

Н. В. Дементьева, О. В. Митрофанова

Связь однонуклеотидных полиморфизмов в гене рецептора грелина с продуктивными показателями кур

Аннотация. В последние годы в мире активно ведется поиск генов-кандидатов для признаков, связанных с показателями продуктивности у разных видов сельскохозяйственных животных и птиц, в том числе и у кур. К таким генам можно отнести ген грелина (*GHSR*) и ген грелин-рецептора (*GHSR*). Грелин — пептидный гормон, который воздействует на аппетит. Перед приемом пищи его концентрация наиболее высокая, а после приема она наиболее низкая. С повышением массы тела уровень грелина в организме снижается, что влечет за собой снижение аппетита и обуславливает регуляцию массы тела. Для исследования были взяты представители двух пород — мясо-яичной пушкинской из биоресурсной коллекции ВНИИРГЖ «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (Пушкин, Санкт-Петербург) и мясной породы корниш (ППЗ «Смена»). Были определены генотипы методом ПЦР-ПДФ (*PCR-RFLP*) по однонуклеотидному полиморфизму *rs14678932*. С помощью однофакторного дисперсионного анализа была проведена оценка влияния SNP в гене грелин-рецептора (*GHSR*) на продуктивные показатели кур. Изучалось влияние генотипа по этой замене на живую массу в 7, 33 и 90 дней, половую зрелость птицы, массу яйца в 210 и 365 дней жизни, яйценоскость в разные периоды жизни, процент оплодотворяемости, процент вывода. Выявлено возможное влияние генотипа кур-несушек по SNP *rs14678932* гена *GHSR* на яйценоскость ($P < 0,05$) и массу яйца в 240 дней ($P < 0,05$). Не выявлено достоверного влияния SNP *rs14678932* гена *GHSR* на живую массу в 7 дней, 33 дня и другие основные показатели продуктивности у кур породы корниш. Не было обнаружено ассоциативной связи SNP *rs14678932* гена *GHSR* с живой массой у кур и петухов пушкинской породы в 7 дней, 49 дней и 90 дней, но отмечена более низкая живая масса у петушков, гетерозиготных по изученному SNP в гене *GHSR*.

Ключевые слова: полиморфизм, SNP, рецептор грелина, *GHSR*, *PCR-PDRF*, куры, живая масса, продуктивность.

Авторы:

Дементьева Наталия Викторовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики; Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, 196601, Московское шоссе, 55 а; e-mail: dementevan@mail.ru;

Митрофанова Ольга Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики; Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, 196601, Московское шоссе, 55 а; e-mail: mo1969@mail.ru.

Введение.

Использование полиморфизма ДНК и генов привлекает внимание селекционеров, занимающихся разведением различных видов сельскохозяйственных животных [1]. Наиболее активно в последние годы ведется поиск генов-кандидатов для признаков, связанных с показателями продуктивности, в том числе и с ростом молодняка в птицеводстве.

В предыдущих исследованиях нами была обнаружена достоверная взаимосвязь однонуклеотидных замен (SNP) в гене миостатина с показателями живой массы у кур различных пород [2].

В организме существует множество генов, которые могут влиять на этот показатель.

К таким генам можно отнести ген грелина (*GHSR*) и ген грелин-рецептора (*GHSR*). Грелин — пептидный гормон, который воздействует на аппетит. Отмечено повышение его уровня перед приемом пищи. С повышением массы тела уровень грелина снижается, что влечет за собой снижение аппетита и обуславливает регуляцию массы тела.

В некоторых работах обнаружена взаимосвязь отдельных SNP в гене грелин-рецептора с продуктивными показателями кур. В частности, од-

нонуклеотидная замена в положении rs 14678932 гена *GHSR* влияет на скорость роста [3]. Исследование, направленное на выявление связи целого ряда SNP в генах грелина и грелин-рецептора, показало зависимость некоторых замен с отложением жира как у курицы, так и утки [4].

Целью нашей работы было проанализировать ассоциацию SNP в положении rs 14678932 гена *GHSR* с некоторыми продуктивными показателями у кур.

Условия, материалы и методы исследования.

Материалом для наших исследований послужила ДНК, выделенная из крови мясо-яичных кур пушкинской породы биоресурсной коллекции ВНИИРГЖ «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (Пушкин, Санкт-Петербург) и мясных кур породы корниш (ППЗ «Смена»).

ДНК выделяли по стандартной методике с использованием протеиназы К (Сибэнзим, Новосибирск) и фенола.

В таблице 1 представлены инструменты для проведения ПЦР-ПДФР для выявления изучаемого SNP в гене грелин-рецептора.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 67 mM трис-HCl pH 8,6, 2,5 mM MgCl₂, 16,6 mM NH₄OH, 0,125 mM каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 мкМ праймера, 50-100 нг геномной ДНК и 2,5 ед Taq-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск).

Реакцию проводили на амплификаторе «Bio-rad» (США) с использованием режима, состоящего из 35 циклов: 30 сек — 94°C, 30 сек — 62°C, 30 сек — 72°C. Для рестрикции в пробирку добавляли необходимое количество эндонуклеазы *Bst*HHI (Сибэнзим, Новосибирск), перемешивали и ставили на инкубацию на 3 часа (в соответствии с инструкцией на упаковке).

Для электрофореза использовали 1,5% агарозные гели, содержащие флуоресцентный краситель бромистый этидий. Процесс проходил в TBE-буфере (45 mM трис-борат, 1 mM ЭДТА) в течение 1 часа при рабочем напряжении 150 В.

В качестве маркера, позволяющего оценить длину фрагментов ДНК

на геле, был взят pUC/MspI (Fermentas). Сигнал флуоресценции фотографировали в системе гель-документации фирмы Кодак.

На основании генотипирования проводили однофакторный дисперсионный анализ для выявления различий между генотипами по продуктивным признакам в пакете программ SigmaPlot (версия 12.0.5) на основании критериев Шапиро-Уилкат и t-критерия Стьюдента.

Анализ и обсуждение результатов.

На рисунке 1 представлены картины распределения фрагментов ДНК после электрофореза в агарозном геле. Видно, что особи с различными генотипами могут быть четко идентифицированы.

В таблице 2 представлены результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния генотипа по SNP rs14678932 гена *GHSR* у кур породы корниш на основные показатели продуктивности птицы. Достоверного влияния обнаружено не было, но стоит отметить менее интенсивный рост и низкую яйценоскость у птицы с гетерозиготным по данному SNP генотипом СТ.

Так, особи породы корниш с генотипом СТ в 33 дня весили в среднем 2033 ± 24 г, в то время как наибольшей живой массой в этом возрасте обладали цыплята с генотипом ТТ (в среднем 2087 ± 14 г).

Яйценоскость корнишей с генотипом СТ за 365 дней составила в среднем $79,6 \pm 4,5$ шт. При тех же условиях содержания особи с генотипом ТТ показали яйценоскость за этот же период в среднем $86,3 \pm 2,3$ шт.

Затем была проведена работа по изучению влияния гена *GHSR* на живую массу кур и петухов пушкинской породы. В таблице 3 представлены результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния генотипа по SNP rs14678932 гена *GHSR* на живую массу в 7 дней, 49 дней и 90 дней.

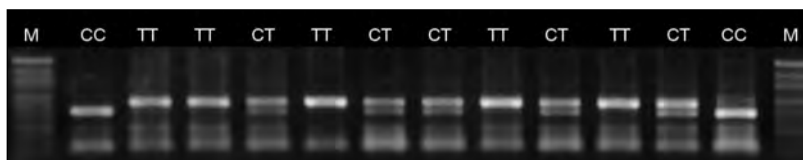


Рис. 1. ПЦР-ПДФР анализ SNP rs14678932 гена *GHSR*. Маркер pUC19/MspI

Таблица 1. Инструменты для выявления одиночного нуклеотидного полиморфизма (SNP) в гене рецептора грелина *GHSR*

Ген, номер замены	Замена	Т°C отжига	Праймеры	Эндонуклеаза	Размер фрагментов, п.н.
<i>GHSR</i> rs 14678932	C/T	62	aagagcacgttcag- cacagg cac- ctctccatctggetcat	<i>Bst</i> HHI	224, 180, 44

**Таблица 2. Показатели продуктивности кур породы корниш (♀)
по генотипам rs14678932 гена GHSR**

Признак	Генотип			Р
	СС n = 5	СТ n = 27	ТТ n = 101	
Живая масса в 7 дней, г	212,0 ± 14,4	192,8 ± 4,5	198,5 ± 2,3	0,208
Живая масса в 33 дня, г	2108,0 ± 65,0	2033,0 ± 24,0	2087,0 ± 14,0	0,176
Половая зрелость, дней	200,8 ± 3,3	194,3 ± 7,7	198,8 ± 1,2	0,599
Масса яйца в возрасте 210 дней, г	60,8 ± 1,9	60,5 ± 0,62	60,1 ± 0,5	0,893
Масса яйца в возрасте 364 дня, г	72,5 ± 3,0	70,4 ± 1,0	70,7 ± 0,6	0,775
Яйценоскость за 210 дней жизни, шт.	7,0 ± 2,0	8,1 ± 1,2	10,8 ± 0,8	0,165
Яйценоскость за 364 дней жизни, шт.	85,0 ± 7,8	79,6 ± 4,5	86,3 ± 2,3	0,412
% оплодотворения	78,1 ± 12,0	87,2 ± 4,0	88,1 ± 1,4	0,401
% вывода	68,6 ± 6,0	68,8 ± 5,0	71,6 ± 1,9	0,796

Р — достоверность различий между генотипами и продуктивными признаками с использованием коррекции дисперсионного анализа на множественное сравнение (All Pairwise Multiple Comparison Procedures).

Таблица 3. Показатели живой массы у кур и петушков пушкинской породы в зависимости от генотипов по rs14678932 в гене грелин-рецептора GHSR

Признак	Генотип			Р
	СС	СТ	ТТ	
Петухи				
N	46	72	76	
Живая масса в 7 дней, г	74,69 ± 1,27	77,12 ± 1,15	74,66 ± 1,19	0,247
Живая масса в 49 дней, г	869,07 ± 15,03	852,53 ± 10,33	870,35 ± 9,05	0,416
Живая масса в 90 дней, г	1595,55 ± 4,89	1520,00 ± 24,99	1569,94 ± 7,28	0,168
Куры				
N	42	87	62	
Живая масса в 7 дней, г	72,04 ± 1,37	72,66 ± 1,06	70,35 ± 1,31	0,375
Живая масса в 49 дней, г	748,50 ± 11,78	733,76 ± 7,81	735,72 ± 11,95	0,616
Живая масса в 90 дней, г	1399,18 ± 6,46	1410,40 ± 5,60	1388,26 ± 11,29	0,385

Р — достоверность различий между генотипами и продуктивными признаками с использованием коррекции дисперсионного анализа на множественное сравнение (All Pairwise Multiple Comparison Procedures).

Как видно из таблицы, достоверного влияния генотипа обнаружено не было, но стоит отметить более низкую живую массу у петухов-гетерозигот СТ в 49 и 90 дней. Курочки с гетерозиготным генотипом в 90 дней оказались несколько крупнее своих сверстниц и весили в среднем $1410,40 \pm 15,60$ г.

В таблице 4 представлены результаты оценки влияния генотипа кур-несушек по SNP rs14678932 гена *GHSR* на яйценоскость и массу яйца. С помощью однофакторного дисперсионного анализа обнаружены достоверные ($P < 0,05$) различия между генотипами по яйценоскости за 360 дней жизни и массе яйца в 240 дней.

Гены грелина и грелин-рецептора оказывают существенное влияние на обмен веществ у птицы. Отсутствие достоверного влияния изученной замены rs14678932 гена *GHSR* на показатели живой массы у представителей породы корниш вероятнее всего обусловлено недостаточным для анализа числом особей с генотипом СС. У пушкинской породы, которая характеризуется комбинированным направлением продуктивности, так же не было выявлено различий между группами птицы. Возможно, отсутствие влияния изучаемых однонуклеотидных замен связано с ограниченным поголовьем, включенным в анализ.

Таблица 4. Яйценоскость за 360 дней жизни и масса яйца у кур-несушек пушкинской породы по генотипам rs14678932 гена GHSL

Признак	Генотип			P
	CC N = 16	CT n = 41	TT n = 15	
Яйценоскость за 360 дней жизни, шт.	70,13 ± 9,00*	86,40 ± 3,80	95,40 ± 6,71*	0,038
Масса яйца в возрасте 240 дней, г	59,41 ± 0,91	59,69 ± 0,63*	56,06 ± 1,36*	0,020
Масса яйца в возрасте 360 дней, г	64,34 ± 1,44	66,17 ± 0,99	63,41 ± 1,35	0,266

Примечания: * — уровень достоверности $P < 0,05$; P — достоверность различий между генотипами и продуктивными признаками с использованием коррекции дисперсионного анализа на множественное сравнение (All Pairwise Multiple Comparison Procedures).

Таким образом, однофакторный дисперсионный анализ выявил возможное влияние генотипа кур-несушек пушкинской породы по SNP rs14678932 гена GHSL на яйценоскость ($P < 0,05$) и массу яйца в 240 дней ($P < 0,05$). Не было обнаружено ассоциативной связи SNP rs14678932 гена GHSL с ростом

и развитием молодняка пушкинской породы и кур породы корниш. Возможно, ген рецептора грелина в большей степени оказывает влияние на яйцекладку кур мясояичного направления продуктивности, чем мясного.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО

Литература

1. Яковлев А.Ф. Использование полиморфизма ДНК и генов в селекции сельскохозяйственных животных. Современные методы генетики и селекции в животноводстве / А.Ф. Яковлев, В.П. Терлецкий, В.И. Тыщенко, Н.В. Дементьева, О.В. Митрофанова, Э.А. Сэксте // Материалы международной научной конференции ВНИИГРЖ, — 2007, С. 18–23.
2. Митрофанова О. В., Связь генотипов по однонуклеотидным заменам в гене миостатина с показателями живой массы у кур Пушкинской породы / О. В. Митрофанова, Н. В. Дементьева, В. И. Тыщенко, О. П. Юрченко, А. Б. Вахрамеев // Генетика и разведение животных. — 2014. — № 4. — С. 25–28.
3. Jin S., Chen S., Li H., Lu Y., Xu G., Yang N. Associations of polymorphisms in GHRL, GHSL, and IGF1R genes with feed efficiency in chickens // Mol Biol Rep. — 2014. — Vol. 41(6). — P. 3973–3979.
4. Nie Q., Fang M., Xie L., Peng X., Xu H., Luo C., Zhang D. and Zhang X., Molecular Characterization of the Ghrelin and Ghrelin Receptor Genes and Effects on Fat Deposition in Chicken and Duck // J Biomed Biotechnol. — 2009. — Vol. 2009. — Article ID 567120. — 12 p. (doi:10.1155/2009/567120).

Dementyeva N. V., Mitrofanova O. V.

Association of single nucleotide polymorphisms in ghrelin receptor gene with performance traits parameters in chicken

Abstract. During the recent years there is under way an intensive search for candidate genes, correlated with performance traits in many farm animals, including chicken. To such type of genes belong ghrelin gene (GHSL) and ghrelin receptor gene (GHSLR). Ghrelin is a peptide, which influences on appetite. Immediately before feed intake, its concentration is on the highest level, and after feeding it drops down. With the increasing of body weight the levels of ghrelin decrease and this results in lowering of appetite and body weight regulation.

For the investigations there were used chicken of two breeds — meat-egg type breed Pushkinskaya from the bioresource farm of VNIIGRZh «Genetic collection of rare and disappearing chicken breeds» (Pushkin, St. Petersburg) and meat breed Cornish (Breeding Company «Smena», Moscow Region). There were defined genotypes by single nucleotide polymorphism (SNP) rs14678932 with use of PCR-RFLP method. On the base of single factor dispersion analysis there was evaluated impact of the ghrelin receptor gene (GHSR) on the productive traits of hens. There was investigated influence of the genotype with this replacement on body weight in 7, 33 and 90 days, egg mass in 210 and 365 days, egg laying productivity, egg fertility and hatchability. There was found a possible influence of the genotype of hens-layers with SNP rs14678932 gene GHSR on egg performance ($P<0,05$) and egg mass in 240 days ($P<0,05$), but not found a significant influence SNP rs14678932 gene GHSR on body weight in 7, 33 days and other main productive parameters in Cornish hens. There was not found any associative correlation of SNP rs14678932 gene GHSR with body weight in hens and cockerels of Pushkinskaya breed in 7, 49 and 90 days, but remarked lower body weight in cockerels, homozygous by investigated SNP in GHSR gene.

Keywords: polymorphism, SNP, ghrelin receptor, GHSR, PCR-RFLP, chickens, body weight, productivity.

Authors:

Dementeva Natalia Victorovna — PhD (Biol.), Leading Research Scientist, Laboratory of Molecular Genetics; Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry; Russia, St. Petersburg, Tyarlevo, Moscovskoe sh., 55 a; e-mail: dementeva@mail.ru;

Mitrofanova Olga Victorovna — PhD (Biol.), Senior Research Scientist, Laboratory of Molecular Genetics; Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry; Russia, St. Petersburg, Tyarlevo, Moscovskoe sh., 55 a; e-mail: mo1969@mail.ru.

*The study was supported by Federal Agency for Scientific Organizations program
for support the bioresource collections*

References

1. Jakovlev A.F. Ispol'zovanie polimorfizma DNK i genov v selekcii sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh. Sovremennye metody genetiki i selekcii v zhivotnovodstve (Use of polymorphism of DNA and genes in the selection of farm animals. Modern methods of genetics and breeding in livestock breeding) / A.F. Jakovlev, V.P. Terleckij, V.I. Tyshhenko, N.V. Dement'eva, O.V. Mitrofanova, Je.A. Sjekste // Materialy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii VNIIGRZh. — 2007. — S.18–23.
2. Mitrofanova O. V., Svjaz' genotipov po odnonukleotidnym zamenam v gene miostatina s pokazateljami zhivoj massy u kur Pushkinskoj porody (Link between genotypes by single-nucleotide substitution in the myostatin gene with live-weight indices at the hens of the Pushkin breed) / O. V. Mitrofanova, N. V. Dement'eva, V. I. Tyshhenko, O. P. Jurchenko, A. B. Vahrameev // Genetika i razvedenie zhivotnyh. — 2014. — №4. — S. 25–28.
3. Jin S., Chen S, Li H, Lu Y, Xu G, Yang N. Associations of polymorphisms in GHRL, GHSR, and IGF1R genes with feed efficiency in chickens // Mol Biol Rep. — 2014. — Vol. 41(6) — P. 3973–3979.
4. Nie Q., Fang M., Xie L., Peng X., Xu H., Luo C., Zhang D. and Zhang X., Molecular Characterization of the Ghrelin and Ghrelin Receptor Genes and Effects on Fat Deposition in Chicken and Duck // J Biomed Biotechnol. — 2009. — Vol. 2009. — Article ID 567120. — 12 p. (doi:10.1155/2009/567120).