Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):39-43
DOI 10.18699/VJ16.154

Скорость роста и продуктивность бройлерного кросса кур с разными полиморфными типами гена миостатина

Н.В. Дементьева, О.В. Митрофанова, В.И. Тыщенко, В.П. Терлецкий, А.Ф. Яковлев

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

Поиск однонуклеотидных замен (SNP) в гене миостатина является перспективным направлением исследований, так как этот ген вовлечен в формирование важных биологических и продуктивных свойств у кур. С помощью метода ПЦР-ПДРФ проведен анализ частот аллелей и генотипов у кур породы корниш промышленной линии Г5 кросса «Смена-8». Использовали две пары праймеров, позволяющих получить ПЦР-продукт в участке гена миостатина. Рассмотрены две однонуклеотидные замены в экзоне 1 гена миостатина: G/A в положении *MST2109* и G/C в положении *MST2244*. По частоте встречаемости обнаружено существенное преобладание в локусе *MST2244* дезоксинуклеозидтрифосфата G над C и в локусе *MST2109* – A над G. Различий по показателям продуктивности между генотипами при замене *MST2109* обнаружено не было. При анализе аллельного разнообразия по локусу *MST2244* обнаружены достоверные различия по живой массе цыплят в возрасте 7 дней между генотипами *CC* и G_2G_2 ($p < 0{,}01$), CG_2 и G_2G_2 ($p < 0{,}05$). Особи с генотипом G_2G_2 (203,52 г) превосходили животных с генотипами *CC* (179,5 г) и CG_2 (193,95 г) по живой массе в 7 дней. Выявлены различия между генотипами *CC* и G_2G_2 по живой массе в 33 дня ($p < 0{,}05$). Таким образом, проведенные исследования позволили оценить частоту встречаемости аллелей в гене миостатина линии Г5 породы корниш. Установленные закономерности дадут возможность учитывать определенные генотипы кур по гену миостатина для ускорения селекционного процесса.

Ключевые слова: куры; полиморфизм; ген миостатина; ПЦР-ПДРФ; аллель; генотип.

The rate of weight gain and productivity of chicken broiler cross with various polymorphic types of myostatin gene

N.V. Dementeva, O.V. Mitrofanova, V.I. Tyshchenko, V.P. Terletskiy, A.F. Yakovlev

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

The search for single nucleotide polymorphisms (SNP) in the myostatin gene is a promising direction of research as this gene is involved in the development of important biological and productive traits in chicken. Using PCR-RFLP technique, an analysis of allele and genotype frequencies in Cornish chicken breed of G5 line of Smena-8 cross has been conducted. Two pairs of primers allowing PCR product to be obtained in the myostatin gene have been used. Two single nucleotide substitutions on exon 1 of the myostatin gene have been under investigation: G/A in *MST2109* and G/C in *MST2244*. A significant predominance of deoxynucleotide G in *MST2244* over C and deoxynucleotide A over G in *MST2109* has been observed. Differences in productive traits between genotypes in *MST2109* were not detected. Analysis of allelic variability by *MST2244* locus showed statistically significant differences in live weight at the age of 7 days between *CC* and G_2G_2 genotypes ($p < 0.01$), CG_2 and G_2G_2 ($p < 0.05$). G_2G_2 individuals (203.52 g) were significantly heavier than *CC* (179.5 g) and CG_2 (193.95 g) chickens at the age of 7 days. Statistically significant differences between the *CC* and G_2G_2 genotypes in live weight at the age of 33 days have been revealed ($p < 0.05$). Thus, this research has led to a better understanding of allele frequencies in the myostatin gene in line G5 of Cornish breed. The results obtained will allow particular myostatin gene-based genotypes to be taken into account for accelerating the breeding process in the broiler poultry industry.

Key words: chicken; polymorphism; myostatin gene; PCR-RFLP; allele; genotype.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Дементьева Н.В., Митрофанова О.В., Тыщенко В.И., Терлецкий В.П., Яковлев А.Ф. Скорость роста и продуктивность бройлерного кросса кур с разными полиморфными типами гена миостатина. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):39-43. DOI 10.18699/VJ16.154

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Dementeva N.V., Mitrofanova O.V., Tyshchenko V.I., Terletskiy V.P., Yakovlev A.F. The rate of weight gain and productivity of chicken broiler cross with various polymorphic types of myostatin gene. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):39-43. DOI 10.18699/VJ16.154

УДК 575.174.015.3:636.5.033
Поступила в редакцию 05.05.2015 г.
Принята к публикации 27.07.2015 г.
© АВТОРЫ, 2016

e-mail: dementevan@mail.ru

Изучение полиморфизма генов, связанных со скоростью роста и развития организма, актуально для многих видов сельскохозяйственных животных, особенно для бройлерных кроссов птицы, обладающей высокой скоростью прироста живой массы. В мясном птицеводстве отбор ведется сразу по нескольким признакам: скорости роста, уменьшению абдоминального жира, оплате корма, которые взаимодействуют друг с другом. Молекулярные маркеры способны стать хорошим дополнительным инструментом для успешного отбора птицы с нужными качествами.

В проведенных ранее исследованиях по определению однонуклеотидных замен в гене гормона роста у кур ФГУП ППЗ СГЦ «Смена» найдена их связь с хозяйственными признаками (Яковлев и др., 2013). Выявление у миостатина (*MSTN*) необычной способности ингибировать развитие мускулатуры у высших позвоночных вызвало всплеск интереса к нему (McPherron et al., 1997). Блокирование пути от гена *MSTN* к мышечным клеткам приводит к выраженным позитивным эффектам. Так, у многих видов животных были обнаружены мутации в этом гене, приводящие к увеличению мышечной массы в два раза. Ярким примером оказались представители бельгийской голубой породы крупного рогатого скота, обладающие фенотипом двойной мускулатуры. (Kambadur et al., 1997; McPherron, Lee, 1997; Grobet et al., 1998). Миостатин оказался вовлечен в процессы старения, а также причастен к возникновению кахексии при ряде патологий. У высших позвоночных *MSTN* тканеспецифичен, его синтез происходит в скелетных мышцах, на которые он и оказывает биологические эффекты (Thomas et al., 2000; McCroskery et al., 2003).

У кур ген *MSTN* состоит из трех экзонов и двух интронов. Первый, второй и третий экзоны содержат 373, 374 и 1567 п.н. (п.н. – пар нуклеотидов) соответственно (Baron et al., 2002). Начиная с 2000 г. появились работы, направленные на поиск однонуклеотидных замен (SNP) в кодирующей части гена миостатина, с целью обнаружения их сцепления с хозяйственно полезными признаками (Ye et al., 2007; Zhang et al., 2012; Hu et al., 2013). Основная цель настоящей работы – определение частот встречаемости различных генотипов замен в локусах *MST2109* и *MST2244* гена миостатина у бройлерной линии кур с регистрацией уровня показателей роста и продуктивности.

Материалы и методы

Материалом для работы послужила ДНК, выделенная из крови 245-дневных кур и петухов породы корниш линии Г5 кросса «Смена-8» из ФГУП ППЗ СГЦ «Смена». ДНК выделяли по стандартной методике с использованием фенольно-детергентного метода (Тыщенко и др., 2002; Дементьева и др., 2003). Для анализа было взято 140 голов кур, отобранных из племенного ядра линии Г5. Кровь отбирали из подкрыльцовой вены в микропробирку, содержащую в качестве антикоагулянта 30 мкл 0,5 М ЭДТА. До исследования образцы хранили в холодильнике при –20 °С. Генотипы определяли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием следующих двух пар праймеров: MSTpr (прямой 5′-AAC-CAA-TCG-TCG-GTT-TTG-AC-3′, обратный 5′-CGT-TCT-CTG-TGG-GCT-GAC-TA-3′) и MSTex1 (прямой 5′-TAG-TCA-GCC-CAC-AGA-GAA-CG-3′, обратный 5′-CGA-AAG-CAG-CAG-GGT-TGT-TA-3′) (Ye et al., 2007). С их помощью получали два участка экзона 1 гена миостатина (*AF346599*). Продукты амплификации обрабатывали с помощью эндонуклеаз рестрикции *Hpa*II и *Hin*PII (Thermo Fisher Scientific, Литва). В результате были изучены две однонуклеотидные замены: G/A в положении 2109 и G/C в положении 2244 гена миостатина (rs313744840, rs316247861).

ПЦР проводили на амплификаторе «BioRad» (США) с использованием смеси следующего состава: 67 мМ трис-HCl pH 8,6, 2,5 мМ $MgCl_2$, 16,6 мМ NH_4OH, 0,125 мМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров, 50–100 нг геномной ДНК и 2,5 ед. Taq-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск) в объеме 10 мкл при режиме 35 циклов, каждый цикл: 30 с – 94 °С, 30 с – 60 °С, 30 с – 72 °С. Генотипы определяли с помощью анализа ПДРФ с применением эндонуклеазы *Hpa*II для замены *MST2109* и *Hin*PII для замены *MST2244*. Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в течение 1 ч при рабочем напряжении 7,5 В/см в TBE буфере (45 мМ трис-борат, 1 мМ ЭДТА), в 1,5 %-м агарозном геле, содержащем флюоресцентный краситель бромистый этидий. В качестве маркера, позволяющего оценить длину фрагментов ДНК на геле, использовали pUC19/*Msp*I. Сигнал фотографировали в системе гель-документации фирмы Кодак.

Рассчитывали частоту встречаемости генотипов и проверяли ее на отклонение от равновесия Харди – Вайнберга с применением критерия χ^2 (Животовский, 1991).

Различия между генотипами по продуктивным признакам птицы определяли путем вычисления достоверности разности между средними значениями количественного признака в выборках особей разного генотипа, рассчитанными в пакете программ Excel. Расчет основывался на критериях Пирсона, Шапиро – Уилка и достоверности *t* Стьюдента.

Для каждой исследованной особи были рассчитаны следующие показатели: живая масса в 7 дней (г); живая масса в 33 дня (г); половая зрелость (возраст снесения первого яйца); масса яиц в 210 и 364 дня (г); яйценоскость за 210 и 365 дней (шт.); доля оплодотворенных яиц (%); выводимость цыплят (%). Массу птицы определяли на весах марки «Госметр». Выводимость была рассчитана как отношение количества выведенных цыплят к количеству оплодотворенных яиц. Долю оплодотворенных яиц (%) вычисляли по отношению к общему числу заложенных на инкубацию яиц.

Результаты

На рисунке представлены результаты, полученные после использования эндонуклеаз рестрикции продуктов ПЦР и электрофореза. Особи с различным генотипом по анализируемым нами заменам четко отличались друг от друга.

При использовании пары праймеров MSTpr длина амплифицируемого фрагмента составила 297 п.н. После обработки эндонуклеазой *Hpa*II наблюдали следующую картину распределения фрагментов: генотип G_1A иденти-

фицировали при наличии фрагментов 297, 260 и 37 п.н.; генотип G_1G_1 – при наличии фрагментов 260 и 37 п.н., а генотип *AA* соответствовал амплификату. В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали pUC19/*Msp*I.

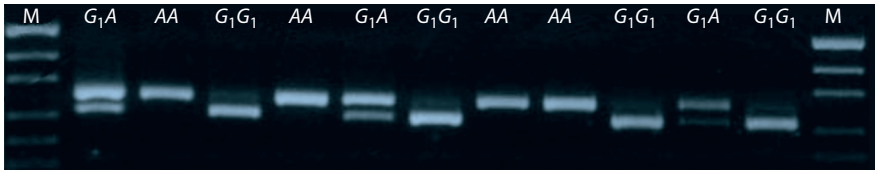
Пара праймеров MSTex1 позволяла получить фрагмент длиной 320 п.н. После обработки рестриктазой *Hin*PI обнаруживали три генотипа. Гетерозиготы CG_2 отличались наличием трех фрагментов: 320, 203 и 117 п.н., гомозиготы *CC* имели фрагменты 203 и 117 п.н., а у особей с генотипом G_2G_2 амплифицированный в ходе ПЦР фрагмент оставался не расщепленным ферментом рестрикции и составлял 320 п.н.

На основании полученных электрофореграмм были рассчитаны частоты генотипов и аллелей по заменам *MST2109* и *MST2244* (табл. 1). В случае с заменой в положении 2109 наблюдали значительное преобладание гетерозиготных генотипов AG_1 (57 %). Одну треть исследованных животных составили обладатели генотипа *AA*. При изучении замены в положении 2244 число гетерозигот CG_2 и гомозигот G_2G_2 оказалось практически одинаковым и составило, соответственно, 49 и 45 % от общего числа исследованных особей.

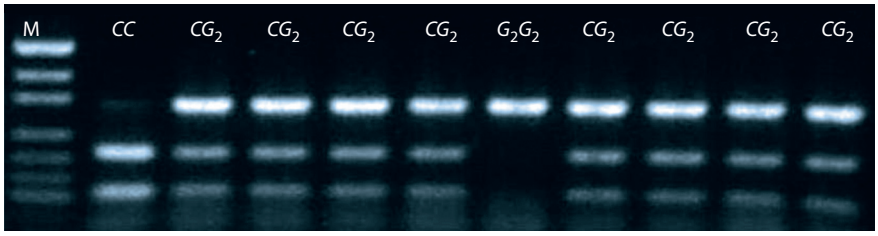
Показатели продуктивности кур в зависимости от генотипа при замене *MST2109* представлены в табл. 2. Достоверных различий между генотипами обнаружено не было. Можно отметить тенденцию увеличения живой массы в зависимости от наличия аллеля *A*. Так, особи генотипа *AA* имели наибольшую живую массу в 7 и 33 дня, а также лучшую яйценоскость за 210 и 364 дня.

Связь генотипов по *MST2244* с хозяйственно полезными признаками показана в табл. 3. Обнаружены достоверные различия по живой массе в 7 дней между носителями генотипов *CC* и G_2G_2 ($p < 0{,}01$), CG_2 и G_2G_2 ($p < 0{,}05$). Цыплята с генотипом G_2G_2 превосходили животных с генотипами CC и CG_2 по живой массе в 7 дней. Достоверные различия с вероятностью $p < 0{,}05$ выявлены между особями с генотипами *CC* и G_2G_2 по живой массе в 33 дня. Следует отметить, что куры с генотипом G_2G_2 отличались высокой яйценоскостью (за 210 и 364 дня), но разница недостоверна. Влияние генотипа на другие продуктивные показатели установлено не было.

а



б



Детекция генотипов замен нуклеотидов G/A в положении *MST2109* (*а*) и G/C в положении *MST2244* (*б*) с помощью ПЦР-ПДРФ в гене миостатина у кур.

M – маркер; *AA*, G_1G_1, *CC*, G_2G_2 – гомозиготные генотипы; G_1A, CG_2 – гетерозиготные.

Обсуждение

Промышленная птица линии Г5 породы корниш, разводимая в племенном птицеводческом заводе «Смена», представляет собой сильно отселекционированную по живой массе популяцию. Это связано с дальнейшим использованием этой линии в промышленном птицеводстве в качестве отцовской формы, которая в скрещивании с курами породы плимутрок дает эффект гетерозиса, проявляющийся в хорошей скорости роста гибридной птицы.

Метод ПЦР-ПДРФ позволяет генотипировать животных на наличие однонуклеотидных замен с высокой точностью и низкими затратами. Поэтому он удобен для оценки большого поголовья, что особенно актуально в птицеводстве. В изучаемой популяции кур породы корниш наблюдался полиморфизм по изученным заменам. При этом, несмотря на значительное количество гетерозигот, преобладали гомозиготы *AA* по замене *MST2109* и G_2G_2 по замене *MST2244*. Это, вероятно, обусловлено жестким отбором, которому подвергается популяция кур. Генотипы G_1G_1 и *CC*, имеющие низкие показатели живой массы, малочисленны.

Объем мышечной массы связан с работой гена миостатина. Миостатин – белок, подавляющий рост и дифференцировку мышечной ткани в организме. Он выступает в качестве негативного регулятора массы скелетных мышц и действует по принципу обратной связи. При возрастании мышечной массы увеличивается секреция миостатина, что тормозит дальнейший рост мышц. Однонуклеотидные замены в этом гене в некоторых случаях связаны со скоростью роста, репродуктивными показателями и качеством мяса (Kambadur et al., 1997; McPherron, Lee, 1997; Grobet et al., 1998).

В регуляторной области гена миостатина у кур имеются три SNPs, которые отличаются частотами аллелей между породами (Zhiliang et al., 2004). Было обнаружено, что в поколении F_2 от скрещивания бройлеров с шелковистыми курами гомозиготные генотипы *AA* и *BB* имеют более высокую массу брюшного жира, чем генотип *AB*.

С развитием молекулярно-генетических методов анализа начались попытки поиска взаимосвязей между отдельными нуклеотидными заменами и хозяйственно полезными признаками. Эти исследования особенно актуальны в птицеводстве, где идет быстрая смена поколений и результаты направленного отбора можно наблюдать достаточно быстро. Порода корниш прошла жесткий

Таблица 1. Частоты аллелей и генотипов, выявленных в локусах *MST2109* и *MST2244* гена миостатина у кур породы корниш кросса «Смена-8»

Локус	Генотип			Аллель		χ^2
MST2109	G_1G_1 ($n = 11$)	AG_1 ($n = 79$)	AA ($n = 48$)	G_1	A	
	0,08	0,57	0,35	0,37	0,63	0,122
MST2244	CC ($n = 8$)	CG_2 ($n = 68$)	G_2G_2 ($n = 64$)	C	G_2	
	0,06	0,49	0,45	0,31	0,69	0,031

Таблица 2. Показатели продуктивности кур породы корниш кросса «Смена-8» разных генотипов по гену миостатина (замена *MST2109*)

Показатели		Генотип					
		AA		AG_1		G_1G_1	
		M ± m	n	M ± m	n	M ± m	n
Живая масса, г	в 7 дней	201,77 ± 2,99	30	196,54 ± 2,69	54	187,57 ± 9,85	7
	в 33 дня	2 083 ± 21	48	2 079 ± 16	79	2 046 ± 30	11
Половая зрелость, дней		199,67 ± 1,79	49	199,48 ± 1,41	79	181,46 ± 18,18	11
Масса яйца, г	в 210 дней	60,32 ± 0,41	49	66,96 ± 7,02	79	61,76 ± 1,21	11
	в 364 дня	70,41 ± 0,88	34	70,49 ± 0,57	48	72,92 ± 2,81	5
Яйценоскость, шт.	за 210 дней	11,67 ± 1,15	33	9,71 ± 0,83	62	7,55 ± 1,53	9
	за 364 дня	89,24 ± 3,04	49	83,38 ± 2,72	79	75,09 ± 6,70	11
Доля оплодотворенных яиц, %		85,94 ± 2,30	49	89,28 ± 1,73	77	84,20 ± 5,97	10
Выводимость, %		83,50 ± 2,22	49	79,11 ± 2,06	75	83,18 ± 5,33	10

Таблица 3. Показатели продуктивности кур породы корниш кросса «Смена-8» разных генотипов по гену миостатина (замена *MST2244*)

Показатели		Генотип					
		CC		CG_2		G_2G_2	
		M ± m	n	M ± m	n	M ± m	n
Живая масса, г	в 7 дней	179,5 ± 6,69[a]	6	193,95 ± 3,12[c]	42	203,52 ± 2,48[b]	44
	в 33 дня	2 018 ± 31[e]	8	2 073 ± 17	68	2 090 ± 18[f]	64
Половая зрелость, дней		174,13 ± 24,77	8	200,34 ± 1,48	68	199,03 ± 1,59	65
Масса яйца, г	в 210 дней	60,44 ± 1,17	8	69,06 ± 8,12	68	59,51 ± 0,69	65
	в 364 дня	69,43 ± 2,83	3	70,69 ± 0,68	39	70,53 ± 0,71	46
Яйценоскость, шт.	за 210 дней	6,57 ± 1,76	7	9,31 ± 0,80	52	11,50 ± 1,06	46
	за 364 дня	72,5 ± 9,01	8	82,54 ± 2,72	68	88,47 ± 2,86	65
Доля оплодотворенных яиц, %		84,31 ± 7,74	7	88,92 ± 1,95	66	86,29 ± 1,99	65
Выводимость, %		83,29 ± 6,02	7	79,49 ± 2,35	64	81,61 ± 2,01	65

Уровень достоверности различий между группами: [a, b] $p < 0,01$; [c, b] $p < 0,05$; [e, f] $p < 0,05$.

отбор на показатели мясной продуктивности, поэтому генотипы, имеющие низкие показатели живой массы, малочисленны.

Следует полагать, что отбор желаемых генотипов позволит повысить интенсивность размножения животных с лучшими качествами. Кроме того, молекулярная оценка генотипа дает возможность уверенно проводить селекционную работу для планирования структуры стада и повышения продуктивности кур. Исследование генотипа животных на определенном этапе значительно ускоряет генетический прогресс и увеличивает точность селекционной работы.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность члену-корреспонденту РАН Л.И. Тучемскому и кандидату сельскохозяйственных наук Ж.В. Емануйловой за предоставленную информацию о количественных признаках исследованного поголовья птиц.

Работа выполнена в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Яковлев А.Ф. Использование метода фингерпринтинга ДНК для изучения генетической дивергенции в популяциях сельскохозяйственных животных. Вестн. РАСХН. 2003;1:79-80.

Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М., 1991.

Тыщенко В.И., Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Яковлев А.Ф. Оценка генетического разнообразия в популяциях кур на основе геномной дактилоскопии. С.-х. биология. 2002;6:43-46.

Яковлев А.Ф., Терлецкий В.П., Сэксте Э.А., Тучемский Л.И., Емануйлова Ж.В. Влияние гена гормона роста на хозяйственные признаки птицы. Птицеводство. 2013;1:2-4.

Baron E.E., Wenceslau A.A., Alvares L.E., Nones K., Ruy D.C., Schmidt G.S., Zanella E.L., Coutinho L.L., Ledur M.C. High level of polymorphism in the myostatin chicken gene. Proc. 7th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. Montpellier. 19–23 August, 2002.

Grobet L., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C., Ménissier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double muscling in cattle. Mammal. Genome. 1998;9(3):210-213.

Hu W., Chen S., Zhang R., Liu Y. Single nucleotide polymorphisms in the upstream regulatory region alter the expression of myostatin. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 2013;49(6):417-423. DOI 10.1007/s11626-013-9621-5

Kambadur R., Sharma M., Smith T.P.L., Bass J.J. Mutations in myostatin (*GDF8*) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome Res. 1997;7(9):910-915.

McCroskery S., Thomas M., Maxwell L., Sharma M., Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. J. Cell. Biol. 2003;162(6):1135-1147.

McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature. 1997;387(6628):83-90.

McPherron A.C., Lee S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997;94(123):12457-12461.

Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J., Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. J. Biol. Chem. 2000;275(51):40235-40243.

Ye X., Brown S.R., Nones K., Coutinho L.L., Dekkers J.C., Lamont S.J. Associations of myostatin gene polymorphisms with performance and mortality traits in broiler chickens. Genet. Sel. Evol. 2007;39(1):73-89.

Zhang G.X., Zhao X.H., Wang J.Y., Ding F.X., Zhang L. Effect of exon 1 mutation in the myostatin gene on the growth traits of the Bian chicken. Anim. Genet. 2012;43(4):458-459. DOI 10.1111/j.1365-2052.2011.02274.x

Zhiliang G., Dahai Z., Ning L., Hui L., Xuemei D., Changxin W. The single nucleotide polymorphisms of the chicken myostatin gene are associated with skeletal muscle and adipose growth. Sci. China C. Life Sci. 2004;47(1):25-30.