

ЛИТЕРАТУРА

1. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред / И.В. Грачева, А.В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 3. С. 5-12
2. Явников Н.В. Изучение антагонистической активности штаммов лактобактерий и бифидобактерий против возбудителей маститов у коров / Н.В. Явников, А.В. Ткачев // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. – 2021. – № 1 (62). – С. 76-82.
3. Коваленко А.М. Антимикробная и обезболивающая активность нового экспериментального препарата на основе наносеребра для лечения маститов крупного рогатого скота / А.М. Коваленко, А.В. Ткачев, О.Л. Ткачёва, Т.В. Зубова, В.А. Плешков, О.В. Смоловская // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2019. – № 11 (181). – С. 84-98.
4. Костюк А.Д. Молекулярно-генетическая оценка устойчивости коров к маститам / А.Д. Костюк, А.В. Ткачев // В книге: Горинские чтения. Инновационные решения для АПК. Материалы Международной студенческой научной конференции. В 4-х томах. – 2020. – С. 32.
5. Yong HL, Marc BB, Tahir N, Quader A, Gary PM. Effects of Sucrose and Trehalose on the Preservation of the Native Structure of Spray-Dried Lysozyme. *Pharmaceutical Research*. 2004; 9(12):1847–53.
6. Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61:3592–7.
7. Champagne CF, Gardner N, Brochu E, Beaulieu Y. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 1991; 24:118–28.
8. Thammavongs B, Corrolier D, Panoff JM, Auffray Y, Boutibonnes P. Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing/ thawing challenge. *Letters in Applied Microbiology*. 1996; 23:398–402.

УДК 636.52:575.174.015.3

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2021.4.97

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОФОНДНЫХ ПОРОД КУР, ОЦЕНЕННАЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА SNPS В ГЕНЕ PPARG

Ларкина Т.А.- к.б.н., м.н.с., Крутикова А.А.-к.б.н., с.н.с., Дементьева Н.В.-к.б.н., в.н.с., Пегливанян Г.К.-асп., м.н.с.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста (ВНИИГРЖ)

Ключевые слова: курица, ген, порода, липидный обмен, гамма-рецептор, активированный пролифератором пероксисом (PPARG).

Key words: chicken, gene, breed, lipid metabolism, peroxisome proliferator activated gamma receptor (PPARG).

РЕФЕРАТ

Ожирение кур значительно снижает эффективность кормления, яйценоскость, вкусовые качества мясной тушки, убойный выход, потребительскую ценность, а также присутствует такой

экологический аспект, как проблема утилизации жира. Поиск SNPs в генах, участвующих в липидном обмене, важная задача на сегодняшний день для современных исследований в области птицеводства. Различия по жирности тушки между породами и линиями внутри породы иллюстрируют важность генетических факторов в липидном обмене у кур. Целью исследования являлся поиск и анализ SNPs в гене PPAR γ методом секвенирования у различных пород кур (n=83). Исследования проводили на базе лаборатории молекулярной генетики ВНИИГРЖ. Объектом исследования были куры биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (г. Пушкин, Санкт-Петербург) различного направления продуктивности (n=83). Кровь для выделения ДНК отбирали у кур в возрасте 330 дней из вены крыла в микропробирку, содержащую в качестве антикоагулянта 50 мкл 0,5 мМ ЭДТА. До использования образцы крови хранили при температуре -200С. Геномную ДНК выделяли стандартным фенольно-детергентным способом. Концентрацию и степень чистоты образцов определяли с помощью прибора NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, США).

Анализ полиморфизма регуляторной области гена PPAR γ проводился методом секвенирования. Дизайн праймеров проводили на основании информации базы данных сети интернет. Способ содержания птицы – индивидуальный клеточный. Определена генетическая изменчивость по rs314476701 гена PPAR γ у анализируемых пород. По SNP rs316237745 для всех особей изучаемых групп кур было выявлено сильное смещение аллеля А.

ВВЕДЕНИЕ

Ожирение кур значительно снижает эффективность кормления, яйценоскость, вкусовые качества мясной тушки, убойный выход, потребительскую ценность, а также присутствует такой экологический аспект, как проблема утилизации жира. Некоторые генофондные породы склонны к раннему ожирению, что значительно снижает репродуктивную функцию кур, даже после непродолжительной яйцекладки. В качестве генов-кандидатов липидного обмена, контролирующих отложения жира в тушке рассматривают семейство ядерных рецепторов PPAR, которые играют важную роль в дифференцировке клеток в адипоциты, а также во внутренней и внеклеточной транспортировке жирных кислот [1,2]. PPAR γ - один из наиболее значимых подтипов рецепторов, который обладает активностью в накоплении жиров за счет регулируемого поглощения глюкозы и жирных кислот [3]. Ген PPAR γ находится на 12 хромосоме Gallus gallus (домашняя курица), экспрессируется в клетках печени и кодирует гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом. Ванг и соавторы (2008) показали, что трансфекция синтезированной in vitro мРНК PPAR γ в культивируемые преадипоциты 12-дневных цыплят достоверно усиливает пролифера-

цию преадипоцитов у кур [4]. Рядом исследования подтверждается [5-7] ген PPAR γ является одним из ключевых генов, определяющих особенности депонирования абдоминального жира у кур. SNPs, которые находятся в регуляторной области, а именно в операторе гена PPAR γ является интересными с точки зрения, связи оператора со специальными белками – репрессорами, которые могут уменьшать экспрессию гена.

В биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ содержатся куры различного направления продуктивности, такие как яичные, декоративные и комбинированного типа. Выявление и изучение эффективных SNP-маркеров липидного обмена является актуальной задачей для селекции в птицеводстве, с целью увеличения репродуктивного потенциала, повышения мясных качеств и экстерьерного профиля птицы. Целью данной работы был поиск и анализ SNPs регуляторной области гена PPAR γ у кур различного направления продуктивности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были куры биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (г. Пушкин, Санкт-Петербург) различного направления продуктивности (n=83) (табл. 1). Способ со-

Таблица 1

Основные характеристика анализируемых пород кур

Направление продуктивности	№ популяции	n	Порода	Фенотипические особенности кур
Яично-мясное	1	9	пушкинская	породы занимают промежуточное положение между яичными и мясными. В зависимости от преимущественного направления селекции они относятся к мясо-яичным (если сильнее выражены элементы мясной продуктивности) или яично-мясными (если преимущественно выражено яичное направление селекции)
	2	16	род-айланд	
Мясо-яичное	3	16	курловская	
Яичное	4	15	итальянская	невысокая живая масса, легкий костяк, хорошее развитие органов репродуктивной, пищеварительной и дыхательной систем. Высокая интенсивность обмена веществ, и низкая способность к отложению подкожного жира.
	5	11	куропатчатая русская белая	
Декоративное	6	16	китайская шелковая	декоративные породы отличаются наличием и сильным развитием одного или нескольких декоративных признаков, которые становятся основным фактором селекции в этих породах. Поэтому факторы мясной и яичной продуктивности уходят на второй план.

Таблица 2

Условия проведения ПЦР

Праймеры	Хромосома Gallus gallus	Локализация изучаемого района гена (https:// www.ensembl.org)	Режим ампли- фикации	Ампликон
F: CGGGGAG- TTTATCCCA CCAG RV: CCTTCAC- GCGCCCTCC	12	5238265- 5238883	95° - 5 мин. 35 циклов: 95° - 30 сек, 60°C - 30 сек, 72°C – 30 сек 72° - 10 мин	618 п.о.

держания птицы – индивидуальный клеточный. Кровь для выделения ДНК отбирали у кур в возрасте 330 дней из вены крыла в микропробирку, содержащую в качестве антикоагулянта 50 мкл 0,5 мМ ЭДТА. До использования образцы крови хранили при температуре -200С. Геномную ДНК выделяли стандартным фенольно-детергентным способом. Концентрацию и степень чистоты образцов определяли с помощью прибора NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, США).

Анализ полиморфизма регуляторной области гена PPARG проводился методом секвенирования. Дизайн праймеров проводили на основании информации базы данных сети интернет (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (табл. 2).

Очистку ПЦР-продукта для дальнейшего анализа осуществляли с использованием коммерческого набора ExoSAP-IT Express (Affimetrix) согласно протоколу производителя. Секвенирование по Сенгеру проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher, США) с применением коммерческого набора «BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» согласно протоколу изготовителя. Выравнивание и обработку сиквенсов осуществляли с помощью про-

граммного обеспечения Mega-6 (https://www.megasoftware.net/web_help_10/itdex.htm#t=Citing_MEGA_In_Publications.htm). Для идентификации выявленных SNPs проводили анализ международных баз генетических данных NCBI и EMBL. Статистическую обработку данных выполняли с использованием компьютерных программ Microsoft Excel и AtteStat.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате секвенирования регуляторной области гена PPARG в исследуемых популяциях кур биоресурсной коллекции, определено два SNPs rs314476701 (A/G) и rs316237745 (A/T) (см. табл. 3).

Анализ распределений частот генотипов и аллелей по rs314476701 показал, что куры пушкинской породы отличались высокой частотой генотипа GG и аллеля G в сравнении с другими группами кур ($p \leq 0,05$). Для кур породы род-айланд наблюдалось равномерное распределение аллеля A и G, при этом частота генотипов AA и GG была равнозначной. Для кур яичного направления продуктивности наблюдали высокую частоту аллеля A. В группе кур китайских шелковых все особи являлись носителями генотипа AA.

По rs316237745 для всех изучаемых пород кур выявлено сильное смещение

Таблица 3

Генетическая гетерогенность популяций кур биоресурсной коллекции ВНИИ-ГРЖ по rs314476701 и rs316237745 гена PPARG

№	n	Порода	SNPs <i>PPARG</i>											
			rs314476701			χ^2	Частота аллелей		rs316237745			χ^2	Частота аллелей	
Частота генотипов			A A	A G	G G		*A	*G	A A	AT	TT		*A	*T
1	9	пушкинская	0	0,4 4	0,5 6	0,7 8	0,2 2	0,7 8	0,7 8	0,1 1	0,1 1	0,1 7	0,7	0,3
2	1 6	род-айланд	0,3 8	0,2 4	0,3 8	4,0 0	0,5	0,5	1	0	0	0	1	0
3	1 6	юрловская	0,4 4	0,5	0,0 6	0,3 6	0,6 9	0,3 1	1	0	0	0	1	0
4	1 5	итальянская куропатчатая	0,4 7	0,4 7	0,0 6	0,1 7	0,7	0,3	1	0	0	0	1	0
5	1 1	русская белая	0,5 5	0,4 5	0	1,0 4	0,7 7	0,2 3	0,9 1	0,0 9	0	0,1 8	0,9 6	0,0 4
6	1 6	китайская шелковая	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0

Примечание: при $*p \leq 0,05$.

частоты в сторону аллеля А. Куры, имеющих в своем генотипе аллель Т определены только в пушкинской породе и русской белой (табл. 3).

Анализ фактического и теоретического распределения генотипов выявил смещение генетического равновесия по замене rs314476701 ($\chi^2=4,00$), в популяции кур породы род-айланд. По замене rs314476701 и rs316237745 во всех других анализируемых популяциях биоресурсной коллекции независимо от породной принадлежности значения χ^2 не превышали критического значения. Генетическая изменчивость по rs314476701 гена PPARG у анализируемых пород кур может свидетельствовать о значении данного SNP для понимания генетических основ формирования механизмов депонирования абдоминального жира у кур. Поэтому исследования генетической детерминации липидного обмена у кур генофондных пород с помощью ДНК-маркеров необходимы, прежде всего, для создания программ по выявлению генетической изменчивости, ее анализу, в целях даль-

нейшего сохранения и использования, в том числе для нужд современного птицеводства.

ВЫВОДЫ

1. Проведено секвенирование регуляторной области гена PPARG в 6 опытных популяциях кур разного экстерьерного профиля.
2. Впервые выявлена генетическая гетерогенность популяций кур биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ по SNPs гена PPARG (rs314476701/rs316237745)
3. По rs314476701 установлено сильное смещение аллеля G в группе кур пушкинской породы при $p \leq 0,05$. В группе кур китайской шелковой породы все особи были носителями генотипа AA.
4. Анализ распределения частот аллелей по rs316237745 показал сильное смещение аллеля А в анализируемых популяциях кур.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-016-00127.

GENETIC VARIABILITY OF GENETIC CHICKEN BREEDS ESTIMATED

BASED ON SNPS ANALYSIS IN THE PPARG GENE. Larkina T.A.- PhD, Junior researcher, Krutikova A.A.- PhD, Senior Researcher, Peglivanyan G.K.- graduate student, Junior researcher, Dementieva N.V.- PhD, Leading Researcher. Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry (RRIFAGB)

ABSTRACT

Obesity of chickens significantly reduces the efficiency of feeding, egg production, palatability of meat carcasses, slaughter yield, consumer value, and there is also such an ecological aspect as the problem of fat utilization. The search for SNPs in genes involved in lipid metabolism is an important task today for modern research in the field of poultry farming. Differences in carcass fat between breeds and lines within a breed illustrate the importance of genetic factors in lipid metabolism in chickens. The aim of the study was to find and analyze SNPs in the PPARG gene by sequencing in various chicken breeds (n = 83). The objects of the study were chickens from the VNIIGZh bio-resource collection "Genetic collection of rare and endangered chicken breeds" (Pushkin, St. Petersburg) of various productivity trends (n = 83). Blood for DNA isolation was taken from hens at the age of 330 days from a wing vein into a microtube containing 50 µl of 0.5 mM EDTA as an anticoagulant. Prior to use, blood samples were stored at -200C. Genomic DNA was isolated using a standard phenolic-detergent method. The concentration and purity of the samples were determined using a NanoDrop 2000 instrument (Thermo Fisher, USA).

Analysis of the polymorphism of the regulatory region of the PPARG gene was carried out by sequencing. The primer design was carried out on the basis of information from the Internet database. The studies were carried out on the basis of the laboratory of molecular genetics of the RRIFAGB. Genetic variability for rs314476701 of the PPARG gene was determined in the analyzed breeds. SNP rs316237745 revealed a strong shift of the A.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang, H.B. Profiling of chicken adipose tissue gene expression by genome array / H.B. Wang, H. Li, Q.G. Wang, X.Y. Zhang, S.Z. Wang, Y.X. Wang, X.P. Wang // BMC Genom. – 2007. – N 8. – P. 193. doi: 10.1016/j.domaniend.2004.05.003.
2. Navidshad, B. Ligands and Regulatory Modes of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) in Avians / B. Navidshad and Royan M. // Crit Rev Eukaryot Gene Expr. – 2015. – N. 25(4). – P. 287-292. doi: 10.1615/critreveukaryotgeneexpr.
3. Sato, K. Changes in peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression of chicken abdominal adipose tissue with different age, sex and genotype / K. Sato, H. Abe, T. Kono, M. Yamazaki, K. Nakashima, T. Kamada, Y. Akiba // Anim. Sci. J. – 2009. – N. 80. – P. 322–327.
4. Wang, Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene: a key regulator of adipocyte differentiation in chickens / Y. Wang, Y. Mu, N. Ding, Q. Wang, S. Wang, N. Wang // Poultry Science. – 2008. – N. 87. – P. 226-232. doi: 10.3382/ps.2007-00329.
5. Mihelic, R. Genes controlling polyunsaturated fatty acid synthesis are developmentally regulated in broiler chicks / R. Mihelic, H. Winter, J.B. Powers, S. Das, K. Lamour, S.R. Campagna, B.H. Voy // Br Poult Sci. – 2020. – N 61(5). – P. 508-517. doi: 10.1080/00071668.2020.1759788.
6. Tunim, S. Increasing Fat Deposition Via Upregulates the Transcription of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Native Crossbred Chickens / S. Tunim, Y. Phasuk, S.E. Aggrey, M. Duangjinda // Animals (Basel). – 2021. – N 11(1). doi: 10.3390/ani11010090.
7. Sun, G. Krüppel-like factor KLF9 inhibits chicken intramuscular preadipocyte differentiation / G. Sun, M. Zhang, J. Sun, F. Li, X. Ma, W. Li, R. Han, Z. Li, R. Jiang, G. Li, F. Yan, X. Kang // Br Poult Sci. – 2019. – N 60(6). – P. 790-797. doi: 10.1080/00071668.2019.1657229.