста и дифференциации. Кроме того, факторы роста важны для регулирования разнообразия клеточных процессов.

Термин «фактор роста» часто используется равноценно с терминами «цитокины» и «гормоны». Однако, в отличие от гормонов, факторы роста секретируются локально и имеют ограниченный спектр действия, тогда как гормоны переносятся кровотоком и имеют эффект на значительном удалении ткани организма. Кроме того, гормоны не обязательно имеют пептидную природу.

Ген миостатина достаточно полиморфный. Десять однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и 20 гаплотипов были обнаружены в 28 породах крупного рогатого скота, некоторые из них были специфическими [14].

Однонуклеотидные замещения обнаружены в различных частях этого гена, зато основная работа сегодня ведется в направлении поиска взаимосвязи хозяйственно полезных признаков и отдельных замещений [15, 16, 17, 18]. В будущем эти маркеры позволят проводить отбор птицы для дальнейшего разведения с целью закрепления желаемых генотипов.

Исследование особенностей генетико-популяционных параметров кур украинской селекции на основе данных полиморфизма различных функциональных генов, аллельных вариантов, связанных с проявлением хозяйственно-полезных признаков проводились нами ранее [19, 20, 21, 22]. Но, для более эффективной работы с птицей необходимо в первую очередь оценить уровень генетической изменчивости по ряду показателей в опытной популяции. Как правило, оценку генетико-популяционных параметров проводят с учетом различных маркерных систем [23].

Цель работы – исследовать генетическую структуру кур украинской селекции разного направления продуктивности по двум однонуклеотидным заменам в гене миостатина с использованием метода PCR-RFLP.

Основная часть. Исследования проводились в ПЦР лаборатории Государственной исследовательской станции птицеводства НААН. В работе использовали птицу мясо-яичного направления продуктивности – линию Г2 породы Плимутрок белый (рис. 1) и яично-мясного направления продуктивности – линию 14 породы Полтавская глинистая (рис. 2). Для изучения полиморфизма генов использовали метод ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин ре-

стрикционных фрагментов, PCR-RFLP).



Рис. 1. Куры линии Г2 породы Плимутрок белый

Исследования по изучению полиморфизма генов осуществляли поэтапно – приготовление образцов, выделение ДНК, проведение амплификации, выполнение рестрикции ампликонов и электрофорез продуктов рестрикции, анализ полученных результатов. Биологический материал для исследований отбирали методом «капля крови на бумаге» с гребня птицы. Для предупреждения контаминации каждый образец подсушивали, маркировали и отдельно упаковывали.



Рис. 2. Куры линии 14 породы Полтавская глинистая

Выделение ДНК проводили с помощью набора реактивов «NeoPrep100 DNA» (Неоген, Украина). Для контроля успешного выделения нуклеиновых кислот проводили электрофорез в 0,7 % агарозном

геле (CSL-AG100, «Cleaver Scientific», Великобритания) при напряжении 150 V в течение 5 мин. Образцы визуализировали с помощью етидиума бромид в ультрафиолетовом спектре.

Для каждого типа образца реакцию проводили с использованием специфических праймеров, которые фланкируют соответствующий фрагмент гена: MSTrg (прямой 5'-AACCAATCGTCGGTTTTGAC-3', обратный 5'-CGTTCTCTGTGGGCTGACTA-3') и MSTex1 (прямой 5'-TAGTCAGCCCACAGAGAACG-3', обратный 5'-CGAAAGCAGCAGGGTTGTTA-3'). Продукты амплификации обрабатывали с помощью эндонуклеаз рестрикции HpaII и HinPII. В результате изучили две однонуклеотидные замены, а именно G/A в положении 2109 и G/C – в положении 2244 гена миостатина.

ПЦР проводили с помощью реагентов DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific) с использованием термоциклера «Терцик» (ДНК-технология) по соответствующим программам. Объем конечной смеси составлял 20 µL, концентрация праймеров – 0,2 µM. Программа амплификации для проведения ПЦР – 94°C 5 мин (денатурация), 35 циклов: 94 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 30 с, (элонгация) 72 °C 5 мин. Для рестрикции в пробирку добавляли 0,5 мкл. необходимой рестриктазы HpaII или HinPII (Thermo), перемешивали и инкубировали 3 часа при 37 °C.

Для электрофореза использовали 1,5 % агарозный гель. Электрофорез проводили в течение 30–40 мин. при напряжении 120 V. Для определения длины ампликонов и продуктов рестрикции применяли маркеры молекулярных масс M-50 и M-100 (в зависимости от размера амплифицированных фрагментов). Визуализацию фрагментов ДНК в геле осуществляли с использованием етидиума бромид в ультрафиолетовом спектре.

Генотипирование по каждому локусу проводили путем определения размеров фрагментов ДНК после проведения электрофореза. При использовании пары праймеров MSTrg длина ампликонов составила 297 п.н. После обработки эндонуклеазой HpaII наблюдали генотипы: G1G1 при наличии фрагментов длиной 260 и 37 п.н., G1A – при наличии фрагментов длиной 297, 260 и 37 п.н., а генотип AA соответствовал ампликону – 297 п.н.

Пара праймеров MSTex1 позволила получить ампликоны длиной 320 п.н. После обработки эндонуклеазой HinPII обнаружили генотипы: CC при наличии фрагментов 203 и 117 п.н., CG2 – 320, 203 и 117 п.н. А генотип G2G2 не поддавался расщеплению ферментом и имел фраг-

мент 320 п.н., что также соответствует длине ампликона.

На основе полученных электрофореграм была рассчитана частота генотипов и аллелей по заменам MST2109 и MST2244. У кур мясояичного направления продуктивности линии Г2 по замене MST2109 наблюдается существенное преобладание генотипа G_1G_1 – частота встречаемости на уровне 0,89 (табл.1). Это позволило предположить о значительных расхождениях в изученных аллелях. Так, аллель А у птицы исследованной группы линии Г2 встречался довольно редко (0,065), тогда как частота аллеля G_1 была на уровне 0,935, что и вызвало нарушение генетического равновесия ($\chi^2 = 6,74$) по этому локусу.

Таблица 1. Частота генотипов и аллелей по двум SNP, выявленным в миостатинном гене у кур линии Г2 (n=100)

Локус	Генотип	Частота генотипов	Аллель	Частота аллелей	χ^2
MST2109	G_1G_1	0,89	G_1	0,935	6,74
	G_1A	0,09			
	AA	0,02	A	0,065	
MST2244	CC	0,76	C	0,875	0,26
	CG_2	0,23			
	G_2G_2	0,01	G_2	0,125	

При анализе частот встречаемости у кур линии Г2 по замене MST2244 отмечали значительное преимущество гомозигот CC (0,76), что способствовало смещению частот аллелей. Количество гетерозигот по этой замене была значительной – 0,23. Но несмотря на это, наблюдаем преимущество аллеля C над аллелем G_2 соответственно 0,875 и 0,125. По замене MST2244 нарушение генетического равновесия не установлено ($\chi^2 = 0,26$).

У кур линии 14 фактическое и теоретически ожидаемое распределение генотипов в обеих заменах не совпадал, поэтому выявлен значительный избыток гетерозигот, по сравнению с теоретически ожидаемым. Установлено высокодостоверное ($P > 0,999$) нарушение генетического равновесия в обеих заменах гена миостатина ($\chi^2=14,99$; 6,32) (табл. 2). Это свидетельствует о значительной внутрилинейной гетерогенности, что может быть следствием интенсивного искусственного отбора по определенным признакам, которые вызывают гетерозиготное состояние птицы.

В случае с заменой MST2109 отмечали значительное преобладание гетерозигот AG_1 (68 %), 23 % составили особи с генотипом AA. Частота аллеля А была на уровне 0,570, тогда как частота аллеля G_1 у птицы исследованной группы составила 0,430.

Таблица 2. Частота генотипов и аллелей по двум SNP, выявленным в миостатиновом гене у кур линии 14 (n=100)

Локус	Генотип	Частота генотипов	Аллель	Частота аллелей	χ^2
MST2109	G_1G_1	0,09	G_1	0,430	14,99
	$A G_1$	0,68			
	AA	0,23	A	0,570	
MST2244	CC	0,03	C	0,285	6,32
	CG_2	0,51			
	G_2G_2	0,46	G_2	0,715	

Анализируя частоты встречаемости разных генотипов по замене MST2244 у кур линии 14, обнаружили незначительное преимущество гетерозигот CG_2 (0,51) над гомозиготами G_2G_2 (0,46). Генотип CC был выявлен лишь в 3 % особей, что указывает на значительные различия изученных аллелей – преимущество аллеля G_2 над аллелем C соответственно 0,715 и 0,285.

Поскольку во время исследований было проанализировано незначительное количество поголовья кур обеих линий, поэтому полученные данные относятся только к исследованным группам кур каждой популяции. Хотя, полученные результаты указывают, что подопытная птица значительно отличается по исследованному SNP гена миостатина. Так, куры мясо-яичного направления продуктивности имели высокую частоту аллеля G_1 – 0,94 (MST2109) и аллеля C – 0,88 (MST2244), что согласуется с данными других исследователей (Dementeva et al., 2015). У кур яично-мясного направления продуктивности, наоборот, наблюдали повышенную частоту аллеля A – 0,57 (MST2109) и аллеля G_2 – 0,72 (MST2244), хотя такие показатели ранее отмечали в промышленной линии кур мясного направления продуктивности породы Корниш (Dementeva et al., 2015; Dementeva et al., 2017). Отметим, что каждая порода или линия птицы имеет свою уникальную генетическую структуру. Поэтому, вероятно, полученные нами данные характерны именно для изученных популяций кур украинской селекции.

Поскольку последовательность гена миостатина у некоторых пород кур прочитана, в нем обнаружено значительное количество различных аллельных вариантов, а также определены взаимосвязи однонуклеотидных замен с продуктивными показателями кур (Mitrofanova et al., 2018; Dementieva et al., 2017; Mitrofanova et al., 2015; Dementieva et al., 2015; Zhang et al., 2019), поэтому в дальнейших исследованиях можно использовать ген миостатина в качестве маркера, в том числе и по отдельным SNP.

Таким образом, анализ частоты распределения однонуклеотидных замен в гене миостатина позволил найти специфические (маркеры) фрагменты ДНК (маркеры) в исследованных популяциях кур украинской селекции. Это позволит использовать данные маркеры для характеристики популяций кур, а также для поиска взаимосвязи между SNP и хозяйственно полезными признаками, ведь отбор желаемых генотипов будет способствовать повышению интенсивности размножения птицы с высокими продуктивными качествами. Кроме того, определение генотипа приведет к целенаправленной селекционной работе на повышение продуктивности кур.

Заключение. 1. Анализ генетической изменчивости кур линии Г2 и линии 14 позволил найти фрагменты ДНК, которые являлись специфическими для исследованных SNPs. Это открывает широкие возможности использования однонуклеотидных замен MST2244 и MST2109 для повышения эффективности селекционной работы.

2. У кур линии Г2 по замене MST2109 выявлено преимущество особей с генотипом G_1G_1 и как результат установлено смещение в частоте аллелей в сторону преимущественного распространения аллеля G_1 в изученной группе. По замене MST2244 выявлено преимущество особей с генотипом CC и повышенную частоту встречаемости в группе аллеля C .

3. Выявили значительное ($P > 0,999$) нарушение генетического равновесия у кур линии 14 по двум заменам гена миостатина ($\chi^2 = 14,99; 6,32$).

4. Установлено преимущество гетерозигот AG_1 по замене MST2109 и CG_2 по замене MST2244 у кур линии 14.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fulton, J. E. Molecular genetics in a modern poultry breeding organization / J. E. Fulton // World's poultry science journal. – 2008. – № 64. – P. 171–176.

2. Новгородова, И. П. Анализ генетического разнообразия декоративных пород кур на основе микросателлитных маркеров / И. П. Новгородова, Н. А. Зиновьева, У. А. Гладырь, В. И. Фисинин // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – № 1(30). – С. 69–71.

3 Баркова, О. Ю. Влияние двух мажорных QTL в хромосоме 4 на признака яйца курицы-несушки / О. Ю. Баркова // Молочнохозяйственный вестник. – 2018. – № 2(30). – С. 8–14.

4. Teneva, A. Molecular markers in animal genome analysis / A. Teneva // Biotechnology in Animal Husbandry. – 2009. – № 25(5–6). – P. 1267–1284.

5. Dodgson, J. B. DNA marker technology: a revolution in animal genetics / J. B. Dodgson, H. H. Cheng, R Okimoto // Poultry Science. – 1997. – № 76(8). – P. 1108–1114. DOI: 10.1093/ps/76.8.1108

6. Митрофанова, О. В. Динамика частоты встречаемости однонуклеотидных замен в гене миостатина у кур пушкинской породы биоресурсной коллекции /

О. В. Митрофанова, Н. В. Дементьева // Эффективное животноводство. – 2018. – № 3. – С. 50–51.

7. Митрофанова, О. В. Динамика экстерьерных показателей у кур при отборе по полиморфным вариантам в гене миостатина / О. В. Митрофанова, Н. В. Дементьева, Т. А. Ларкина // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса. – 2019. – № 2 (54). – С. 222-228. DOI:10.32786/2071-9485-2019-02-27

8. Митрофанова, О. В. Влияние различных рационов кормления на ассоциацию полиморфизма в гене MSTN и роста живой массы у молодняка петушков пушкинской породы / О. В. Митрофанова, Н. В. Дементьева // Молокохозяйственный вестник. – 2018. – № 3(31). – С. 62–70.

9. Ewuola, M. K. Insilico Analysis of Myostatin Gene in Selected Poultry Species / M. K. Ewuola, M. Omolara Akinyemi, H. Osamede Osaiyuwu // Journal of Advances in Biology & Biotechnology. – 2018. – № 17(2). – P. 1-10. DOI: <https://doi.org/10.9734/JABB/2018/39520>

10. Mc Pherron A. C. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member / A. C. Mc Pherron, A. M. Lawler, S. J. Lee // Nature. – 1997. – № 387 (6628). – P. 83-90. DOI: 10.1038/387083a0

11. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation / M. Thomas, B. Langley, C. Berry [et al] // J. Biol. Chem. – 2000. – № 275(51). – P. 40235-40243. DOI: 10.1074/jbc.M004356200

12. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal / S. Mc Croskery, M. Thomas, L. Maxwell [et al] // J. Cell. Biol. – 2003. – № 162(6). – P. 1135-1147. DOI: 10.1083/jcb.200207056

13. Aiello D. The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals / D. Aiello, K. Patel, E. Lasagna // Animal Genetics. – 2018. – № 49(6). – P. 505-519. DOI: <https://doi.org/10.1111/age.12696>

14. Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds / S. Dunner, E. Miranda, Y. Amigues [et al] // Genet. Sel. Evol. – 2003. – № 35(1). – P. 103-118. DOI: 10.1186/1297-9686-35-1-103

15. The single nucleotide polymorphisms of myostatin gene and their associations with growth and carcass traits in daheng broiler / X. X. Zhang, J. S. Ran, T. Lian [et al] // Brazilian Journal of Poultry Science. – 2019. – № 21(3). eRBCA-2018-0808. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0808>

16. The rate of weight gain and productivity of a chicken broiler cross with various polymorphic types of the myostatin gene / N. V. Dementeva, O. V. Mitrofanova, V. I. Tyshchenko // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2017. – № 7 (1). – P. 1–5. DOI: <https://doi.org/10.1134/S207905971701004X>

17. Связь генотипов по однонуклеотидным заменам в гене миостатина с показателями живой массы у кур Юрловской голосистой породы / О. В. Митрофанова, Н. В. Дементьева, В. И. Тыщенко [и др.] // Генетика и разведение животных. – 2015. – № 1. – С. 39–42.

18. Дементьева, Н. В. Полиморфизм однонуклеотидных замен в гене GDF-8 у кур генофондных пород / Н. В. Дементьева, О. В. Митрофанова, С. А. Шабанова // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. Санкт-Петербург, 2015. – № 38. – С. 59–62.

19. Кулібаба, Р. О. Генетична характеристика популяції курей лінії Г2 породи Плімутрок білий за біохімічними та ДНК-маркерами / Р. О. Кулібаба, С. В. Руда // Матеріали XI міжнар. конф. «Птахівництво 2015», Трускавець. – 2015. – С. 54–59.

20. Рудая, С. В. Полиморфизм в промоторе гена пролактина у кур разного

направления продуктивности / С. В. Рудая // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : материалы XX междунар. науч.-практ. конф., Горки: БГСХА, 2017. – № 20(1). – С. 136–140.

21. Генетическая структура кур украинской селекции мясо яичного направления продуктивности / С. В. Рудая, О. А. Катеринич, С. Н. Панькова, С. В. Рябинин // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сб. науч. тр., Горки: БГСХА, 2018. – № 21(1). – С. 93–99.

22. Руда, С. В. Генетична характеристика м'ясо-яєчних курей вітчизняної селекції за ДНК-маркерами / С. В. Руда, Л. М. Пальваль // Птахівництво 2019: матеріали XV міжнар. конф. і виставки. Трускавець, 2019. – С. 133–139.

23. Rothschild, M. F. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock / M. F. Rothschild, M. Soller // Probe newslett. Agric. Genomic. – 1997. – Vol. 8. – P. 13–20.