

УДК 636.5: 577.21

Р.О. КУЛІБАБА, кандидат сільськогосподарських наук, завідувач лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Інституту тваринництва НААН України

*Алельний поліморфізм гену *pit-1* у двох лініях курей різного напрямку продуктивності*

Вивчено генетичну структуру двох ліній курей вітчизняної селекції м'ясо-яєчного (білий плімутрок, лінія Г-2) та яєчного (Бірківська барвіста, лінія А) напрямів продуктивності за локусом гіпофізарного фактору транскрипції з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Встановлено поліморфізм за другим інтроном гену (інсерція розміром 57 п.н.). Частота алелей I та D у курей лінії Г-2 склала 0,52 та 0,48; у курей лінії А – 0,51 та 0,49 відповідно.

Полімеразна ланцюгова реакція, гіпофізарний фактор транскрипції, інсерція, поліморфізм, яєчна продуктивність.

В основі сучасної маркер-асоційованої селекції полягає пошук “функціонального” поліморфізму генів, функціонування яких пов'язано із забезпеченням основних фізіологічних функцій організму [5]. Визначення генетичної структури за конкретними генами дозволить у подальшому вивчити зв'язок їх алельних варіантів з продуктивними ознаками, що безпосередньо призведе до інтенсифікації селекційного процесу з метою максимального розкриття продуктивного потенціалу [6, 10]. Причому усе вищевикладене відноситься до самих різних галузей тваринництва загалом та до птахівництва зокрема [1, 4, 7]. У зв'язку з цим, доцільним є вивчення поліморфізму генів, продукти яких утворюють так звану гіпоталамо-гіпофізарну вісь регуляції. До таких генів відносяться гени гормону росту, пролактину, тиреотропного гормону, вазоактивного інтестинального пептиду, гіпофізарного фактору транскрипції тощо.

Гіпофізарний фактор транскрипції, також відомий як гіпофізарно-специфічний фактор транскрипції або фактор-1 гормону росту (*Pit 1/POU1F1*), відноситься до “вищої ланки” регуляції функцій соматотропної осі, що визначає функції гормону росту. Він безпосередньо приймає участь у регуляції експресії гену гормону росту, пролактину та тиреотропного гормону, приймає участь у проліферації та диференціюванні гормон-секретуючих клітин [9]. Зміна у характері

експресії *PIT-1* призводить до зміни експресії вищеперелічених генів відповідно.

Показано, що визначені варіанти гену *PIT-1* асоційовані з живою масою та розвитком імунної системи у яєчних курей різних порід [9]. Також показано наявність інсерції в інтрони гену [8]. На жаль, досліджень генетичної структури різних порід локусів на рівні ДНК в Україні не проводилось, що багато в чому визначає новизну та актуальність даної роботи.

Дані дослідження з визначення генетичної структури лінії птиці вітчизняної селекції за локусом гіпофізарного фактору транскрипції проводяться у контексті загального вивчення поліморфізму різних генів-кандидатів, що пов'язані з продуктивними якістьми птиці [2, 3].

Мета роботи – вивчення поліморфізму гену *PIT-1* за наявністю інсерції розміром 57 п.н. у другому інтрони у двох лініях курей вітчизняної селекції різного напрямку продуктивності.

Матеріал та методи досліджень. Дослідження проводили у лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Інституту тваринництва НААН.

Для проведення досліджень використовували птицю яєчного та м'ясо-яєчного напрямів продуктивності:

- кури яєчні породи бірківська барвіста, лінія А;
- кури м'ясо-яєчні породи білий

плімутрок, лінія Г-2.

Від кожної лінії курей було відібрано по 10 зразків крові на експериментальній фермі “Збереження державного генофонду Інституту тваринництва Національної академії аграрних наук України”.

Кров відбирали методом “крапля крові на папері” із гребня за допомогою скарифikatorа. Виділення ДНК проводили з використанням комерційного набору реагентів “ДНК Сорб-В” (Росія).

Поліморфізм локусу гіпофізарного фактору транскрипції визначали за наявністю інсерції розміром 57 п.н. (57 bp indel) у другому інтрони гену за допомогою електрофорезу продуктів ампліфікації.

Для проведення ПЛР використували наступні праймери:

forward 5'-gtc aag gca aat att ctg tac c-3';

reverse 5'-tgc atg tta att tgg ctc tg-3' [8].

Ампліфікацію проводили за допомогою реагентів DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific) з використанням термоциклеру “Терцик” (“ДНК-технологія”, Росія) за програмою наведеною у таблиці 1.

Об'єм кінцевої суміші склав 20 μ L, концентрація праймерів – 0,2 μ M.

Електрофорез проводили у 2,5% агарозному гелі протягом 40 – 60 хв. при 120 V. Продукти ампліфікації візуалізували з використанням етидіуму броміду в ультрафіолетовому спектрі. Розмір фрагментів визначали за допомогою маркеру молекулярних мас М-50.

СЕЛЕКЦІЯ І ГЕНЕТИКА

1. Програма ампліфікації для проведення ПЛР

Стадія ПЛР	Денатурація	Віджиг		Елонгація	
Локус Pit1	35 циклів				
	94 С (5 хв.)	94 С (30 с)	58 С (30 с)	72 С (30 с)	72 С (5 хв.)

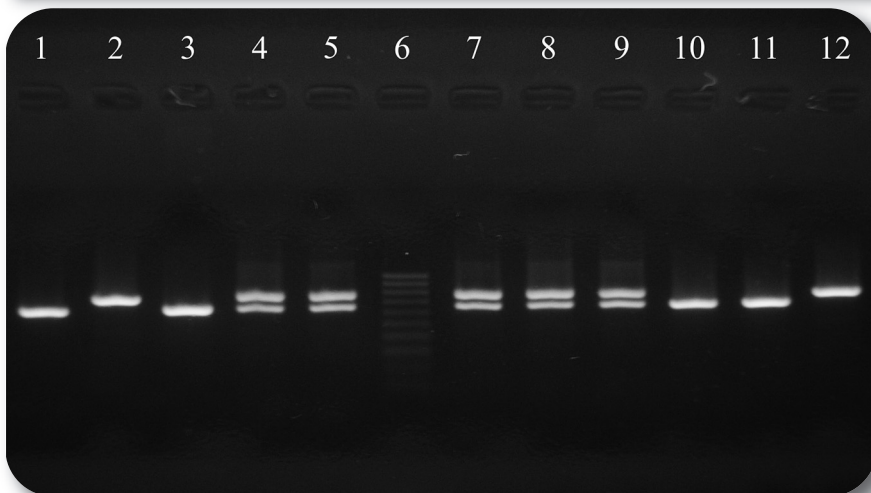


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації 2-го інтрону гіпофізарного фактору транскрипції у м'ясо-яєчних курей лінії Г-2:
1 – 12 – номери лунок; 1, 3, 10, 11 – D/D; 2, 12 – I/I; 4, 5, 7, 8, 9 – I/D; 6 – маркер молекулярних мас M-50.

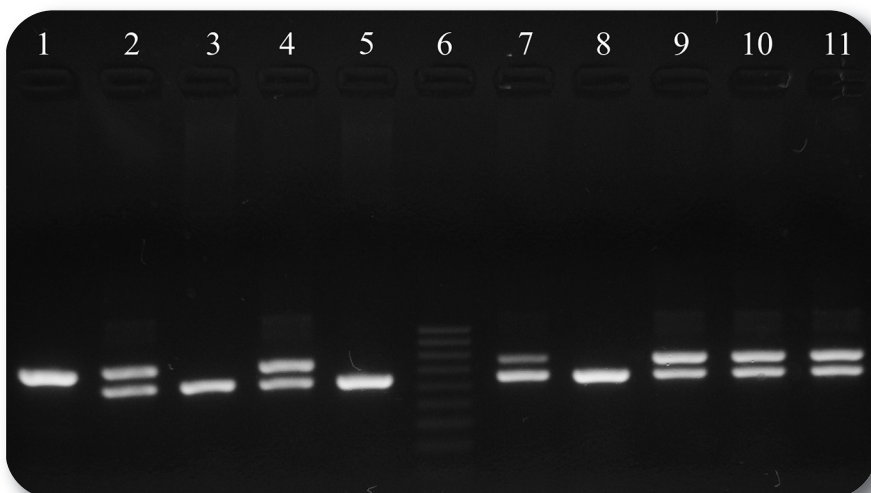


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації 2-го інтрону гіпофізарного фактору транскрипції у яєчних курей лінії А:
1 – 11 – номери лунок; 1 – I/I; 2, 4, 7, 9, 10, 11 – I/D; 3, 5, 8 – D/D; 6 – маркер молекулярних мас M-50.

2. Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності за локусом гіпофізарного фактору транскрипції (57 bp indel)

Генотип	Лінія Г-2				Лінія А			
	О	Е	(О-Е)2/Е	χ^2	О	Е	(О-Е)2/Е	χ^2
I/I	28	26,91	0,044	0,18	24	25,38	0,075	0,303
I/D	48	50,17	0,093		53	50,25	0,151	
D/D	24	22,92	0,051		23	24,37	0,077	
алелі	частота алелів							
I	0,52				0,51			
D	0,48				0,49			

У випадку з інсерцією у другому інтроні гену Pit1 на електрофореграмі наведені фрагменти розміром: 387 п.н., що вказує на генотип I/I, 330 п.н. – D/D. Гетерозиготні особи I/D представлені комбінацією обох варіантів – 387 та 330 п.н. відповідно.

Визначали фактичний та теоретичний розподіл генотипів, частоти генотипів та алелів, критерії генетичної рівноваги χ^2 у популяціях, рівень гетерозиготності, індекс фіксації Райта. Розрахунки проводили з використанням комп'ютерної програми Popgen32.

Результати досліджень. На рисунках 1 та 2 наведені електрофореграми продуктів ампліфікації 2-го інтрону гену гіпофізарного фактору транскрипції у двох лініях курей.

Для обох ліній курей характерна наявність усіх трьох можливих генотипів. На електрофореграмах наведені інсерція та делеція у гомозиготному (I/I та D/D) та гетерозиготному (I/D) стані.

Генетична структура ліній курей різного напрямку продуктивності наведена у таблиці 2.

У результаті досліджень встановлено високий рівень поліморфізму гену гіпофізарного фактору транскрипції. В обох лініях курей виявлено усі три можливі генотипи: I/I, I/D та D/D. За співвідношенням частот генотипів Pit1 дослідні лінії курей практично не відрізняються одна від одної (рис. 3).

У курей лінії Г-2 дещо більша кількість особин з алелем I у гомозиготному стані, у той час як у лінії А наявна дещо більша кількість гетерозиготних особин. Індекс фіксації Райта (FIS) у лінії Г-2 дорівнює 0,038; у лінії А -0,06, що відповідає стану генетичної рівноваги.

Поліморфізм Pit1 за інсерцією у другому інтроні пов'язаний з некодуючою ділянкою гену, що виключає можливість його визначення за допомогою класичних методів біохімічної генетики. Не дивлячись на те, що даний поліморфізм не призводить до зміни послідовності амінокислот у молекулі кодованого даним геном білку, наявність інсерції може подіяти на характер експресії, що потенційно впливає на ступінь прояву ознаки.

На відміну від генетичної структури ліній курей, що були вивчені за локусом пролактину (інсерція у 24 п.н. у промоторній ділянці гену та однонуклеотидний поліморфізм у положенні -2402), гормону росту (перший інтрон) та інсуліноподібного ростового фактору I (однонуклеотидний поліморфізм у 5' UTR). Зв'язку розподілу частот алелів Pit1 з напрямком продуктивності птиці (яєчний/м'ясо-яєчний) не виявлено. За генетичною структурою за локусом Pit1 лінії яєчних та м'ясо-яєчних курей практично не відрізняються.

Висновки

1. Встановлено високий рівень поліморфізму гену гіпофізарного фактору транскрипції (за наявності інсерції у другому інтроні) у лініях курей вітчизняної селекції яєчного та м'ясо-яєчного напрямків продуктивності.

2. За співвідношенням частот генотипів Pit1 лінії м'ясо-яєчних та яєчних курей практично не відрізняються.

3. У лінії Г-2 м'ясо-яєчних курей частота алеля I склала 0,52, алеля D – 0,48; у лінії А яєчних курей частота

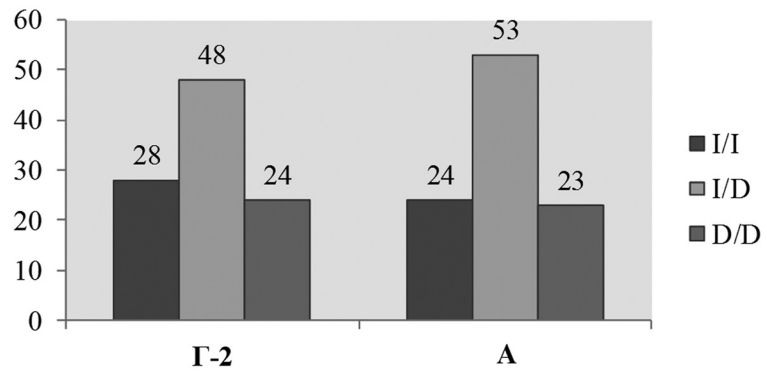


Рис. 3. Співвідношення частот генотипів PIT-1 у дослідних лініях курей

алеля I – 0,51; алеля D – 0,49 відповідно.

Исучена генетическая структура двух линий кур отечественной селекции мяско-яичного (белый плимутрок, линия Г-2) и яичного (борковская барвистая, линия А) направлений продуктивности по локусу гипофизарного фактора транскрипции с использованием полимеразной цепной реакции. Установлен полиморфизм по второму интрону гена (инсерция размером 57 п.н.). Частота аллелей I и D у кур линии Г-2 составила 0,52 и 0,48; у кур линии А – 0,51 и 0,49 соответственно.

Полимеразная цепная реакция, гипофизарный фактор транскрипции, инсерция, полиморфизм, яичная продуктивность

The genetic structure for pituitary-specific transcription factor gene of two Ukrainian chicken selected lines by polymerase chain reaction is studied. The polymorphism in the second intron (57 bp insertion) of the pituitary-specific transcription factor gene was found. Frequencies of the I and D alleles in line G-2 and line A were 0,52; 0,48 and 0,51; 0,49 respectively.

PCR, pituitary-specific transcription factor, insertion, polymorphism, egg productivity

Література

1. Дроздов Е.В. Аллельный полиморфизм гена PIT-1 в стадах крупного рогатого скота брянской области и его связь с молочной продуктивностью / Е.В.Дроздов, В.В.Заякин, И.Я.Нам // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 5 (3). – С. 235-239.
 2. Кулибаба Р.А. Генетическая структура линий кур разного направления продуктивности по локусу рецептора гормона роста / Р.А. Кулибаба // Птахівництво: Міжвід. темат. наук. зб. – 2012. – Вип. 69. – С. 26-32.
 3. Кулибаба Р.А. Полиморфизм гена инсулиноподобного ростового фактора-I в линии мяско-яичных кур отечественной селекции / Р.А.Кулибаба // Птахівництво: Міжвід. темат. наук. зб. – 2012. – Вип. 68. – С. 250-256.

4. Analysis of associations of PIT1 genotypes with growth, meat quality and carcass composition traits in pigs / C.Brunsch, I.Sternstein, P.Reinecke [et al.] // J.Appl.Gen. – 2002. – Vol. 43. – P. 85-91.
 5. Functional genomics of the chicken – a model organism / L.A.Cogburn, T.E.Porter, M.J.Duclos [et al.] // Poultry science. – 2007. – Vol. 86. – P. 2059 – 2094.
 6. Genetic markers linked to quantitative traits in poultry / S.J.Lamont, N.Lakshmana, Y.Plotsky [et al.] // Anim.Genet. – 1996. – Vol. 27. – P. 1-8.
 7. Genetic variation of Pit-1gene in Chinese indigenous and Western goose populations / J.Cheng, N.Qiao, W.Zhao [et al.] // African journal of biotechnology. – 2009. – Vol. 8 (14). – P. 3147-3153.
 8. Nie Q. Identification and characterization of single nucleotide

polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography / Q.Nie, M.Lei, J.Ouyang [et al.] // Genet. Sel. Evol. – 2005. – Vol. 7. – P. 339-360.
 9. Identification of a single nucleotide polymorphism of the pituitary-specific transcriptional factor 1 (Pit 1) gene and its association with body composition trait in Iranian commercial broiler line / Z.Rodbari, M.Alipanach, H.R.Seyedabadi [et al.] // African journal of biotechnology. – 2011. – Vol. 10 (60). – P. 12979-12983.
 10. Rothschild M.F. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock / M.F.Rothschild, M.Soller // Probe newsltt. Agric. Genomic. – 1997. – Vol. 8. – P. 13-20.