

Визначення статі пtiці з невираженим статевим диморфізмом з використанням полімеразної ланцюгової реакції

Р.О. КУЛІБАБА, кандидат сільськогосподарських наук, завідувач лабораторії профілактики захворювань пtiці та молекулярної діагностики,

О.П. ПОДСТРЕШНИЙ, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Інститут тваринництва НААН України

У роботі наведено порівняльний аналіз різних методів визначення статі у пtiці з невираженим статевим диморфізмом. Детально описано молекулярно-генетичний метод, оснований на поліморфізмі гену *CHD*. Показано застосування методу полімеразної ланцюгової реакції для визначення статі пtiці різних видів.

Полімеразна ланцюгова реакція, стать, поліморфізм, декоративна пtiця

Сучасна технологія промислового птахівництва базується на використанні високопродуктивної пtiці і передбачає роздільно-статеве вирощування ремонтного і товарного молодняку. Це дозволяє враховувати різну потребу самців і самок у поживних речовинах та оптимізувати щільність посадки і технологію утримання особин кожної статі [1,2]. Такий спосіб утримання пtiці позитивно впливає на ріст і розвиток молодняку, а також на наступну продуктивність та життєздатність племінної і товарної пtiці, і, відповідно, на економічну ефективність галузі [3]. Тому в племзаводах і репродукторах виникає необхідність весь добовий молодняк розділяти за статтю і вирощувати для племінних цілей лише самців або самок певних поєднаних ліній, які використовують в схрещуваннях за певною схемою кросу для отримання гетерозисного фінального гібриду. Для сексування добового молодняку запропоновано більше 10 методів. Однак більшість з них не забезпечують високу точність і швидкість сексування, трудоміст-





кі, складні у виконанні, викликають стрес у пташенят, нерідко призводять до їх травмування [4].

Останнім часом у світовому птахівництві широко використовуються три методи: японський (вентсексинг), колорсексинг і федерсексинг. Японський метод визначення статі оснований на огляді картини клоаки пташеняти з наступною диференціацією оператором-сортувальником форми і величини статевого горбика [5]. В Україні використовують японський метод, хоча точність і швидкість сексування при цьому звичайно невисока. В країнах СНД висококваліфіковані оператори з багаторічним стажем роботи сексують японським методом за 1 годину 600-800 добових курчат з середньою точністю 92-96%. Швидкість сексування індичат, каченят і гусенят дещо нижча (500 гол./год.) при точності: для індичат – 88-92%, гусенят і каченят – 96-99%. Оперативний контроль точності сортування молодняку за статтю здійснюють за допомогою анатомічного методу, що призводить до загибелі частини пташенят [4].

Крім того, вентсексинг має ще ряд істотних недоліків. У процесі визначення статі молодняку цим методом можливе травмування і контамінація пташенят патогенною мікрофлорою кишечника, що може погіршити його кондиційність та біологічну повноцінність. Зокрема, травми тонкої стінки жовточного міхура, що іноді виникають в процесі вентсексингу,



призводять до жовточного перитоніта і загибелі від 0,28 до 1,57% пташенят [6]. Процедура вентсексингу збільшує час між вибіркою молодняку з інкубатора і посадкою його у пташник, що додатково стресує птицю і знижує її збереженість при вирощуванні на 0,4 – 2,0% [7, 8]. У деяких випадках (слабкий молодняк, некваліфіковані оператори) застосування вентсексингу збільшує відхід курчат в процесі вирощування на 8 – 15% [9].

На відміну від японського методу, генетичні методи (аутосексинг) простіші у виконанні і дозволяють легко ідентифікувати стать добового молодняку. Аутосексинг базується на розведенні спеціально виведеної птиці, у якої статева належність добового молодняку



визначається за забарвленням пуху (колорсексинг) або ступенем розвитку оперення крила (федерсексинг) [10, 11]. У сучасному птахівництві особливо поширені аутосексні кроси яєчних і м'ясних курей, у яких в якості маркерів статі використовуються системи альтернативних алелів – “сріблястість – золотистість”, “смугастість – однотонність” забарвлення оперення, а також “рання – пізня”

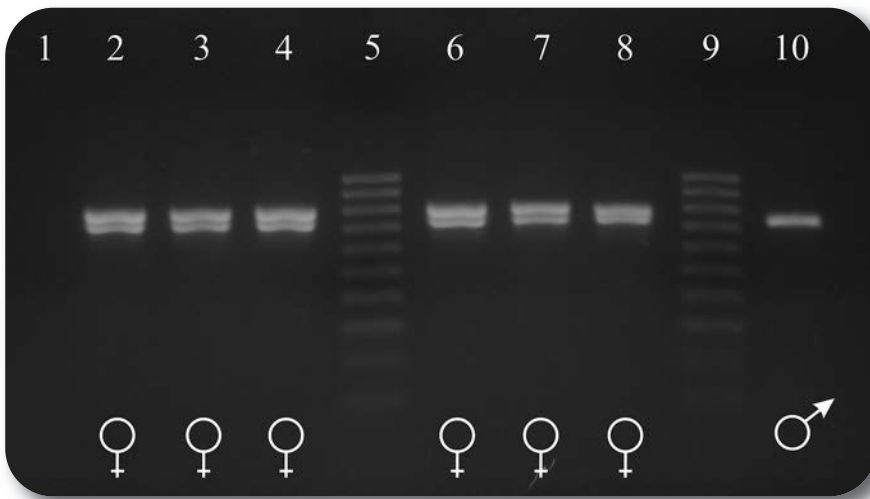


Рис 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації в 1,5% агарозному гелі.

1 – негативний контроль; 5, 9 – маркер молекулярних мас M-50; 2, 3, 4 – *Psittacus erithacus*; 6, 7 – *Deropterus accipitrinus*; 8, 10 – *Cacatua moluccensis*.

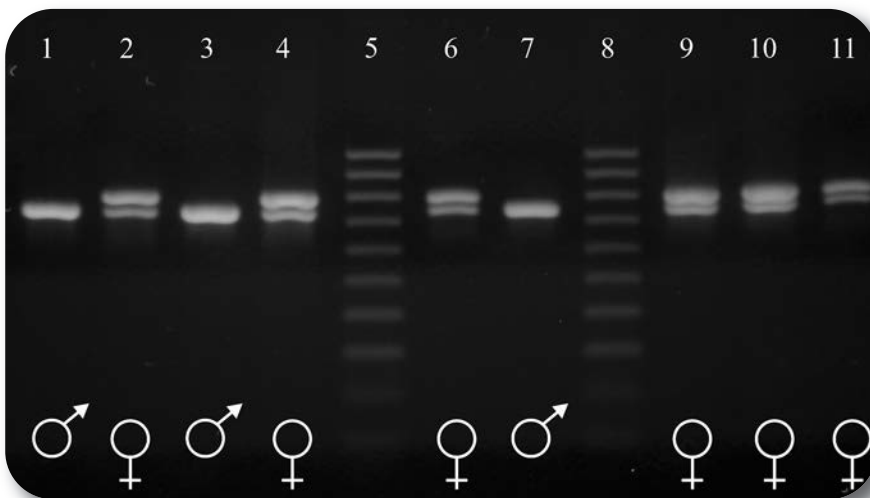


Рис 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації в 1,5% агарозному гелі:

1,2 – *Aratinga solstitialis*; 3, 4 – *Aratinga jendaya*; 5, 8 – маркер молекулярних мас M-50; 6, 7 – *Ara nobilis*; 9, 10 – *Ara chloroptera*; 11 – *Amazona aestiva*.

оперюваність молодняку. Аутосексинг забезпечує високу точність (98-100%) і швидкість (1,5-7 тис. гол./час) сортування молодняку за статтю, нешкідливий для пташенят, високотехнологічний і не потребує тривалого навчання сортувальників.

Після того як дослідники [12, 13] виявили і клонували специфічну нуклеотидну послідовність у W-хромосомі, була показана можливість визначення статі у курчат за допомогою методу блотт-гібридизації ДНК крові особини із специфічним праймером [14]. Метод

назвали молекулярно-генетичним. Стать молодняку чітко визначається не лише з використанням для аналізу проб очищеної ДНК курчати, але і при дослідженні його відмитих еритроцитів або навіть цільної крові. Однак підкреслюється, що дана процедура безпомилкового визначення статі молодняку трудомістка і потребує висококваліфікованих операторів.

За останні десятиріччя розроблена методика вентсексингу крім курей, також для індиків, качок, гусей, цесарок. Розробляється методика визначення статі молод-

няку для перепелят, страусят, фазанят та деяких інших видів птиці. Показана можливість створення аутосексних кросів для всіх видів сільськогосподарської птиці, але для цього необхідна тривала, копітка робота. У деяких видів птиці виявлена природна аутосексність добового молодняку при чистолінійному розведенні [4]. Але всі ці можливості не можуть вирішити деяких актуальних проблем визначення статі.

У зв'язку з тим, що останнім часом зростає інтерес до розведення декоративної птиці, а також страусів, у молодняку яких невиражений статевий диморфізм, проблема визначення статі стає ще більше актуальною [15]. Визначення статі необхідне для забезпечення правильного підбору співвідношення самок і самців при розведенні птиці та при комплектуванні пар. Класичні методи визначення статі, описані вище, не забезпечують достатньої ефективності або взагалі непридатні. Помилки у визначенні статі часто стають причиною відсутності розмноження птиці у неволі. Особливе значення визначення статі має для декоративного птахівництва, наприклад, при розведенні таких екзотичних видів птиці як папуги.

Останнім часом розроблений метод визначення статі птиці оснований на використанні полімеразної ланцюгової реакції [16, 17]. Метод ґрунтується на різниці в нуклеотидній послідовності у статевих хромосомах. На відміну від ссавців, у птиці гетерогаметною являється жіноча стать. Самки мають Z- і W-хромосоми, а самці – дві Z-хромосоми [18]. Griffiths et al. в 1998 році розробили метод визначення статі оснований на поліморфізмі довжини інтрона гену CHD (chromo-helicase DNA binding protein) [19].

У птиці CHD-ген присутній у двох різних варіантах (CHD-Z та CHD-W). Один із варіантів гену знаходиться в Z-хромосомі і є однаковим за структурою у особин обох статей (CHD-Z), другий – у W-хромосомі та є лише у самок (CHD-W). Рекомбінації між CHD-Z і

CHD-W не спостерігаються, аутомні аналоги відсутні [20].

Розміри інтрону генів CHD-Z і CHD-W варіюють у різних видів птиці та відрізняються один від другого навіть у межах одного виду [21, 22]. Гриффітсом із співавторами були запропоновані праймери P2 та P8, які фланкують інтрон CHD, що дозволило, використовуючи в якості основи різницю в довжині інтронів генів CHD-Z і CHD-W, розробити метод визначення статі [19]. Даний метод дозволяє визначити стать у переважній більшості видів птиці за виключенням безкілевих.

Матеріал і методи дослідження. Для проведення дослідів були відібрані самці і самки 22 видів птиці. Для аналізу використовували кров або пір'я. Кров брали модифікованим методом "крапля крові на папері" з гребеня за допомогою скарифікатора на стерильний фільтрувальний папір. Кожний зразок підсушували, маркували і індивідуально упаковували для попередження контамінації. Виділення ДНК із дослідних зразків крові проводили за допомогою комерційного набору реагентів "ДНК-сорб-В" (Росія). При використанні в якості джерела генетичного матеріалу пір'їн, ножицями відділяли від стержня пера очин, який переносили в мікропробірку для проведення подальшого аналізу. Для кожної проби використовували по три пір'їни. Виділення ДНК проводили за допомогою комерційного набору реагентів "Ускоренная пробоподготовка" (Амплісенс, Росія).

Для проведення ПЛР використовували праймери P2 і P8. P8 5'-ctcccaaggatgagraaytg-3', P2 5'-tctgcatcgctaaatccttt-3'. ПЛР проводили за допомогою реагентів GenPac® PCR Core ("Лабораторія Ізоген", Росія) з використанням термоциклера "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія). Кінцевий об'єм суміші склав 20 µL. Концентрація Taq ДНК-полімерази, дезоксинуклеозидтрифосфатів і хлориду магнію складала 1u, 200 µM, 2,5 mM відповідно. В склад суміші входив також ДНК-розчинник (10 µL) і праймери (5 µL, з кінцевою концентраці-

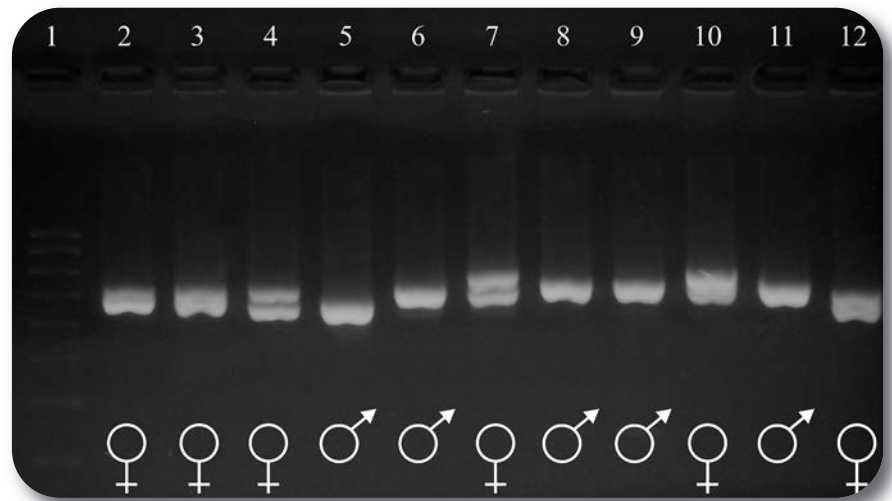


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації в 5% агарозному гелі:

1 - маркер молекулярних мас M-50; 2,3 – *Numida meleagris*; 4,5 – *Phasianus colchicus*; 6,7 – *Larus argentatus*; 8,9 – *Ciconia ciconia*; 10,11 – *Melopsittacus undulatus*; 12 – *Lophura nycthemerus*.

єю 0,4 µM). Ампліфікацію проводили за наступною схемою: денатурація 94°C 1 хв. 30 с 1 цикл, 30 циклів: 48°C – 45 с, 72°C – 45 с, 94°C – 30 с і заключна стадія 72°C – 10 хв. Продукти ампліфікації розділяли в агарозному гелі. Концентрацію гелю варіювали від 1,5% до 5% (для різних видів птиці).

Результати досліджень. За допомогою даного методу була успішно визначена стать наступних видів птиці: цесарка звичайна (*Numida meleagris*), фазан звичайний (*Phasianus colchicus*), фазан срібний (*Lophura nycthemerus*), чайка срібляста (*Larus argentatus*), лелека білий (*Ciconia ciconia*), хвилястий папужка (*Melopsittacus undulatus*), червонокрилий папуга (*Aprosmictus erythropterus*), корела (*Nymphicus hollandicus*), сонячна аратинга (*Aratinga solstitialis*), аратинга-ендайа (*Aratinga jendaya*), помаранчеволоба аратинга (*Aratinga canicularis*), синьолобий амазон (*Amazona aestiva*), венесуельський амазон (*Amazona amazonica*), жако (*Psittacus erithacus*), рожевогрудий ожереловий папуга (*Psittacula alexandri*), віяловий папуга (*Deroptryus accipitrinus*), карликовий ара (*Ara nobilis*), зеленокрилий ара (*Ara chloroptera*), синьо-жовтий ара (*Ara ararauna*), молуккський какаду (*Cacatua moluccensis*), зелений турако (*Tauraco persa*), фіолетовий тура-

ко (*Tauraco violacea*).

У випадку з папугами використовували 1,5% агарозний гелю (рис. 1, 2).

Використання 1,5% агарозного гелю у випадку з іншими видами птиці не доцільне, оскільки його роздільної здатності виявилось недостатньо для розділення ампліконів.

Цесарку звичайну і фазана вдалося сексувати з використанням 5% агарозного гелю, решту видів – 4% гелю (рис. 3).

Для всіх видів птиці у випадку самців на електрофореграмі присутня одна смуга, у випадку самок – дві.

Результати досліджень свідчать про виражений поліморфізм гену CHD у різних видів птиці. При цьому існує різниця за розміром продуктів ампліфікації як між CHD-Z, так і CHD-W.

Таким чином, використання полімеразної ланцюгової реакції та системи праймерів P2/P8, дає змогу максимально ефективно, без негативних наслідків для здоров'я птиці (так як в якості вихідного матеріалу використовується пір'я або крапля крові), швидко (за 5 – 6 годин) визначити стать птиці.

Висновки

Порівняно з іншими методами (вентсексинг, колорсексинг, федерсексинг) використання полімераз-

ної ланцюгової реакції дозволяє ефективно та швидко визначити стать птахів з невираженим статевим диморфізмом.

Поліморфізм гену CHD є основою для сексування птахів методом ПЛР.

Використання системи праймерів P2/P8 дає змогу сексувати найбільш поширені види декоративної птиці.

При визначенні статі папуг методом ПЛР необхідно використовувати 1,5% агарозний гель, у той час як для інших видів птахів – від 4 до 5%.

В статье приведен сравнительный анализ разных методов определения пола птиц с невыраженным половым диморфизмом. Детально описан молекулярно-генетический метод, основанный на полиморфизме гена CHD. Показано использование полимеразной цепной реакции для определения пола различных видов птиц.

Полимеразная цепная реакция, пол, полиморфизм, декоративная птица

In article the comparative analysis of different methods of sex

determination of birds with not expressed sexual dimorphism is resulted. The molecular-genetic method, based on polymorphism of CHD-gene, is described in detail. Application of Polymerase Chain Reaction for sexing various avian species is shown.

Polymerase chain reaction, sex, polymorphism, decorative birds

Автори вказують подяку власнику розсаднику екзотичної птиці "Т.Р.А.Ф." Фенічу Роману за надану птацю (папугу).

Лтература

1. Marks H.L. Sexual dimorphism in early feed and water intake of broilers / H.L. Marks // Poultry Sc. – 1985. – Vol. 64. – № 3. – P. 425 – 428.
2. Зелятров А. В. Прогнозы развития производства бройлеров к 2000 году за рубежом // Птицеводство. – 1981. – № 9. – С. 39-40.
3. Старчиков Н., Догадаев А. Влияние раздельного выращивания курочек и петушков на их рост, развитие и продуктивные качества // Передовой науч.-произв. опыт в птицеводстве: Экспресс-информация. – 1983. – №4. – С. 14 – 16.
4. Сучасні методи визначення статі молодняка сільськогосподарської птиці (теорія і практика) / Ю.В.Бондаренко, О.В.Терещенко, Т.Е.Ткачик та ін. – 2011. – 80 с.
5. Дуюнова А.А., Бондаренко Ю.В. Методические рекомендации по оценке качества и определению пола суточного молодняка сельскохозяйственной птицы (Практическое руководство). – Харьков, 1995. – 21 с.
6. Бондаренко Ю.В. Дифференциальная смертность особей мужского и женского пола у кур // Науч.-техн. бюл. / УНИИП. – Харьков, 1986. – № 20. – С. 3 – 6.
7. Бошнаков А., Жеков Р. Влияние на различитые методы за определяне пола на однодневни пилета върху тяхното развитие и заболеваемост в млада възраст // Проблеми на производството и преработката на птиче мясо. – София, 1976. – С.59 – 63.
8. Fanguy R. Effect of delayed placement on mortality and growth performance of commercial broilers / R. Fanguy // Poultry Sc. – 1980. – Vol. 59. – № 6. – P. 1215 – 1220.
9. Singh J. Early sex identification in poultry through sex-linkage mechanism / J. Singh, A. Dey Roy, R. Sharma // Poultry Guide. – 1979. – Vol. 16. – № 6. – P. 41 – 45.
10. Hann C.M. Sex-linkage in poultry breeding / C.M. Hann // Bull. Min. Agriculture Fisheries Food. – Lond.: H.M.S.O., 1966. – №38. – 23 pp.
11. Silverudd M. Genetic basis of sexing automation in the fowl / M.Silverudd // Acta agr. scand. – 1978. – Vol. 28. – №4. – P. 169 – 195.
12. Nucleotide sequences and unusual electrophoretic behavior of the W chromosome-specific repeating DNA units of the domestic fowl, Gallus gallus domesticus / H.Kodama, H. Saitoh, M. Tone [et al.] // Chromosoma. – Berl., 1987. – Vol. 96. – P. 18 – 25.
13. Demonstration of W chromosome-specific repetitive DNA sequences in the domestic fowl, Gallus g. domesticus / M.Tone, N. Nakano, E.Takao [et al.] // Chromosoma. – Berl., 1982. – Vol. 86. – P. 551 – 569.
14. Determination of the sex of chickens by a biotin-labeled deoxyribonucleic acid probe / N.Uryu, Y.Nagata, K. Ito [et al.] // Poultry Sc. – 1989. – Vol. 68. – № 6. – P. 850 – 853.
15. New PCR multiplexes for sex typing of ostriches / Malago-JR., W.Medaglia, Matheucci-JR. [et al.] // Bratz. J. Biol. – 2005. – V. 65 (4). – P. 743 – 745.
16. Dubiec A. Molecular techniques for sex identification in birds / A.Dubiec, M.Zagalska-Neubauer // Biological lett – 2006. – V. 43 (1). – P. 3 – 12.
17. Cerit H. Sex identification in avian species using DNA typing methods / H.Cerit, K.Avanus // World's Poultry Science Journal – 2007. – V. 63. – P. 91 – 99.
18. Ellegren H. Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z or W? / Hans Ellegren // EMBO – 2001. – V. 2. – P. 192 – 196.
19. A DNA test to sex most birds / R. Griffiths, M.C.Double, K.Orr [et al.] // Molecular Ecology. – 1998. – V. 7. – P. 1071 – 1075.
20. Kahn N.W. Chromosome-specific Intron Size Differences in the Avian CHD Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds / N.W.Kahn, J.ST.John, T.W.Quinn // The Auk – 1998. – V. 115 (4). – P. 1074 – 1078.
21. Garcia-Moreno J. Rooting a Phylogeny with Homologous Genes on Opposite Sex Chromosomes (Gametologs): A Case Study Using Avian CHD / J.Garcia-Moreno, D.Mindell // Mol. Biol. Evol. – 2000. – 17(12). – P. 1826 – 1832.
22. Cerit H. Sex Determination by CHDW and CHDZ Genes of Avian Sex Chromosomes in Nymphicus hollandicus / H.Cerit, K.Avanus // Turk. J.Vet. Anim. Sci. – 2007. – V. 31 (6). – P. 371 – 374.