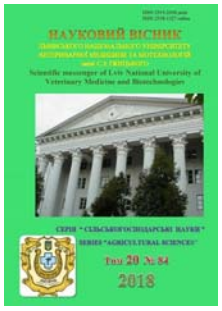

Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького

Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2519–2698 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.15421/nvlvet8412
http://nvlvet.com.ua/

UDC 636.52/.58:575.113/.118

Morphological features of eggs depending on the chicken genotype by mutations T+3737C and A+3971G in insulin locus

L.V. Shulika

Institute of animal science NAAS, Kulinichi, Ukraine

Article info

Received 06.01.2018
Received in revised form 28.02.2018
Accepted 05.03.2018

Institute of animal science NAAS, 7th Guards Army str., 3, p.d. Kulinichi, Kharkiv region, 62404, Ukraine.
Tel.:+38-093-335-26-70
E-mail: shulika.lyubov.vl@gmail.com

Shulika, L.V. (2018). Morphological features of eggs depending on the chicken genotype by mutations T+3737C and A+3971G in insulin locus. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. 20(84), 65–69. doi: 10.15421/nvlvet8412

Quality of eggs, including morphological features, affect on their dietary properties, incubatory and trade characteristics. This gives background to affirm necessity of selection work in direction of improving these features additionally to chicken egg-laying qualities. But selection by complex of traits requires long time and significant resources. To increase effectiveness and speed up the process of selection molecular genetic markers are used. Such approach is named marker-assisted selection. One of genes, that is of interest in the context of marker-assisted selection, is insulin gene, which product takes part in the regulation of animal metabolism. The gene is polymorphic in chicken, particularly, there were found mutations T+3737C and A+3971G, located within second intron and 3'-UTR-region, respectively. The current work is devoted of studying of morphological features of eggs depending on the genotype by above-mentioned mutations. The research was conducted on the chicken population of line 38 of Rhode Island Red breed. The following features were studied as yolk weight, glair weight, shell weight, yolk percent, shell percent, mean shell thickness, egg form index. Measuring was made on 30th and 52th weeks of layer age. Comparison of groups with different genotypes was conducted using t-criterion or U-criterion depending on the distribution normality. There was no significant associations between genotype by T+3737C mutation and egg morphological features within investigated line. By mutation A+3971G it was shown, that eggs of layers with AA genotype differ significantly ($P \leq 0.05$) from eggs that received from chickens with AG and GG genotypes by egg form index on 30th week. Also, significant ($P \leq 0.01$) association was revealed for yolk percent on 52th week of life and genotype on this mutation. Namely, chickens with AA genotype layed eggs with lower yolk percent than chickens with AG and GG genotypes. Similar situation was observed relatively to yolk weight but difference was reliable ($P \leq 0.05$) only between homozygotes AA and GG. According to the results, it is possible to consider mutation A+3971G as the molecular genetic marker of morphological features of chicken eggs.

Key words: *insulin gene, molecular genetic marker, mutation, chicken, eggs, morphological features, yolk weight.*

Морфологічні якості яєць залежно від генотипу курей за мутаціями T+3737C і A+3971G у локусі інсуліну

Л.В. Шуліка

Інститут тваринництва НААН, смт Кулиничі, Україна

Від якості яєць, в тому числі від морфологічних показників, залежать їх дієтичні властивості, інкубаційні та товарні характеристики. Це дає підстави підтверджувати необхідність селекційної роботи у напрямі поліпшення даних показників додатково до показника несучості курей. Однак селекція за комплексом ознак потребує тривалого часу та значних ресурсів. Для підвищення ефективності та пришвидшення селекційного процесу використовують молекулярно-генетичні маркери. Такий підхід називається маркер-асоційованою селекцією. Одним із генів, який цікавий у розрізі маркер-асоційованої селекції, є ген інсуліну, продукт якого бере участь у регуляції метаболізму тварин. У курей даний ген є поліморфним, зокрема, були виявлені мутації T+3737C і A+3971G, розташовані відповідно у другому інтроні та 3'-UTR-області. Поточна робота присвячена вивченню залежності морфологічних якостей яєць від генотипу за вищезгаданими мутаціями. Дослідження проводили на популяції курей лінії 38 породи Род-айленд

червоний. Вивчали такі показники, як маса жовтка, маса білка, маса шкаралупи, відсоток жовтка, відсоток шкаралупи, середня товщина шкаралупи, індекс форми яйця. Вимірювання здійснювали на 30-й і 52-й тижні життя несучки. Порівняння груп із різними генотипами проводили за t-критерієм або U-критерієм залежно від нормальності розподілу даних. За мутацією T+3737C достовірних асоціацій між генотипом та морфологічними якостями яєць у межах дослідної лінії не було виявлено. За мутацією A+3971G показано, що яйця несучок з генотипом AA достовірно ($P \leq 0,05$) відрізняються від яєць, отриманих від курей з генотипами AG і GG за показником індексу форми яйця на 30-й тиждень життя. Окрім того, виявлено достовірну ($P \leq 0,01$) залежність відсоткового співвідношення жовтка на 52-й тиждень життя від генотипу за цією ж мутацією, а саме: кури з генотипом AA несли яйця з нижчим відсотком жовтка, ніж кури з генотипами AG і GG. Подібна ситуація спостерігалась і відносно маси жовтка, проте різниця була достовірною ($P \leq 0,05$) лише між гомозиготами AA і GG. Відповідно до результатів мутацію A+3971G у гені інсуліну можна розглядати як молекулярно-генетичний маркер морфологічних якостей курячих яєць.

Ключові слова: *ген інсуліну, молекулярно-генетичний маркер, мутація, кури, яйця, морфологічні якості, маса жовтка.*

Вступ

Курячі яйця є дієтичним продуктом харчування та джерелом повноцінного білка та ліпідів. Яєчна продукція майже не має альтернативи, якщо враховувати її порівняно невисоку вартість (Katerynych et al., 2017). Виробництво продукції птахівництва залишається стабільно високим, більше того, у найближчі роки FAO прогнозує його ріст (OECD-FAO, 2017). Споживацькі уподобання і пріоритети з кожним роком змінюються все швидше; вимоги споживача до якості продуктів постійно підвищуються (Sostojanie vsemirnyh geneticheskih …, 2010). Окрім того, від якості яєць залежать їх дієтичні, товарні, а також інкубаційні характеристики. Також варто враховувати наявність негативних кореляцій між підвищеною несучістю та морфологічними якостями яєць (Kushner and Kopylovskaja, 1969). Все вищезазначене засвідчує необхідність контролю за показниками якості яєць додатково до показника несучості для забезпечення максимальної реалізації яєчної продуктивності курей.

Слід враховувати, що ретельна селекційна робота, особливо за комплексом ознак, потребує тривалого часу. Наразі розвиток молекулярно-генетичних методів зумовив появу нових підходів із залученням ДНК-технологій, що в комбінації з класичними методами дають можливість значно пришвидшити селекцію (Kulibaba and Podstreshnyi, 2012). Серед таких підходів – маркер-асоційована селекція (Marker-Assisted Selection, MAS), суть якої полягає у використанні ДНК-маркерів – поліморфних ділянок ДНК, що так чи інакше пов'язані з продуктивними або іншими ознаками тварин (Fulton, 2008). При цьому найбільшу увагу приділяють функціональному поліморфізму в межах генів, які беруть участь у контролі біохімічних та фізіологічних процесів, що впливають на ці ознаки (Zinov'eva et al., 2008). Одним із таким генів є ген інсуліну.

Ген інсуліну (*INS*) розташований на хромосомі 5, має три екзони і два інтрони (Xu et al., 2013). Його продукт – гормон інсулін – впливає на обмін вуглеводів, ліпідів і білків; виявляє стимулюючу дію на ріст і поділ клітин та супресивну – на апоптоз (Dupont et al., 2009). Таким чином, *INS* діє на організм птиці плейотропно. Показано, що ген інсуліну поліморфний у деяких порід курей (Khoa et al., 2013), зокрема було виявлено декілька точкових мутацій, які можна визначати відносно недорогим та високовідтворюваним методом ПЛР-ПДРФ (Nie et al., 2005). Раніше дослідники показали зв'язок алельних варіантів локусу INS з м'ясною продуктивністю курей (Qiu et al., 2006). Водночас, завдяки плейотропній дії гену інсуліну існує можливість його впливу й на показники якості яєць. Для поточного дослідження було обрано дві транзиції – T+3737C і A+3971G, локалізовані у другому інтроні та 3'-UTR-області гену інсуліну, відповідно.

Виходячи з цього, мета даної роботи – аналіз асоціацій мутацій T+3737C і A+3971G у гені інсуліну з морфологічними показниками яєць курей лінії 38 породи Род-айленд червоний. Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні завдання: визначити генотипи несучок дослідної групи за мутаціями T+3737C і A+3971G у локусі інсуліну; оцінити основні показники морфологічних якостей яєць курей на 30-й і 52-й тижні життя несучок; порівняти вибірки курей з різними генотипами за показниками морфологічних якостей яєць та оцінити достовірність відмінностей статистичними методами.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження виконували на популяції курей, що належать до лінії 38 породи Род-айленд червоний (синтетична лінія вітчизняної селекції, яєчно-м'ясного напряму продуктивності). Кури утримувались за стандартною технологією в однакових умовах. Щоб отримати дані від кожної особини окремо і таким чином пов'язати особливості фенотипу з генотипом, курей утримували в індивідуальних клітках. Морфологічні якості яєць оцінювали загальноприйнятими методами на 30 та 52 тиждень життя несучок (Carenko, 1988). Вивчали наступні показники: масу жовтка, масу білка, масу шкаралупи, відсоток жовтка, відсоток шкаралупи, середню товщину шкаралупи, індекс форми яйця.

Зразки біологічного матеріалу (кров/перо) відбирали індивідуально від кожної особини, маркували і пакували окремо для запобігання перехресній контамінації проб ДНК із зразків екстрагували комерційним набором «ДНК-Сорб В» (AmpliSens, RF) за протоколом виробника. Генотипи несучок визначали методом ПЛР-ПДРФ (Полімеразна Ланцюгова Реакція – Поліморфізм Довжин Рестрикційних Фрагментів). При цьому для постановки ПЛР використовували такі олігонуклеотиди: T+3737C – forward 5'-ctccatgtggcttccctgta-3', reverse 5'-ggcttcttggctagttgcagt-3'; A+3971G – forward 5'-ggtatctgaaaagcgggtctc-3', reverse 5'-aatgctttgaaggtgcgatag-3' (Qiu et al., 2006). Програма

ампліфікації: 94 °С/5 хв; 35 циклів – 94 °С/30 с, 58 °С/60 с, 72 °С/60 с; 72 °С/10 хв.

Рестрикцію ампліфікованих фрагментів для обох мутацій здійснювали з використанням рестриктази MspI (SibEnzyme, RF) згідно з рекомендаціями виробника. Рестрикційні фрагменти розподіляли в 1,5–3% агарозних гелях з додаванням бромистого етидію як барвника.

Статистична обробка даних була виконана загальноприйнятими методами у середовищі програми Statistica 8.0 (StatSoft) з урахуванням рекомендацій Меркур'євої (Merkur'eva, 1977) та Ребрової (Rebrova, 2002). Так, спочатку оцінювали розподіл даних на нормальність, використовуючи критерій Шапіро-Уілка. Залежно від результату групи курей з різними генотипами порівнювали або за t-критерієм Стьюдента (нормальний розподіл), або за U-критерієм Манна-Уітні (якщо розподіл не відповідав нормальному). Різницю між групами вважали достовірною при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У результаті визначення генотипів за досліджуваними мутаціями у локусі інсуліну в обох випадках у дослідній популяції були виявлені всі три можливі генотипи. Для мутації T+3737C це генотипи CC, CT і TT, для A+3971G – AA, AG та GG. За кожним із генотипів виявлено достатнє число особин, що дозволяє коректно провести порівняння для всіх трьох генотипів як у випадку T+3737C, так і для A+3971G.

Результати порівняння морфологічних якостей яєць для груп із різними генотипами за мутацією T+3737C локусу інсуліну у віці 30 і 52 тижнів життя наведені у таблицях 1 і 2.

Як видно з таблиць, достовірних відмінностей між генотипами за мутацією T+3737C в межах лінії 38 не було виявлено. Єдину тенденцію (на рівні $P \leq 0,1$), яку було відмічено – більш висока маса та відсоткове співвідношення шкаралупи на 52-й тиждень життя у гомозигот TT порівняно з полярними гомозиготами CC (на 0,7 г і 0,9% відповідно).

Таблиця 1

Морфологічні якості яєць несучок лінії 38 у віці 30 тижнів залежно від генотипу за мутацією T+3737C у гені інсуліну (M ± m)

Показник	Генотип		
	CC (n = 35)	CT (n = 33)	TT (n = 14)
Маса жовтка, г	14,3 ± 0,15	14,3 ± 0,25	14,6 ± 0,28
Маса білка, г	34,9 ± 0,71	34,8 ± 0,57	34,6 ± 1,09
Маса шкаралупи, г	7,6 ± 0,16	7,8 ± 0,20	7,9 ± 0,32
% жовтка	25,4 ± 0,30	25,2 ± 0,30	25,7 ± 0,72
% шкаралупи	13,4 ± 0,25	13,7 ± 0,30	13,8 ± 0,53
Товщина шкаралупи, мкм	32,5 ± 0,43	32,8 ± 0,35	32,0 ± 0,54
Індекс форми яйця, %	78,5 ± 0,45	78,3 ± 0,36	79,0 ± 0,70

Таблиця 2

Морфологічні якості яєць несучок лінії 38 у віці 52 тижні залежно від генотипу за мутацією T+3737C у гені інсуліну (M ± m)

Показник	Генотип		
	CC (n = 32)	CT (n = 33)	TT (n = 14)
Маса жовтка, г	17,6 ± 0,21	17,7 ± 0,30	17,0 ± 0,45
Маса білка, г	36,9 ± 0,62	37,1 ± 0,63	37,8 ± 1,63
Маса шкаралупи, г	7,3 ± 0,17	7,4 ± 0,17	8,0 ± 0,37
% жовтка	28,5 ± 0,30	28,5 ± 0,33	27,3 ± 0,82
% шкаралупи	11,8 ± 0,23	11,9 ± 0,19	12,7 ± 0,59
Товщина шкаралупи, мкм	30,6 ± 0,51	31,1 ± 0,43	30,6 ± 0,79
Індекс форми яйця, %	76,3 ± 0,40	76,4 ± 0,33	77,5 ± 0,64

Таблиця 3

Морфологічні якості яєць несучок лінії 38 у віці 30 тижнів залежно від генотипу за мутацією A+3971G у гені інсуліну (M ± m)

Показник	Генотип		
	AA (n = 6)	AG (n = 28)	GG (n = 48)
Маса жовтка, г	14,2 ± 0,36	14,4 ± 0,29	14,4 ± 0,13
Маса білка, г	36,0 ± 1,36	34,7 ± 0,74	34,7 ± 0,55
Маса шкаралупи, г	7,7 ± 0,36	7,9 ± 0,23	7,6 ± 0,15
% жовтка	24,6 ± 1,06	25,3 ± 0,41	25,5 ± 0,24
% шкаралупи	13,2 ± 0,33	13,9 ± 0,37	13,4 ± 0,22
Товщина шкаралупи, мкм	32,3 ± 0,54	32,4 ± 0,41	32,7 ± 0,34
Індекс форми яйця, %	80,3 ± 0,63[a]	78,5 ± 0,42[b]	78,3 ± 0,36[b]

Примітка: достовірність різниці між a і b на рівні $P \leq 0,05$

Таблиця 4

Морфологічні якості яєць несучок лінії 38 у віці 52 тижні у залежності від генотипу за мутацією A+3971G у гені інсуліну (M ± m)

Показник	Генотип		
	AA (n = 7)	AG (n = 29)	GG (n = 43)
Маса жовтка, г	16,1 ± 0,52[a]	17,8 ± 0,36	17,6 ± 0,17[b]
Маса білка, г	37,9 ± 1,78	37,3 ± 0,79	36,9 ± 0,60
Маса шкаралупи, г	7,4 ± 0,39	7,8 ± 0,21	7,3 ± 0,15
% жовтка	26,3 ± 0,71[c]	28,3 ± 0,44[d]	28,6 ± 0,27[e]
% шкаралупи	12,1 ± 0,33	12,4 ± 0,32	11,7 ± 0,19
Товщина шкаралупи, мкм	31,0 ± 1,32	31,5 ± 0,46	30,3 ± 0,41
Індекс форми яйця, %	78,4 ± 1,06	76,4 ± 0,34	76,3 ± 0,33

Примітка: достовірність різниці між a і b, c і e на рівні P ≤ 0,01; між c і d – на рівні P ≤ 0,05

Дані стосовно асоціацій різних генотипів за мутацією A+3971G у локусі інсуліну та показників морфологічних якостей яєць на 30-й і 52-й тиждень життя наведено у таблицях 3 і 4 відповідно.

У віці 30 тижнів достовірну різницю між генотипами за мутацією A+3971G було виявлено лише для показника індексу форми яйця. За цим показником гомозиготи AA в середньому характеризувались вищими значеннями як у порівнянні з гетерозиготами, так і відносно групи особин з генотипом GG на 1,8 та 2,0 одиниці відповідно. Варто зазначити, що на 52-й тиждень різниця між генотипом AA й іншими двома генотипами за даним показником, хоча і становила 2 і 2,1 одиниці, проте значення P перебувало в межах 0,06–0,09, що не дозволило вважати зазначені розбіжності достовірними. В даному випадку можна говорити лише про тенденцію. На отриманий ступінь достовірності могло вплинути невелике число особин у групі з генотипом AA.

За масою та відсотковим відношенням жовтка спостерігалась зворотна ситуація: на 30-й тиждень різниця між генотипами за мутацією A+3971G не була виражена, але на 52-й тиждень відмінності стають достовірними, при цьому розбіжності більш виражені між полярними гетерозиготами (рис. 1).

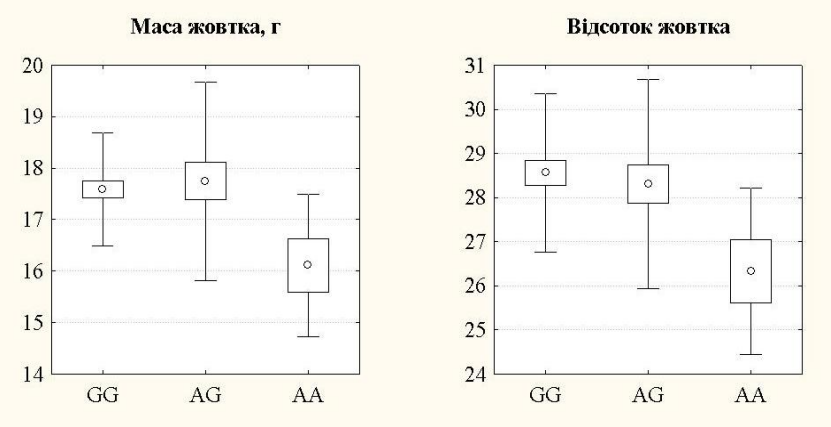

Рис. 1. Зв'язок між генотипом за мутацією A+3971G та показниками маси і відсотка жовтка на 52-й тиждень життя несучки

Маса жовтка була нижчою у особин з генотипом AA – у середньому на 1,7 г порівняно з гетерозиготами та на 1,5 г відносно групи особин з генотипом GG, хоча у випадку порівняння AA з AG показник p дорівнює 0,07, що вказує лише на тенденцію. Щодо показника «відсоток жовтка», тут розбіжності були достовірними і між AA та AG, і між AA та GG та становили в середньому відповідно 2,0 і 2,3%.

Отримані результати свідчать про позитивний вплив алеля G на масу та відсоткове співвідношення жовтка у яйці. Алель G умовно можна назвати «домінантним», оскільки у даному випадку різниця між особинами з генотипом GG або AG чітко не виражена, тобто для бажаного фенотипічного прояву достатньо однієї копії алеля G. Водночас генотип AA можна розглядати як небажаний стосовно прояву ознак, які розглядаються.

Отже, у поточному дослідженні вперше було показано залежність таких показників якості яєць, як маса і відсоткове співвідношення жовтка в курячих яйцях від генотипу несучок за мутацією A+3971G в локусі інсуліну. Хоча дана мутація не призводить до заміни амінокислотного залишку в послідовності інсуліну, вона розташована в межах функціональної частини гену, що дає підставу висловити припущення про можливий вплив на його експресію. Таким чином, мутацію A+3971G у гені інсуліну можна розглядати як маркер морфологічних якостей яєць курей. Результати дослідження пропонується застосовувати у селекційних програмах з підвищення яєчної продуктивно-

сті курей лінії 38 породи Род-айленд червоний та враховувати у племінній роботі з даною лінією.

Висновки

Вперше досліджено асоціації між морфологічними якостями курячих яєць та генотипом за мутаціями T+3737C та A+3971G у локусі інсуліну на прикладі лінії вітчизняної селекції. Впливу мутації T+3737C на морфологічні якості курей лінії 38 породи Род-айленд червоний не було виявлено. Для мутації A+3971G виявлено статистично достовірні відмінності між групами курей з різними генотипами відносно показників маси та відсоткового співвідношення жовтка у яйці на 52 тиждень життя несучки.

Пропонується мутацію A+3971G у гені інсуліну розглядати як маркер морфологічних якостей яєць курей та використовувати отримані результати у селекційній роботі з лінією 38 породи Род-айленд червоний для підвищення вмісту жовтку у яйці.

References

Katerynych, O.O., Pankova, S.M., Tereshchenko, O.V., Ruda, S.V., Havilei, O.V., Riabinina, O.V., Muzyka, N.M., & Ionov, I.A. (2017). Vyroshchuvannia, utrymannia ta hodivlia yaiechnykh ta miaso-yaiechnykh kurei. Birky (in Ukrainian).

OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026. (2017). Paris: OECD Publishing. doi: 10.1787/19991142.

Sostojanie vsemirnyh geneticheskih resursov zhivotnyh v sfere prodovol'stvija i sel'skogo hozjajstva. (2010). Moskva: FAO. Rezhim dostupa: http://www.fao.org/docrep/012/a1250r/a1250r00.htm (in Russian).

Kushner, H.F., & Kopylovskaja, G.Ja. (1969). Geneticheskie osnovy selekcii pticy. Moskva: «Kolos» (in Russian).

Kulibaba, R.A. & Podstreshnyi, A.P. (2012). Prolactin and growth hormone gene polymorphisms in chicken lines of Ukrainian selection. Cytology and Genetics. 46(6), 390–395. doi: 10.3103/S0095452712060060.

Fulton, J.E. (2008). Molecular genetics in a modern poultry breeding organization. World's Poultry Science Journal. 64(2), 171–176. doi: 10.1017/S0043933907001778.

Zinov'eva, N.A., Klenovickij, P.M., Gladyr', E.A., & Nikishov, A.A. (2008). Sovremennye metody geneticheskogo kontrolja selekcionnyh processov i sertifikacija plemennogo materiala v zhivotnovodstve. Moskva: RUDN. Rezhim dostupa: http://web-local.rudn.ru/web-local/uem/iop_pdf/90-Nikishov.pdf (in Russian).

Xu, Zh., Nie, Q. & Zhang, X. (2013). Overview of genomic insights into chicken growth traits based on genome-wide association study and microRNA regulation. Current genomics. 14(2), 137–146. doi: 10.2174/1389202911314020006.

Dupont, J., Tesseraud, S., & Simon, J. (2009). Insulin signaling in chicken liver and muscle. General and Comparative Endocrinology. 163(1–2), 52–57. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.10.016.

Khoa, D., Khang, N., Ngu, N., Matey, J., Loan, H.T.P. & Thuy, N.T.D. (2013). Single nucleotide polymorphisms in GH, GHR, GHSR and insulin candidate genes in chicken breeds of Vietnam. Greener J. of Agricultural Sci. 10, 716–724.

Nie, Q., Lei, M., Ouyang, J., Zeng, H., Yang, G., & Zhang, X. (2005). Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. Genet. Sel. Evol. 37(3), 339–360. doi: 10.1051/gse:2005005.

Qiu, F.F., Nie, Q.H., Luo, C.L., Zhang, D.X., Lin, S.M., & Zhang, X.Q. (2006). Association of Single Nucleotide Polymorphisms of the Insulin Gene with Chicken Early Growth and Fat Deposition. Poultry Sci., 85, 980–985. doi: 10.1093/ps/85.6.980.

Carenko, P.P. (1988). Povyshenie kachestva produkcii pticevodstva: pishhevye i inkubacionnye jajca. Leningrad: VO «Agropromizdat» (in Russian).

Merkur'eva, E.K. (1977). Geneticheskie osnovy selekcii v skotovodstve. Moscow: Kolos (in Russian).

Rebrova, O.Ju. (2002). Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA. Moskva: «MediaSfera» (in Russian).