

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ИСХОДНЫХ ЛИНИЙ МЯСНОГО КРОССА БРОЙЛЕРНОГО ТИПА СМЕНА-8

Я.И. АЛЕКСЕЕВ^{1,2}, О.П. МАЛЮЧЕНКО^{1,2}, Н.В. КОНОВАЛОВА^{1,2}, Д.Н. ЕФИМОВ³,
Ж.В. ЕМАНУЙЛОВА³, О.А. ОГНЕВА³, В.И. ФИСИНИН⁴

(¹ ООО «Синтол»;² Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии;

³ Селекционно-генетический центр «Смена»;

⁴ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства РАН)

Эффективное ведение геномной селекции подразумевает осуществление комплексной генетической оценки исходных линий, родителей и финального бройлера по маркерам генов и генам основных хозяйственно-ценных признаков птицы. Результаты комплексной генетической оценки исходных линий мясного кросса бройлерного типа определяют минимальное количество птицы необходимое для ведения эффективной селекции, а также затраты на ее содержание. Перед началом комплексной и дорогостоящей генетической оценки необходимо изучить генетическое разнообразие исходных линий мясного кросса бройлерного типа Смена 8. Для изучения генетического разнообразия был использован метод анализа микросателлитных маркеров, важными преимуществами которых являются их широкая представленность в геноме, кодоминантное наследование, высокий полиморфизм и распределение внутри генома. С целью изучения генетического разнообразия четырех исходных линий (Б5, Б6, Б7 и Б9) мясного кросса бройлерного типа Смена 8 было проведено генетическое типирование 48 образцов ДНК кур по 12 высокоинформативным микросателлитным маркерам с использованием метода капиллярного гель-электрофореза с лазер-индуцируемой детекцией сигнала флуоресценции. Были получены следующие средние значения числа выявленных аллелей (6.75), наблюдаемой гетерозиготности (0.81), ожидаемой гетерозиготности (0.86) и содержания полиморфной информации (0.71). Был проведен филогенетический анализ данных, который показал высокую степень кластеризации исходных линий (Б5 – 89%, Б6 – 80%, Б7 – 80%, Б9 – 80%). Это позволяет сделать заключение о высокой генетической консервативности исходных линий мясного кросса бройлерного типа Смена 8 и продолжить дальнейшее детальное изучение их геномов.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция (ПЦР), генетическое типирование, микросателлитный маркер, мясной кросс бройлерного типа.

Введение

Селекция отечественных мясных кроссов бройлерного типа насчитывает более 45 лет и в настоящее время выращивается 79 генерация птицы исходных линий. Селекции

онный процесс ведется традиционно на 4-х линейном кроссе, состоящем из двух исходных линий мясного типа (Б5 и Б6) породы корниш и двух исходных линий яичного типа (Б7 и Б9) породы плимутрок. В настоящее время производство мяса птицы в Российской Федерации демонстрирует положительную динамику и приблизилось к рекордным 5 млн. тонн в год [1], существенно превосходя потребление мяса животных и другой птицы (по оценке Росптицесоюза на 2017 год: производство мяса всего – 10275,4 тыс. т.; в том числе мяса птицы – 4820 тыс. т. (47%); свинины – 3556 тыс. т. (35%); говядины – 1634 тыс. т. (16%); прочих видов – 2%). Однако практически 100% потребляемого в стране мяса птицы представляют собой импортные кроссы – продукция двух компаний Cobb-Vantress (США) и Aviagen (Великобритания). Затраты на закупку импортных мясных кроссов бройлерного типа составляют около 8 млрд. рублей в год.

Результаты комплексной генетической оценки исходных линий мясного кросса бройлерного типа будут определять минимальное количество птицы исходных линий необходимое для ведения эффективной селекции и затраты на ее содержание. Перед началом комплексной и дорогостоящей генетической оценки необходимо изучить генетическое разнообразие исходных линий мясного кросса бройлерного типа Смена 8. Для изучения генетического разнообразия используют метод анализа микросателлитных маркеров, важными преимуществами которых являются их широкая представленность в геноме, кодоминантное наследование, высокий полиморфизм и распределение внутри генома [2, 5].

Цель работы – проведение оценки генетического разнообразия исходных линий мясного кросса бройлерного типа Смена 8 методом анализа 12 наиболее информативных микросателлитных маркеров.

Материалы и методы

Сбор образцов и выделение ДНК

48 образцов пера птицы четырех исходных линий (Б5 – 18 образцов, Б6, Б7 и Б9 – по 10 образцов) мясного кросса бройлерного типа были собраны в ФГБУ СГЦ Смена, д. Березняки, Московская область, Россия. Выделение ДНК проводили ручным методом с помощью набора реагентов «Проба-экспресс» (Кат. № ЕХ-517, ООО «Синтол», Россия) с модификацией протокола. Очин пера, содержащий на конце пульпу, помещали в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл и добавляли 300 мкл лизирующего буфера. Пробирки инкубировали в течение 45 минут при 75°C, затем охлаждали до комнатной температуры и сбрасывали капли на высокоскоростной микроцентрифуге Циклотемп-902 (ЗАО «Циклотемп», Россия) в течение 1 минуты при скорости вращения 14 000 об./мин. Полученные препараты нуклеиновых кислот отбирали из пробирок и использовали для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР). Оценку чистоты выделенной ДНК определяли по соотношению оптической плотности $A_{260/280}$. Измерение спектров поглощения проводили на спектрофотометре NanoPhotometer P300 (Implen, Германия).

ПЦР и генотипирование

Для генотипирования линий и популяций кур различными авторами были использованы до 30 локусов, содержащих микросателлитные маркеры [3, 7]. Из них нами были отобраны 12 локусов, характеризующихся максимальными значениями содержания полиморфной информации (PIC – polymorphic information content). Для оптимизации анализа локусы были сгруппированы в две мультиплексные ПЦР (по 6 локусов в одну мультиплексную ПЦР). Информация о локусах, последовательностях праймеров и входящих в них флуоресцентных красителей, диа-

пазонах длин ампликонов, номерах хромосом, на которых расположены локусы, а также номерах мультиплексной ПЦР приведена в таблице 1. Флуоресцентные красители 6FAM, 5R6G, 5TAMRA, 6ROX были введены на 5' конец прямых праймеров.

Таблица 1

Последовательности праймеров, использованных для генетического типирования исходных линий мясного кросса бройлерного типа

Локус	Последовательность праймеров (5'-3')	Диапазон длин	Хромосома	Мультиплекс
ADL0159	F (5R6G)gccattatntttccctgtgt R ctcccaaaagtcattagcag	90-129	6	2
ADL0317	F (6FAM)agttggtttcagccatccat R cccagagcacactgtcactg	175-196	4	2
LEI0074	F (5R6G)gacctgctcctgacatgggtg R gtttgctgattagccatcgcg	225-240	26	1
LEI0135	F (6ROX)cacaatgaaggatgaatagtgc R aattcacagttacacctgagg	131-142	28	2
LEI0141	F (6FAM)cgcatttgatgatacacatg R aaggcaaactcagctggaacg	220-240	2	1
MCW0039	F (5R6G)cattggactgagatgtcactgcag R acattgtctaagtgtactgttac	129-148	2	1
MCW0063	F (6FAM)ggctccaaaagctgttcttagct R gaaaaccagtaaagcttcttac	131-148	2	1
MCW0087	F (6ROX)attctgcagccaactggag R ctcaggcagttctcaagaaca	266-264	2	1
MCW0213	F (6ROX)gacaagtcaacaactgccag R ctgttcactttaaggacatgg	288-318	13	1
MCW0228	F (5TAMRA)gatctctgcattacaagcatg R ttgtgacctgctcatgcaag	222-246	10	2
MCW0264	F (6FAM)cttacttttcacgacagaagc R agactgagtcacactcgtaag	224-240	2	2
ROS0013	F (6ROX)tgctgctcctggraaattg R gaaaagccatggaggaatca	220-256	5	2

ПЦР проводили на амплификаторе АНК-48 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия).

Реакционная смесь объемом 25 мкл включала в себя: 10 мкл 2,5х реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ (М-428, ООО «Синтол», Россия), от 3 до 10 пмоль каждого праймера (ООО «Синтол», Россия), 2,5 ед. *SynTaq*-ДНК полимеразы (E-039-1000, ООО «Синтол», Россия) и 1 мкл образца ДНК.

Использовали следующую программу амплификации: 95°C – 180 с; 30 циклов: 94°C – 10 с, 60°C – 30 с; 72°C – 5 мин.

Наличие продуктов амплификации подтверждали в 2% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Капиллярный электрофорез проводили в генетическом анализаторе Нанофор 05 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) с маркером длин S-450 (ООО «Синтол», Россия) по стандартному протоколу. Для каждого локуса с помощью

специального программного обеспечения «ДНК Фрагментный анализ», версия 5.0.1.2 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) были рассчитаны длины продуктов амплификации и их количество. Для каждого локуса были проведены оценки количества аллелей, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, значений содержания полиморфной информации с помощью программы Cervus 3.0.7. Дендрограмма была построена по методу UPGMA с использованием пакета статистических программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Полиморфизм микросателлитных маркеров

В результате генетического типирования 48 образцов обнаружен 81 аллель, принадлежащий 12 локусам. Количество аллелей на локус варьировало от 4 до 10 и в среднем составило 6.75. Оценки ожидаемой гетерозиготности для отдельных локусов находились в пределах от 0.60 для локуса LEI0135 до 0.83 для локуса MCW0213 при среднем значении 0.76. Показатели наблюдаемой гетерозиготности находились в пределах от 0.67 для локуса LEI0135 до 0.88 для локусов ADL0159 и MCW0213 при среднем значении 0.81 (табл. 2). Полученные оценки близки к описываемым в предыдущих исследованиях [3, 4, 7].

Таблица 2

Статистический анализ гетерозиготности
(ожидаемой (H_o) и наблюдаемой (H_e), значений содержания полиморфной информации (PIC))

Локус	Число аллелей	H_o	H_e	PIC
ADL0159	8	0.88	0.79	0.74
ADL0317	6	0.74	0.77	0.73
LEI0074	6	0.85	0.76	0.71
LEI0135	4	0.67	0.60	0.55
LEI0141	5	0.78	0.74	0.70
MCW0039	6	0.77	0.74	0.77
MCW0063	6	0.85	0.82	0.75
MCW0087	9	0.83	0.77	0.72
MCW0213	9	0.88	0.83	0.76
MCW0228	10	0.81	0.78	0.77
MCW0264	5	0.78	0.70	0.65
ROS0013	7	0.87	0.78	0.73
Среднее значение	6.75	0.81	0.86	0.71

Филогенетический анализ

Для 48 проанализированных образцов на основе генетических расстояний методом UPGMA [6] было построено филогенетическое дерево (рис. 1). Как видно, исходные

линии породы корниш Б5 и Б6 (правая часть дендрограммы) имеют четкую кластеризацию относительно исходных линий породы плимутрок Б7 и Б9 (левая часть дендрограммы). Исключение составляют: образец линии Б6 № 3006, который не попал ни в один из кластеров и образец линии Б9 № 1918, который попал в кластер Б5/Б6. Исходная линия Б5 представлена двумя кластерами – первый представлен образцами №№ 4555, 4634, 4631, 4374, 4509, 4334, 4348, 4302, 4341, 4368, второй – образцами №№ 4576, 4723, 4644, 4650, 4548 и 4658. В этот кластер вошел один образец исходной линии Б6 – № 3322. Таким образом, 16 из 18 (89%) проанализированных образцов исходной линии Б5 филогенетически кластеризованы. Исходная линия Б6 представлена кластером из образцов №№ 3449, 3120, 3447, 3458, 3330, 3238, 3242, 3302, в который вошли два образца исходной линии Б5 – № 4675 и № 4720. Таким образом, 8 из 10 (80%) проанализированных образцов исходной линии Б6 составляют единый кластер. Исходные линии Б7 и Б9 также имеют четкую кластеризацию. При этом в кластер исходной линии Б7 попал один образец исходной линии Б9 – № 1992, а в кластер исходной линии Б9 попали два образца исходной линии Б7 – № 0451 и № 0608. Степень филогенетической кластеризации исходных линий Б7 и Б9 на изученной выборке составила 80%. Таким образом, исходные линии кур породы корниш Б5 и Б6 и исходные линии Б7 и Б9 кур породы плимутрок имеют четкую филогенетическую кластеризацию.

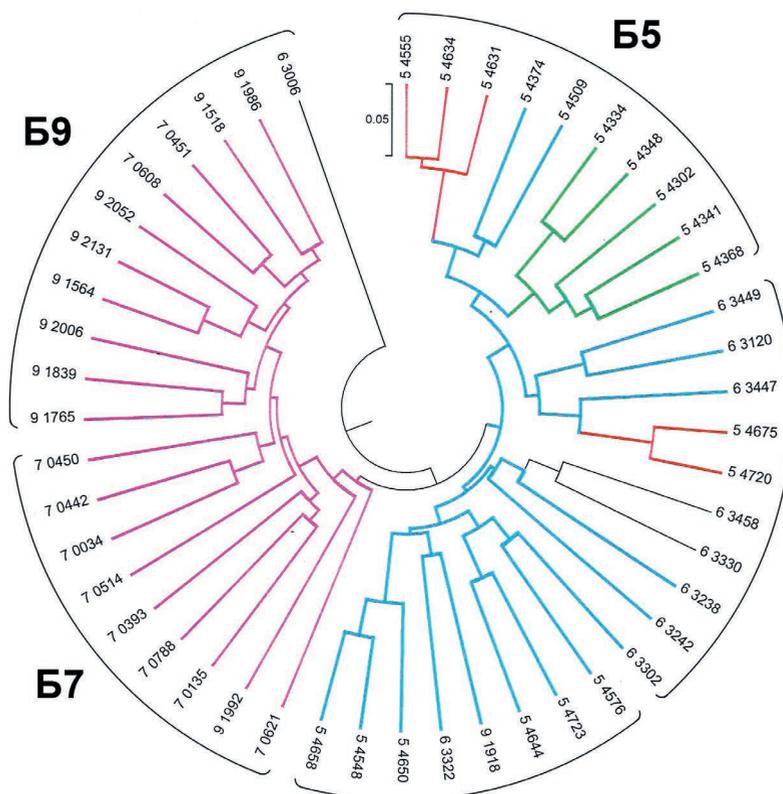


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное по результатам генетического типирования 12 микросателлитных маркеров 48 образцов четырех исходных линий мясного кросса бройлерного типа Б5, Б6, Б7 и Б9 (первая цифра – номер исходной линии, вторая – порядковый номер птицы)

Заключение

Проведено изучение генетического разнообразия четырех исходных линий (Б5, Б6, Б7 и Б9) мясного кросса бройлерного типа Смена 8 на выборке из 48 образцов ДНК кур по 12 высокоинформативным микросателлитным маркерам. Получены значения числа выявленных аллелей, наблюдаемой гетерозиготности, ожидаемой гетерозиготности и содержания полиморфной информации. Проведенный филогенетический анализ данных показал высокую степень кластеризации исходных линий мясного кросса бройлерного типа Смена 8.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО России в рамках выполнения подпрограммы «Создание отечественных конкурентоспособных мясных кроссов бройлерного типа» Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017–2025 годы. Дополнительное государственное задание ФГБУ СГЦ Смена №007-01359-17-03 от 29.11.2017 г.

Работа выполнена с использованием дорогостоящего оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ.

Библиографический список

1. ИКАР. Институт Конъюнктуры Аграрного Рынка. [Электронный ресурс]. URL: <http://ikar.ru/poultry/research.html>
2. Cheng H.H., Crittenden L.B. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poult. Sci.*, (1994), 73: 539-546.
3. Hillel J., Groene M., Tixier-Boichard M., Korol A., David L., Kirzhner V., Burke T., Barre-Dirie A., Crooijmans R., Elo K., Feldman M., Freidlin P., Maki-Tanila A., Oortwijn M., Thomson P., Vignal A., Wimmers K., Weigend S. (2003); Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools, *Genet. Sel. Evol.* 35: 533-557 doi: 10.1051/gse:2003038.
4. Seo D.W., Hoque M.R., Choi N.R., Sultana H., Park H.B., Heo K.N., et al. Discrimination of Korean native chicken lines using fifteen selected Microsatellite markers. *Asian-Aust J Anim Sci.* (2013) 26:316–22.
5. Muhammet Kaya, Mehmet Ali Yildiz. Genetic Diversity Among Turkish Native Chickens, Denizli and Gerze, Estimated by Microsatellite Markers *Biochem Genet.* (2008) Aug; 46 (7-8): 480–491. doi: 10.1007/s10528-008-9164-8.
6. Nei M., Tajima F., Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J Mol Evol.* 1983. 19:153–70.
7. Nu Ri Choi, Dong Won Seo, Slim Ben Jemaa, Hasina Sultana, Kang Nyeong Heo, Cheorun Jo and Jun Heon Lee. Discrimination of the commercial Korean native chicken population using microsatellite markers. *Journal of Animal Science and Technology* (2015). 57:5.

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF PURE LINES OF SMENA-8 MEAT-CROSS BROILERS

YA.I. ALEKSEYEV^{1,2}, O.P. MALYUCHENKO^{1,2}, N.V. KONOVALOVA^{1,2},
D.N. EFIMOV³, Zh.V. EMANUILOVA³, O.A. OGNEVA³, V.I. FISININ⁴

(¹ LLC “Syntol”; ² All-Russian Research Institute of Agriculture Biotechnology;

³ Federal Breeding and Genetic Center “Smena”;

⁴ Federal Scientific Center — All-Russian Research and Technological Poultry Institute at RAS)

Effective management of genomic selection implies the comprehensive genetic evaluation of pure lines, parents and final broilers using gene markers or genes of economically valuable characters of the poultry kind. The results of complex genetic study of the meat-cross broiler pure lines determine the minimum number of poultry needed for effective breeding as well as the costs of its maintenance. Before starting a complex and costly genetic evaluation, it is necessary to study the genetic diversity of pure lines of meat-cross broiler Smena 8. To study the genetic diversity, a method of analyzing microsatellite markers has been used, the important advantages of which include the abundant representation of these markers in genome, codominant inheritance, high polymorphism and distribution within the genome. In order to study the genetic diversity of the four pure lines (B5, B6, B7, and B9) of the meat-cross broiler Smena 8, forty-eight poultry DNA samples have been genotyped with 12 highly informative microsatellite markers using a capillary gel-electrophoresis method with laser-induced detection of fluorescent signal. The authors have estimated the average number of detected allelic variants (6.75), observed heterozygosity (0.81), expected heterozygosity (0.86), and polymorphic information content (0.71). The phylogenetic analysis of the obtained data has been carried out, and it has shown a high degree of clustering of the pure lines (B5 – 89%, B6 – 80%, B7- 80%, B9 – 80%). This allows making a conclusion about high genetic conservativeness of the meat-cross broiler Smena 8 pure lines and continue further detailed study of their genomes

Key words: polymerase chain reaction (PCR), genotyping, microsatellite marker, meat broiler-type cross.

References

1. IKAR (IAMC). Institute of Agrarian Market Conjuncture. [Electronic resource]. URL: <http://ikar.ru/poultry/research.html>.
2. Cheng, H.H., Crittenden L.B. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poult. Sci.*, (1994), 73: 539-546.
3. Hillel J., Groene M., Tixier-Boichard M., Korol A., David L., Kirzhner V., Burke T., Barre-Dirie A., Crooijmans R., Elo K., Feldman M., Freidlin P., Maki-Tanila A., Oortwijn M., Thomson P., Vignal A., Wimmers K., Weigend S. (2003); Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools, *Genet. Sel. Evol.* 35: 533-557 doi: 10.1051/gse:2003038.
4. Seo D.W., Hoque M.R., Choi N.R., Sultana H., Park H.B., Heo K.N., et al. Discrimination of Korean native chicken lines using fifteen selected Microsatellite markers. *Asian-Aust J Anim Sci.* (2013) 26:316–22.
5. Muhammet Kaya, Mehmet Ali Yıldız. Genetic Diversity Among Turkish Native Chickens, Denizli and Gerze, Estimated by Microsatellite Markers *Biochem Genet.* (2008) Aug; 46 (7-8): 480–491. doi: 10.1007/s10528-008-9164-8.

6. *Nei M., Tajima F., Tateno Y.* Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J Mol Evol*, 1983. 19:153–70.

7. *Nu Ri Choi, Dong Won Seo, Slim Ben Jemaa, Hasina Sultana, Kang Nyeong Heo, Cheorun Jo and Jun Heon Lee.* Discrimination of the commercial Korean native chicken population using microsatellite markers. *Journal of Animal Science and Technology* (2015) 57:5.

Алексеев Яков Игоревич – зав. лабораторией анализа ГМО ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, научный директор ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (495) 984-69-93; e-mail: jalex@iab.ac.ru).

Малюченко Олег Петрович – ст. н. с. лаборатории синтеза и анализа биоорганических соединений ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, научный сотрудник ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (916) 453-48-66; e-mail: oleg.maluchenko@mail.ru).

Коновалова Нина Валерьевна – ст. н. с. лаборатории синтеза и анализа биоорганических соединений ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, научный сотрудник ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (926) 288-24-07; e-mail: miirka@mail.ru).

Ефимов Дмитрий Николаевич – Врио директора ФГБУ СГЦ «Смена» (141357, Московская обл., Сергиево Посадский р-н, д. Березняки д. 117; тел.: 8 (496) 546-60-90; e-mail: berez_smena@mail.ru).

Емануйлова Жанна Владимировна – зам. директора, гл. зоотехник– селекционер ФГБУ СГЦ «Смена» (141357, Московская обл., Сергиево Посадский р-н, д. Березняки д. 117; тел.: 8 (496) 546-60-90; e-mail: berez_smena@mail.ru).

Огнева Ольга Александровна – зам. главного зоотехника-селекционера ФГБУ СГЦ «Смена» (141357, Московская обл., Сергиево Посадский р-н, д. Березняки д. 117; тел.: 8 (496) 546-60-90; e-mail: berez_smena@mail.ru).

Фисинин Владимир Иванович – научный руководитель ФНЦ «ВНИТИП» РАН, академик РАН (141311, г. Сергиев Посад, Московская обл., ул. Птицеградская, д. 10; тел. 8(469)549-95-75; e-mail: vnitip@vnitip.ru).

Yakov I. Alekseyev – Head of the Laboratory of GMO analysis of All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Scientific Director of LLC Syntol (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; phone: +7 (499) 976-65-44; e-mail: jalex@iab.ac.ru).

Oleg P. Maluchenko – Senior Research Associate of the Laboratory of Synthesis and Analysis of Bioorganic Compounds, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Researcher at LLC Syntol (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; phone: +7 (916) 453-48-66; e-mail: oleg.maluchenko@mail.ru).

Nina V. Konovalova – Senior Research Associate of the Laboratory of Synthesis and Analysis of Bioorganic Compounds, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Researcher at LLC “Syntol” (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; phone: +7 (926) 288-24-07; e-mail: miirka@mail.ru).

Dmitry N. Efimov – Designate Head of Breeding and Genetic Center “Smena”, (141357, Moscow region, Sergiev Posad district, Berezniki, 117; phone: +7 (496) 546-60-90; e-mail: berez_smena@mail.ru).

Zhanna V. Emanuilova– Deputy Head, Chief Livestock Breeding Expert, Breeding and Genetic Center “Smena”, (141357, Moscow region, Sergiev Posad district, Berezniki, 117; phone: +7 (496) 546-60-90; e-mail: berez_smena@mail.ru).

Olga A. Ogneva – Deputy Chief Livestock Breeding Expert, Breeding and Genetic Center “Smena”, (141357, Moscow region, Sergiev Posad district, Berezhnyaki, 117; phone: +7 (496) 546-60-90; e-mail: berez_smena@mail.ru).

Vladimir I. Fisinin – Scientific Head of RAS Federal Scientific Centre “VNITIP”, RAS academician (Breeding and Genetic Center “Smena” (141357, Moscow region, Sergiev Posad district, Ptitsegradskaya Str., 10; phone +7 (469)549-95-75; e-mail: vnitip@vnitip.ru).