

# Генетико-популяційний аналіз ліній курей української селекції за локусом IGF-I

**Анотація.** Встановлено високу варіабельність локусу IGF-I у популяціях курей яєчного і яєчно-м'ясного напрямів продуктивності. У популяції яєчних курей переважали гомозиготні за алелем C<sub>2</sub> (PstI) і C (HinfI) особини, для яєчно-м'ясних відмічено найвищий рівень генетичної мінливості. Одержані результати свідчать про доцільність вивчення зв'язку алельних варіантів IGF-I із продуктивними ознаками курей.

**Ключові слова:** ПЛР-ПДРФ, локус IGF-I, поліморфізм, породи курей, напрямки продуктивності.

**Genetic population assay of Ukrainian selection chicken lines for the IGF-I locus.** ROMAN KULIBABA, YURIJ LIASHENKO (State Poultry Research Station of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Birky, Ukraine).

**Abstract.** The high variability of locus IGF-I in chicken's populations of egg and egg-meat direction of productivity was established. In the population of egg chickens homozygous individuals for the allele C<sub>2</sub> (PstI) and C (HinfI) dominated, for egg-meat chickens it was marked the highest level of genetic variability. Obtained results indicate the feasibility of the investigation of IGF-I allelic variants in connection with productive features in chickens.

**Key words:** PCR-RFLP, IGF-I locus, polymorphism, chickens breeds, direction of productivity.



**Р. КУЛІБАБА, Ю. ЛЯШЕНКО,**  
кандидати с.-г. наук  
Державна дослідна станція  
птахівництва НААН

Інтенсивний розвиток птахівництва потребує використання високопродуктивних порід і гібридів сільськогосподарської птиці. Традиційні методи добору за фенотипом, безумовно, залишаються основою селекційної роботи, однак потребують багато зусиль і часу, а інколи просто безсилі у вирішенні проблемних

питань, зокрема пов'язаних з резистентністю сучасних порід курей. Використання молекулярно-генетичних маркерів у селекційному процесі можна вважати революційним проривом, який дає змогу проводити добір на рівні бажаних генотипів за комплексом заданих ознак. Вже накопичено чималий досвід застосування різних сучасних методів ДНК-діагностики для вивчення поліморфізму цільових генів, які безпосередньо впливають на ріст і розвиток організму, а, отже, і на рівень основних показників продуктивності птиці [2, 3]. Дослідження нуклеотидної мінливості (мутацій) в

різних ділянках генів з наступним вивченням зв'язку їх алельних варіантів з продуктивними ознаками - основою проведення подальшої спрямованої селекції.

Найпростішим ефективним методом виявлення такого поліморфізму є ПЛР-ПДРФ (поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів на основі полімеразної ланцюгової реакції). Одним з перспективних для дослідження генів вважається IGF-I, що належить до родини інсуліноподібних ростових факторів [6]. Його функціонування пов'язують з такими кількісними ознаками у курей як маса яйця, тушки, жирністю м'яса. Ген інсуліноподібного ростового фактору-I містить 4 екзони й 3 інтрони, загальна довжина ~ 797 п.н., розташований в 1 хромосомі. Кодує білок довжиною ~ 153 а.з.

Поліморфізм локусу інсуліноподібного ростового фактору-I у популяціях курей різних порід досить широко вивчений. Показано зв'язок різних алельних варіантів IGF-I з показниками м'ясної і яєчної продуктивності [4, 11]. Виявлено бажані для потреб



селекції, алелі. Так, у роботі Li et al. показано, що *PstI*-поліморфізм в 5'UTR IGF-I пов'язаний з показниками яєчної та м'ясної продуктивності птиці [9, 10]. Особини генотипу  $C_2C_2$  характеризуються більшою яєчною продуктивністю за 300 й 400 діб. Водночас особини генотипу  $C_1C_1$  мають більші значення живої маси. Також і у роботі Kim M.H. et al. показано більшу яєчну продуктивність особин генотипу  $C_2C_2$  порівняно з  $C_1C_1$  на прикладі корейських нативних популяцій [7].

Не залишили без уваги й курей української селекції. Проведені співробітниками ДДСП НААН дослідження виявили зв'язок *PstI*-поліморфізму в 5'UTR гену IGF-I з показниками маси внутрішнього жиру в курей породи полтавська глиняста, тоді як за показниками яєчної продуктивності достовірних відмінностей не встановлено [8].

Відносно *HinfI*-поліморфізму в промоторі IGF-I у роботі Мое Н.Н. et al. показано, що даний поліморфізм пов'язаний, передусім, з м'ясними якостями курей [12]. Так, наприклад, генотип AA корелює з підвищеною живою масою птиці. Проведені дослідження генетичної структури популяцій курей різних порід за

*HinfI*-поліморфізмом у промоторі IGF-I показали, що в бройлерів даний локус є мономорфним (у наявності лише особини генотипу AA). У той же час у переважній більшості яєчних курей картина прямо протилежна – у популяціях переважають особини з генотипом CC. Представники білого леггорну й білого плімутроку займають проміжне положення – у популяціях зустрічаються особини всіх можливих генотипів.

Все зазначене підтверджує перспективність вивчення поліморфізму локусу інсуліноподібного ростового фактору-I для потреб вітчизняного птахівництва. Дійсно, проведення генетико-популяційного аналізу ліній курей української селекції створює всі передумови для вивчення зв'язку алельних варіантів IGF-I із продуктивними ознаками курей і для одержання мікроліній з відомими генотипами, тобто безпосередньо покладено в основу маркер-асоційованої селекції.

### Тому метою наших досліджень було вивчення генетичної структури популяцій курей яєчного й м'ясо-яєчного напрямів продуктивності за локусом IGF-I.

Експерименти проводили в лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Державної дослідної станції птахівництва Національної академії аграрних наук України.

Для проведення досліджень використані кури яєчного напрямку продуктивності – лінія А породи Бірківська барвіста (n=100) і кури яєчно-м'ясного напрямку продуктивності – лінія 38 породи Род-айленд червоний (n=100). Курей утримували у віварії лабораторії в 2014 (Бірківська барвіста) і 2015 роках (Род-айленд червоний).

Як джерело ДНК використовували кров птиці. Кров відбирали із гребеня за допомогою скарифікатора на стерильний фільтрувальний папір. Кожен зразок підсушували, маркували та індивідуально пакували для запобігання контамінації. Виділення ДНК із дослідних зразків проводили з використанням комерційного набору реагентів «ДНК-сорб-В» («Амплісенс», Росія). Ефективність виділення ДНК визначали за допомогою електрофорезу в 0,7 % агарозному гелі при 200 V протягом 5 хв.

Варіабельність гена інсуліноподібного ростового фактору-I вивчали за *PstI*-поліморфізмом в 5'UTR фрагменті та за *HinfI*-поліморфізмом у промоторній ділянці гена. Для проведення ампліфікації використовували наступні олігонуклеотиди: у випадку з *PstI*-поліморфізмом (IGFI-*PstI*) – gactatacagaagaaccac та taccactcaagtggctcaagt [5]; у випадку з *HinfI*-поліморфізмом (IGFI-*HinfI*) – cattgcgcaggctctatctg та tcaagagaagcccttca [7].

ПЛР проводили за допомогою реагентів DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific) з використанням програмувального термоциклера «Терцик» («ДНК-

технологія», Росія) за відповідними програмами: 1 цикл – денатурація 94°C 5 хв; 35 циклів – денатурація 94°C 45 с, відпал (53°C *IGFI-PstI* і 55°C *IGFI-HinfI*), елонгація 72°C 60 с; 1 цикл – фінальна елонгація 72°C 10 хв. Об'єм реакційної суміші - 20  $\mu$ L, концентрація праймерів – 0,2  $\mu$ M в обох випадках відповідно.

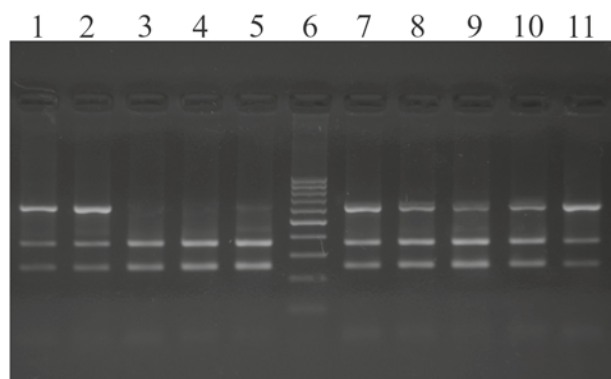
Обробку ампліфікованих фрагментів ендонуклеазами рестрикції проводили відповідно до інструкцій виробника (FastDigest, Thermo Scientific). Продукти рестрикції розділяли в 1,5 % агарозному гелі за напруги 150 V протягом 40 хв. Візуалізацію проводили з використанням бромистого етидію в ультрафіолетовому спектрі. Розмір фрагментів визначали з використанням маркерів молекулярних мас M-50 і M-100. Генотипування особин за кожним із локусів проводили за допомогою співставлення довжин ампліфікованих/рестрикційних фрагментів на електрофореграмах.

На основі одержаних даних розраховували фактичний (O) і теоретичний (E) розподіл генотипів, частоти алелів, відповідність генетичній рівновазі популяції за Харді-Вайнбергом методом  $\chi^2$ , фактичну (Ho) і теоретичну (He) гетерозиготність, ефективне число алелів ( $n_e$ ), індекс фіксації Райта (Fis) – відповідно до загальноприйнятих методик [1].

**Результати досліджень.** Використання рестрикційного аналізу дало змогу виявити варіабельність локусу інсуліноподібного ростового фактора-I у досліджених популяціях курей.

Транзиція цитозину в тимін у сайті для *PstI* приводить до виникнення двох алельних варіантів гена:  $C_1$  – *PstI*- (621 п.н.) та  $C_2$  – *PstI*+ (257 і 364 п.н.). Кодування алелів визначається кількістю залишків цитозину в сайті рестрикції для *PstI*.

На рис. 1 представлена електрофореграма продуктів рестрикції 5'UTR фрагмента *IGF-I*.



**Рис. 1. Електрофореграма продуктів рестрикції 5'UTR фрагмента *IGF-I*.**

1, 2, 7-11 –  $C_1C_2$ ; 3-5 –  $C_2C_2$ ; 6 – маркер молекулярних мас M-100.

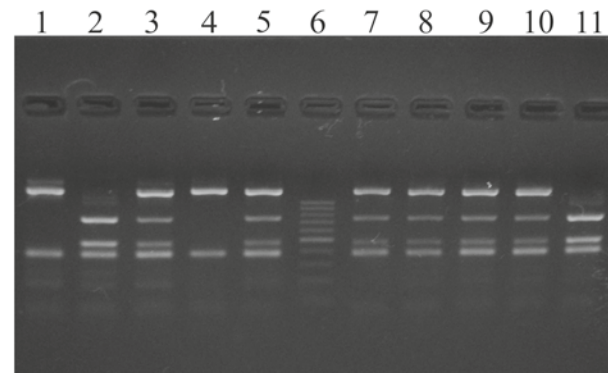
Генотип  $C_2C_2$  представлений на електрофореграмі у вигляді фрагментів розміром 257 і 364 п.н.;  $C_1C_2$  – 621, 257 та 364 п.н. відповідно. У результаті проведених

досліджень показано, що за *PstI*-поліморфізмом локус *IGF-I* в обох досліджених популяціях виявився поліморфним.

У кожній лінії в наявності особини трьох можливих генотипів –  $C_1C_1$ ,  $C_1C_2$  та  $C_2C_2$ .

*HinfI*-поліморфізм у промоторній ділянці *IGF-I* приводить до виникнення двох алелів: С – *HinfI*- (622 та 191 п.н.) і А – *HinfI*+ (378, 244 та 191 п.н.). На відміну від попереднього випадку кожний з алелів додатково містить мономорфний сайт рестрикції для *HinfI* (191 п.н.).

На рис. 2 представлена електрофореграма продуктів рестрикції промоторного фрагменту *IGF-I*.



**Рис. 2. Електрофореграма продуктів рестрикції промоторного фрагменту *IGF-I*.**

1, 4 – CC; 2, 11 – AA; 3, 5, 7-10 – AC; 6 – маркер молекулярних мас M-50.

Генотип CC представлений на електрофореграмі у вигляді фрагментів розміром 622 та 191 п.н.; AA – 378, 244 та 191 п.н.; AC – 622, 378, 244 та 191 п.н. відповідно. За *HinfI*-поліморфізмом локус *IGF-I* також виявився поліморфним. В обох популяціях зустрічаються особини всіх можливих генотипів – AA, AC та CC.

Генетична структура досліджених популяцій курей за обома поліморфними сайтами представлена в табл.1.

За співвідношенням частот алелів *IGF-I* у випадку з *PstI*-поліморфізмом розбіжності між популяціями не істотні, тоді як при *HinfI*-поліморфізмі – достовірні ( $p < 0,01$ ). Для *PstI*-поліморфізму характерно в обох популяціях перевага гомозиготних за алелем  $C_2$  особин за практично однакової частоти гетерозигот (0,32 і 0,33). За *HinfI*-поліморфізмом картина дещо інша. Для яєчно-м'ясних курей характерна більша кількість гетерозиготних особин, наомість у популяції яєчних курей вочевидь переважають гомозиготи CC (табл. 1).

За *PstI*-поліморфізмом у популяції курей породи Род-айленд червоний виявлене відхилення від стану генетичної рівноваги, що вказує на можливий тиск відбору або дрейф генів. Генетична структура даної популяції досить схожа з популяцією курей породи Полтавська глиняста, котра також відноситься до яєчно-м'ясного напрямку продуктивності [8]. Слід

## Генетична структура популяцій курей порід Бірківська барвиста і Род-айленд (2014-2015 роки)

Поліморфізм	Породи курей					
	Бірківська барвиста			Род-айленд червоний		
	генотип, його частота	частоти алелів	$\chi^2$	генотип, його частота	частоти алелів	$\chi^2$
<i>PstI</i> -поліморфізм в 5'UTR	$C_1C_1 - 0,11; C_1C_2 - 0,32; C_2C_2 - 0,57$	$C_1 - 0,27; C_2 - 0,73$	3,54	$C_1C_1 - 0,19; C_1C_2 - 0,33; C_2C_2 - 0,48$	$C_1 - 0,35; C_2 - 0,65$	7,46
<i>Hinfl</i> -поліморфізм в промоторі	$AA - 0,07; AC - 0,40; CC - 0,53$	$A - 0,27; C - 0,73$	0,01	$AA - 0,15; AC - 0,54; CC - 0,31$	$A - 0,42; C - 0,58$	1,21

Таблиця 2

## Популяційно-генетичні характеристики популяцій курей порід Бірківська барвиста та Род-айленд червоний за локусом IGF-I

Порода курей	Поліморфізм	Ho	He	Fis	$n_e$
Бірківська барвиста	<i>PstI</i> -поліморфізм в 5'UTR	0,32	0,39	0,18	1,64
	<i>Hinfl</i> - поліморфізм у промоторі	0,40	0,39	-0,03	1,64
Род-айленд червоний	<i>PstI</i> - поліморфізм в 5'UTR	0,33	0,46	0,28	1,85
	<i>Hinfl</i> - поліморфізм у промоторі	0,54	0,49	-0,1	1,96

також зазначити цікавий факт практичного збігу значень частот алелів для обох поліморфізмів у популяції курей породи Бірківська барвиста (табл. 1).

Основні генетико-популяційні характеристики дослідних ліній курей представлені в табл. 2.

За кожним із поліморфізмів більш високий рівень гетерозиготності спостерігався в популяції курей породи Род-айленд червоний. Найбільший рівень генетичної мінливості (ефективне число алелів) також виявлені в популяції яєчно-м'ясних курей за *Hinfl*-поліморфізмом в промоторі IGF-I ( $n_e=1,91$ ), найменший – у популяції яєчних курей (табл. 2). За *PstI*- поліморфізмом в 5'UTR виявлено виражений ексцес гомозиготних особин, що корелює з фактом порушення генетичної рівноваги у дослідженій популяції.

Порівняно із закордонними популяціями курей, за співвідношенням частот алелів дослідні лінії курей вітчизняної селекції займають проміжне положення між птицею яєчного та м'ясного напрямів продуктивності, що наближає їх до нативних (аборигенних) популяцій інших країн [12].

Отже, кожна з вивчених популяцій курей має необ-

хідний рівень генетичної мінливості за локусом IGF-I для можливості проведення подальшої селекційної роботи з метою одержання особин з відомими генотипами та їх комплексами. Досліджені породи курей представляють інтерес як потенційний вихідний матеріал для покращення продуктивних якостей. Для практичного використання одержаних результатів наступним кроком досліджень має бути встановлення зв'язків алельних варіантів IGF-I (*PstI*- і *Hinfl*-поліморфізми) з основними кількісними ознаками курей, які визначають яєчну та м'ясну продуктивність. Такі попередні результати дають підстави вважати ген інсуліноподібного ростового фактора-I одним із тих, що має входити до комплексу генів, необхідних для конструювання бажаних гаплотипів птиці за комплексом заданих ознак.

**Висновки.**

1. Встановлено високу варіабельність локусу інсуліноподібного ростового фактора-I за *PstI*- та *Hinfl*-поліморфізмом в обох досліджених популяціях курей.

2. Найвищий рівень генетичної мінливості виявлено для популяції курей яєчно-м'ясного напряму продук-

тивності ( $H_e=0,44-0,49$ ) з максимальною кількістю гетерозиготних особин за *HinfI*-поліморфізмом (A/C=0,54).

3. У популяції курей яєчного напрямку продуктивності переважали гомозиготні за алелем  $C_2$  (*PstI*) і *C* (*HinfI*) особини.

4. Порушення генетичної рівноваги в розподілі генотипів у бік ексцесу гомозиготних особин виявлено лише для популяції яєчно-м'ясного напрямку продуктивності за *PstI*-поліморфізмом, що може бути зумовлено впливом добору або дрейфом генів.

5. Генетико-популяційний аналіз ліній курей української селекції дає всі передумови для вивчення зв'язку аельних варіантів IGF-I із продуктивними ознаками курей з перспективою подальшого використання в маркер-асоційованій селекції.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Меркурьева Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве. – М.: Колос, 1977. – 240с.
2. Amills M., Jimenez N., Villalba D. et al. Identification of Three Single Nucleotide Polymorphisms in the Chicken Insulin-Like Growth Factor 1 and 2 Genes and Their Associations with Growth and Feeding Traits // *Poultry Science*. – 2003. – Vol. 82. – P. 1485–1493.
3. Bennet A.K., Hester P.Y., Spurlock D.E.M. Polymorphisms in vitamin D receptor, osteopontin, insulin-like growth factor 1 and insulin, and their associations with bone, egg and growth traits in a layer – broiler cross in chickens // *Animal genetics*. – 2006. – Vol. 37. – P. 283–286.
1. Kadlec J., Hosnedlova B., Rehout V. et al. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism and its association with growth and slaughter characteristics in broiler chickens // *Journal of Agrobiology*. – 2011. – Vol. 28 (2). – P. 157–163.
4. Kajimoto Y., Rotwein P. Structure of the chicken insulin-like growth factor I gene reveals conserved promoter elements // *The journal of biological chemistry*. – 1991. – Vol. 266 (№15). – P. 9724–9731.
5. Khadem A., Hafezian H., Rahimi-Mianji G. Association of single nucleotide polymorphisms in IGF-I, IGF-II and IGFBP-II with production traits in breeder hens of Mazandaran native fowls breeding station // *African Journal of Biotechnology*. – 2010. – V. 9 (6). – P. 805–810.
6. Kim M.H., Seo D.S., Ko Y. Relationship between egg productivity and insulin-like growth factor-I genotypes in Korean native ogor chickens // *Poultry Science*. – 2004. – V. 83. – P. 1203–1208.
7. Kulibaba R.A., Tereshchenko A.V. Transforming growth factor  $\beta 1$ , pituitary-specific transcriptional factor 1 and insulin-like growth factor I gene polymorphisms in the population of the Poltava clay chicken breed: association with productive traits // *Agricultural Science and Practice*. – 2015. – Vol. 2 (1). – P. 67–72.
8. Li H. F., Zhu W.Q., Chen K.W. Polymorphism in NPY and IGF-I genes associate with reproductive traits in Wenchang chicken // *African Journal of Biotechnology*. – 2009. – V. 8 (19). – P. 4744–4748.
9. Li H., Zhu W., Chen K. et al. Associations between GHR and IGF-I gene polymorphisms, and reproductive traits in Wenchang chickens // *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* – 2008. – Vol. 32 (4). – P. 281–285.
10. Li W. IGF-I gene polymorphism and weight-related analysis // *International journal of biology*. – 2009. – V. 1, No 2. – P. 113–118.
11. Moe H.H., Shimogiri T., Kawabe K. et al. Genotypic frequency in Asian native chicken populations and gene expression using insulin-like growth factor I (IGF1) gene promoter polymorphism // *J. Poult. Sci.* – 2009. – Vol. 46. – P. 1–5.

