

УДК 636.52/58:575.174.015.3

ЭФФЕКТ РАЗЛИЧНЫХ РАЦИОНОВ КОРМЛЕНИЯ НА РЕЗУЛЬТАТ АССОЦИАТИВНОГО АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА В ГЕНЕ *MSTN* И РОСТА ЖИВОЙ МАССЫ У МОЛОДНЯКА КУР

Дементьева Н.В., Митрофанова О.В., Кудинов А.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Санкт-Петербург, e-mail: mo1969@mail.ru

Современная генетика кур тесно связана с изучением полиморфизма генов, влияющих на рост и развитие птицы. Ген миостатина является одним из генов, ответственных за формирование мышечной массы у высших позвоночных. Целью нашей работы было определить влияние типа кормления на скорость роста курочек пушкинской породы в зависимости от генотипа по замене rs313744840 в гене миостатина. Одна группа кур ($n = 40$) выращивалась на кормах с повышенным содержанием протеина и обменной энергии, другая ($n = 64$) на корме для молодняка несушек. Курочки с генотипом AA, выращиваемые на бройлерных кормах, начали достоверно ($p < 0,05$) отличаться от своих сверстниц с генотипом AG с возраста 28 дней. Это преимущество в росте сохранялось до конца периода кормления кормом с повышенным содержанием протеина и обменной энергии. Для курочек, выращенных на кормах для молодняка кур-несушек, тенденция к преимуществу по живой массе у гомозигот AA наблюдалась до 40-дневного возраста, но отмеченные различия не были достоверными. К возрасту 90 дней эта группа незначительно обогнала гетерозигот AG по живой массе, а от гомозигот GG практически не отличалась. Курочки с генотипом AA, выращенные на корме с повышенным содержанием протеина и обменной энергии, имели достоверно большую живую массу лишь в возрасте 34 дня и 40 дней. Использование корма с повышенным содержанием протеина и обменной энергии позволяет реализовать генетический потенциал птицы.

Ключевые слова: куры, пушкинская порода, живая масса, миостатин, ПЦР-ПДФ

THE EFFECT OF DIFFERENT DIETS OF FEEDING ON THE RESULT OF ASSOCIATIVE ANALYSIS OF POLYMORPHISM IN THE *MSTN* GENE AND GROWTH OF LIVE WEIGHT IN CHICKENS

Dementeva N.V., Mitrofanova O.V., Kudinov A.A.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Sankt-Petersburg, e-mail: mo1969@mail.ru

Modern genetics of chickens is closely related to the study of polymorphism of genes affecting the growth and development of birds. The *MSTN* gene is coding myostatin protein responsible for the formation of muscle mass in higher vertebrates. The purpose of our studies was to determine the influence of the type of feeding on the growth rate of the Pushkin breed chickens, depending on the genotype of SNP rs313744840 in the myostatin gene. One group of chickens ($n = 40$) was grown on broiler feed fodder the other ($n = 64$) at the stern for laying hens. Chickens with the genotype AA, grown on broiler feed, began to significantly ($p < 0.05$) differ from their peers with the AG genotype from the age of 28 days. This advantage in growth persisted until the end of the feeding period with food with an increased protein content and exchange energy. For chickens grown on feed for young laying hens, a tendency to predominate over live weight in AA homozygotes was observed up to 40 days of age, but the differences noted were not reliable. By the age of 90 days, this group slightly outperformed the heterozygote AG by the live weight, and from the homozygotes of GG was practically the same. Chickens with the AA genotype, grown on the stern with increased protein and metabolic energy, had a significantly large live weight only at the age of 34 days and 40 days. The use of feed with increased protein content and exchange energy makes it possible to realize the genetic potential of the bird.

Keywords: chickens, Pushkin breed, live weight, myostatin, PCR-RFLP

Современная генетика кур тесно связана с изучением полиморфизма генов, влияющих на рост и развитие птицы. Это обусловлено тем, что мясо кур является важной составляющей рациона человека, поскольку служит источником белка, аминокислот, витаминов и микроэлементов.

В последние годы внимание исследователей обращено к поиску взаимосвязей между полиморфными вариантами различных генов, ответственных за рост и развитие, и показателями продуктивности птицы.

Ген миостатина, благодаря выработке соответствующего белка, влияет на развитие мускулатуры у высших позвоночных негативным образом [1]. Если по каким-то причинам происходит блокировка пути от гена *MSTN* к мышцам, наблюдается усиленный рост последних. Мутации, приводящие к изменениям последовательности ДНК в различных участках гена *MSTN* встречаются у ряда животных. У высших позвоночных *MSTN* тканеспецифичен, его синтез происходит в скелетных мышцах,

на которые он и оказывает биологические эффекты [2, 3].

Нуклеотидная последовательность гена миостатина полностью прочитана, а также известно, что этот ген включает в себя три экзона и два интрона [4]. Сейчас особое внимание уделяется обнаружению однонуклеотидных замен (SNP) в смысловых участках миостатинового гена, для того, чтобы выявить их ассоциации с признаками продуктивности [5, 6].

Целью нашей работы было определение влияния типа кормления на скорость роста курочек пушкинской породы в зависимости от генотипа по замене rs313744840 в гене миостатина.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужила ДНК, выделенная из крови кур пушкинской породы. Кровь брали с помощью инъекции одноразовым шприцем из подкрыльцовой вены крыла у цыплят в возрасте 3–4 недель и помещали в пробирки объемом 0,5–1,5 мл, содержащие антикоагулянт ЭДТА, который препятствует свертыванию крови, а также обладает консервирующими свойствами. До выделения ДНК образцы хранили в холодильнике при отрицательных температурах, чтобы замораживание жидкой фракции крови привело к разрушению клеточных оболочек. ДНК выделяли по методике с применением для расщепления белков фермента протеиназы К (Сибэнзим, Россия) и дальнейшей очистки с помощью фенола.

При рождении каждый цыпленок помечался специальной крылометкой с индивидуальным номером, который закреплялся за ним на весь период наблюдений. Было сформировано две группы курочек. Одна ($n = 40$) выращивалась на кормах для бройлеров (корм ПК-5, производство Тосненского комбикормового завода) до возраста 63 дня. Другая группа ($n = 64$) – на кормах для молодняка кур-несушек (ПК-4, производство ТККЗ). Оба комбикорма относятся к полнорационным кормам. Корм ПК-5 характеризуется повышенным содержанием протеина (до 20%) и обменной энергии (до 310 ккал в 100 г корма).

Определение живой массы кур проводили путем взвешивания на весах марки «Госметр» в различные периоды жизни: при рождении, в 7, 14, 21, 34, 40, 49, 56, 63 дня. Курочки, выращенные на кормах с повышенным содержанием протеина и обменной энергии, также были взвешены в возрасте 70 дней. А курочки, выращенные на кормах для молодняка кур-несушек, в возрасте 90 дней.

Для определения генотипов использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием следующих праймеров: прямой 5'-AAC-CAA-TCG-TCG-GTT-TTG-AC-3' и обратный 5'-CGT-TCT-CTG-TGG-GCT-GAC-TA-3' [5]. С их помощью получали один участок экзона 1 миостатинового гена (AF346599). Продукты амплификации обрабатывали ферментом рестрикции *Hpa*II, разрезающим ДНК в определенной точке. Это замена G/A в положении rs313744840 миостатинового гена.

ПЦР проводили на амплификаторе «BioRad» (США) с использованием реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-HCl pH 8,6, 2,5 мМ MgCl₂, 16,6 мМ NH₄OH, 0,125 мМ каждого из дезоксирибо-

нуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров, 50–100 нг геномной ДНК и 2,5 ед Taq-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск). Общий объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Применяли режим, состоящий из 35 циклов: 30 сек – 94 °С, 30 сек – 60 °С, 30 сек – 72 °С.

Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в течение 1 часа при рабочем напряжении 7,5 В/см в TBE буфере (45 мМ трис-борат, 1 мМ ЭДТА). Процесс проводили с использованием 1,5% агарозного геля, содержащего флуоресцентный краситель бромистый этидий. Смесь после рестрикции вносили в кармашки геля. В качестве маркера, позволяющего оценить длину фрагментов ДНК на геле, использовали pUC19/*Msp*I (Thermo Fisher Scientific). Сигнал фотографировали в системе гель-документации фирмы Кодак.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ SigmaPlot.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате определения генотипов по замене rs313744840 в гене миостатина и расчета взаимосвязи между генотипами и живой массой птицы в разные периоды жизни были обнаружены следующие закономерности.

Оказалось, что курочки с генотипом AA по замене rs313744840 в гене *MSTN*, выращиваемые на кормах для бройлеров, начали достоверно ($p < 0,05$) отличаться от своих сверстниц с генотипом AG с возраста 28 дней (табл. 1). Это преимущество в росте сохранялось до конца периода кормления кормом с повышенным содержанием протеина и обменной энергии.

При анализе птицы, выращенной на корме для молодняка кур-несушек, следует отметить, что для курочек тенденция к преимуществу по живой массе у гомозигот AA по замене rs313744840 в гене миостатина наблюдалась до 40-дневного возраста, но отмеченные различия не были достоверными (табл. 2). В 49 дней эти курочки в среднем имели самую низкую живую массу $747,636 \pm 50,805$ г ($n = 10$). К возрасту 90 дней эта группа незначительно обогнала гетерозигот AG по живой массе, а от гомозигот GG практически не отличалась.

Если сравнить курочек с генотипом AA по замене rs313744840 в гене миостатина, выращенных на разном корме, то можно отметить, что достоверно большую живую массу они имели лишь в возрасте 34 дня и 40 дней. В остальные периоды наблюдений достоверных различий не отмечено, хотя средние показатели живой массы у курочек, выращенных на бройлерных кормах были выше (табл. 3).

Кормление является важной составляющей в организации содержания и выращивания молодняка кур. В первые месяцы жизни цыплята не только интенсивно растут, но

и происходит формирование всех систем их организма. Для того, чтобы генетический потенциал особи раскрывался полностью, кормление на стадии выращивания должно быть полноценным.

Пушкинская порода кур относится к породам мясо-яичного типа. От нее возможно получать достаточное количество мяса без потери яйценоскости, что делает представителей этой породы привлекательным объектом для птицеводов-любителей [7].

Объем мышечной массы у высших позвоночных связан с работой гена миостатина (*MSTN*). 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 [1].

Природные мутации, которые снижают количество миостатина и/или подавляют его функции, были выявлены у человека, ряда сельскохозяйственных животных и птиц. Было найдено большое количество SNP в этом гене, влияющих на скорость роста, репродуктивные показатели и качество мяса [4, 8]. В различных породах овец, свиней, собак и кур определены мутации в некодирующих регуляторных областях, что влияет на уровень экспрессии *MSTN*, а следовательно, на рост и объем мышечной массы [9]. Изучалось влияние SNP в этом гене на живую массу в различных условиях выращивания и смертность цыплят [5].

Таблица 1

Живая масса в разные периоды жизни курочек пушкинской породы, выращенных на кормах для бройлеров, в зависимости от генотипа по замене rs313744840 в гене миостатина

Возраст цыпленка	Живая масса (г) в зависимости от генотипа по rs313744840 в гене <i>MSTN</i>			P
	AA (n = 14)	AG(n = 18)	GG(n = 8)	
Первые сутки	41,271 ± 0,903	40,161 ± 0,789	42,225 ± 1,022	0,315
7 дней	68,186 ± 2,168	62,868 ± 1,471	70,438 ± 3,588	0,045
14 дней	123,286 ± 4,909 ¹	114,333 ± 3,062 ¹	125,938 ± 8,425	0,203
21 день	211,386 ± 7,585 ¹	189,275 ± 5,818 ¹	204,438 ± 15,7	0,120
28 дней	317,571 ± 9,418 ¹	279,750 ± 9,011 ¹	302,625 ± 21,227	0,049
34 дня	448,429 ± 9,701 ¹	396,05 ± 11,318 ¹	413,688 ± 23,067	0,016
40 дней	608,538 ± 13,445 ¹	537,8 ± 14,291 ¹	562,875 ± 28,443	0,012
49 дней	853,385 ± 19,975 ¹	753,45 ± 18,924 ¹	798,250 ± 29,06	0,005
56 дней	1008,385 ± 22,483 ¹	897,526 ± 21,420 ¹	953,113 ± 30,170	0,005
63 дня	1170,583 ± 28,660 ¹	1040,368 ± 26,117 ¹	1120,857 ± 31,758	0,006
70 дней	1277,75 ± 28,585 ¹	1161,474 ± 25,467 ¹	1200,333 ± 31,218	0,016

Примечание. ¹ – достоверно отличающиеся группы, p < 0,05.

Таблица 2

Живая масса в разные периоды жизни курочек пушкинской породы, выращенных на кормах для молодняка кур-несушек, в зависимости от генотипа по замене rs313744840 в гене миостатина

Возраст цыпленка	Живая масса (г) в зависимости от генотипа по rs313744840 в гене <i>MSTN</i>			P
	AA (n = 10)	AG(n = 38)	GG(n = 16)	
Первые сутки	40,033 ± 0,679	40,514 ± 0,558	41,469 ± 0,965	0,527
7 дней	66,150 ± 2,203	63,408 ± 1,339	63,931 ± 2,359	0,659
14 дней	113,444 ± 4,534	110,145 ± 2,638	109,406 ± 3,668	0,811
21 день	201,050 ± 6,205	191,295 ± 4,365	193,031 ± 6,629	0,576
28 дней	292,500 ± 12,960	282,00 ± 6,175	287,344 ± 8,509	0,699
34 дня	410,455 ± 13,508	397,263 ± 8,194	400,067 ± 13,134	0,742
40 дней	556,091 ± 19,069	539,308 ± 10,018	536,438 ± 14,453	0,680
49 дней	747,636 ± 50,805	767,513 ± 12,170	761,800 ± 15,801	0,827
56 дней	954,400 ± 32,472	945,128 ± 20,320	961,000 ± 28,967	0,904
63 дня	1174,727 ± 37,291	1154,333 ± 19,218	1138,500 ± 35,171	0,764
90 дней	1425,182 ± 50,701	1397,897 ± 24,629	1416,938 ± 38,430	0,841

Таблица 3

Сравнительный анализ динамики роста живой массы у курочек пушкинской породы с генотипом АА по замене rs313744840 в гене миостатина, выращенных на кормах разного типа

Возраст цыпленка	Живая масса (г) курочек с генотипом АА по rs313744840 в гене MSTN		Значение t-критерия Стьюдента
	Выращенных на корме для молодняка кур-несушек (n = 10)	Выращенных на корме для бройлеров (n = 14)	
Первые сутки	41,271 ± 0,903	40,033 ± 0,679	1,10
7 дней	68,186 ± 2,168	66,150 ± 2,203	0,66
14 дней	123,286 ± 4,909	113,444 ± 4,534	1,47
21 день	211,386 ± 7,585	201,050 ± 6,205	1,05
28 дней	317,571 ± 9,418	292,500 ± 12,960	1,56
34 дня	448,429 ± 9,701 ¹	410,455 ± 13,508	2,28(p < 0,05)
40 дней	608,538 ± 13,445 ¹	556,091 ± 19,069	2,25 (p < 0,05)
49 дней	853,385 ± 19,975	747,636 ± 50,805	1,94
56 дней	1008,385 ± 22,483	954,400 ± 32,472	1,37

Примечание. ¹ – достоверно отличающиеся группы, p < 0,05.

Ранее нами уже были выявлены взаимосвязи между живой массой кур и заменой rs313744840 в гене миостатина [6, 8]. Животные, несущие аллель А по этой замене, обладали повышенной скоростью роста.

В проведенном исследовании курочки, выращенные на кормах для бройлеров, с генотипом АА превосходили по живой массе курочек с гетерозиготным генотипом АG (табл. 1). Можно предположить, что у гомозигот АА по изучаемой замене есть значительный потенциал для роста, который не всегда может быть реализован в полной мере на кормах для молодняка кур-несушек (табл. 2). В то же время гомозиготы АА, выращенные на разном корме, отличались друг от друга незначительно.

Заключение

Курочки с генотипом АА, выращиваемые на бройлерных кормах, начали достоверно (p < 0,05) отличаться от своих сверстниц с генотипом АG с возраста 28 дней. Это преимущество в росте сохранялось до конца периода кормления кормом с повышенным содержанием протеина и обменной энергии. Для курочек, выращенных на кормах для молодняка кур-несушек, тенденция к преимуществу по живой массе у гомозигот АА наблюдалась до 40-дневного возраста, но отмеченные различия не были достоверными. К возрасту 90 дней эта группа незначительно обогнала гетерозигот АG по живой массе, а от гомозигот GГ практически не отличалась. Курочки с генотипом АА, выращенные на корме с повышенным содержанием протеина и обменной энергии, имели достоверно большую живую массу лишь в возрасте 34 дня и 40 дней. Использование

корма с повышенным содержанием протеина и обменной энергии позволяет реализовать генетический потенциал птицы.

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке ФАНО России в рамках ГЗ АААА-А18-118021590138-1 с использованием популяций кур из биоресурсной коллекции ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург – Пушкин).

Список литературы

1. Lee S.J. Regulation of muscle mass by myostatin // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2004. – V. 20. – P. 61–86.
2. Yang S., Li X., Liu X. et al. Parallel comparative proteomics and phosphoproteomics reveal that cattle myostatin regulates phosphorylation of key enzymes in glycogen metabolism and glycolysis pathway // *Oncotarget.* – 2018. – № 9 (13). – P. 11352–11370.
3. Ma G., Wang H., Gu X. et al. CARP, a myostatin-down-regulated gene in CFM cells, is a novel essential positive regulator of myogenesis // *International Journal of Biological Sciences.* – 2014. – № 10 (3). – P. 309–320.
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, France.* – 2002. – P. 19–23.
5. Bhattacharya T.K., Chatterjee R.N. Polymorphism of the myostatin gene and its association with growth traits in chicken // *Poultry Science.* – 2013. – V. 92 (4). – P. 910–915.
6. Mitrofanova O.V., Dementeva N.V., Krutikova A.A. et al. Association of polymorphic variants in MSTN, PRL, and DRD2 genes with intensity of young animal growth in Pushkin breed chickens // *Cytology and Genetics.* – 2017. – V. 51(3). – P. 179–184.
7. Юрченко О.П., Макарова А.В., Вахрамеев А.Б. Гетерогенный подбор при разведении пушкинской породы кур // *Генетика и разведение животных.* – 2017. – № 3. – С. 51–57.
8. Dementeva N.V., Mitrofanova O.V., Tyshchenko V.I. et al. The rate of weight gain and productivity of a chicken broiler cross with various polymorphic types of the myostatin gene // *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 1–5.
9. Hu W., Chen S., Zhang R. Yushuang L. Single nucleotide polymorphisms in the upstream regulatory region alter the expression of myostatin // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal.* – 2013. – V. 49. – P. 417–423.