

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»
Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Круглый стол. Синтез фундаментальной и прикладной науки в птицеводстве: возможен ли он?

Станишевская Ольга Игоревна, д.б.н., рук. отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов с.-х. птиц ВНИИГРЖ

Stanishevskaya Olga olgastan@list.ru



Life of Genomes 2022

Казань, 23-25 ноября 2022 г

Домашняя курица (*Gallus gallus domesticus*) занимает особое эволюционное положение, что делает этот вид важной животной моделью для проведения фундаментальных исследований в различных научных дисциплинах:

- в экспериментальной эмбриологии (Rashidi and Sottile, 2009),
- в исследованиях, посвященных молекулярным основам развития клеток или межклеточным взаимодействиям (Weeke-Klimp et al., 2010),
- в генетике и геномике (Cogburn et al., 2003),
- в экспериментальной медицине (Ribatti, 2012),
- в иммунологии (Burt and Pourquie, 2003 ; Li et al., 2011),
- в относительно новой области – эпигенетике.



Эмбрионы кур в качестве модельных организмов имеют ряд преимуществ перед эмбрионами млекопитающих:

- куриные эмбрионы **развиваются очень быстро** - 21 сут.;
- когда яйцо откладывается, птичий **эмбрион** состоит из плоской двухслойной бластодермы, которая лежит на поверхности желтка и, следовательно, **легко доступна**.
- последующее развитие происходит **вне тела матери**, материнский эффект ограничивается составом яиц;
- факторы окружающей среды (температура инкубации и влажность) можно строго контролировать, чтобы минимизировать индивидуальную изменчивость окружающей среды (Guerrero-Bosagna et al., 2018).
- инкубация куриных яиц может быть прекращена в любое время, тем самым обеспечивая эмбрионы на **желаемой стадии развития** для конкретного эксперимента;
- куриные эмбрионы имеют достаточный **размер**, что позволяет практически на ранних стадиях проводить несколько видов микроманипуляций;
- куриный эмбрион можно **легко инкубировать и манипулировать** им как *in ovo*, так и *ex ovo* при очень низких затратах;
- детальное **знание генома** курицы.
- птицы являются особенно удобной **моделью для изучения эпигенетической наследственности** между поколениями (Guerrero-Bosagna et al., 2018)(ранняя половая зрелость, высокий уровень яйценоскости, короткий интервал между поколениями, небольшая площадь для содержания и количество корма, при использовании искусственного осеменения от одного петуха можно получить значительное число потомков).

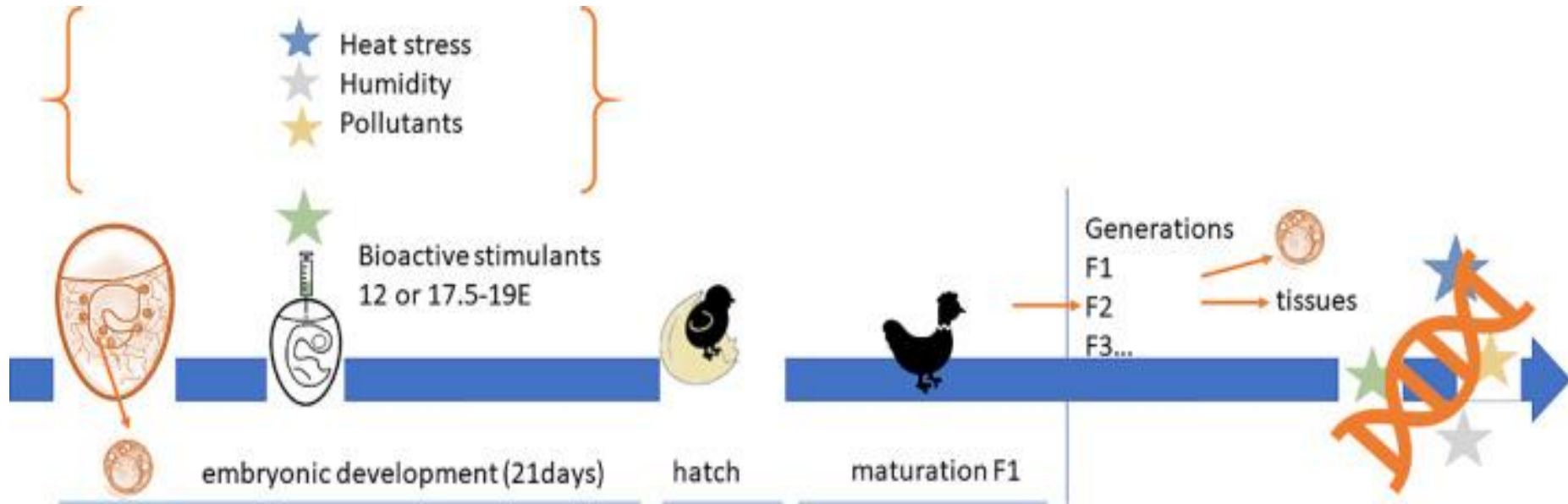


Эпигенетическое трансгенеративное наследование

Модель *in ovo* для изучения механизмов потенциального наследования

эпигенетического кода (M. Bednarczyk, A. Dunislawska, K. Stadnicka, E. Grochowska

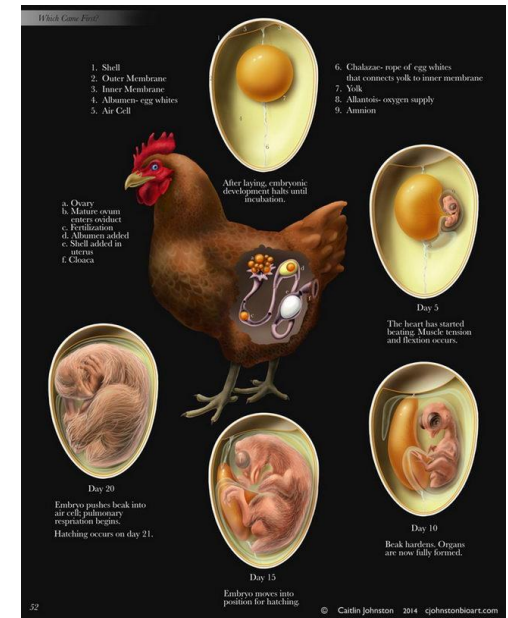
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101164Get>)



Модель для изучения наследования эпигенетического кода на примере курицы включает анализ PGCs в эмбрионе, подвергающемся эпигенетическому воздействию. Факторы окружающей среды / стрессоры или *in ovo* применение биологически активных соединений (про / синбиотиков, витаминов и питательных веществ) может вызывать эпигенетические изменения в генах во время пренатального развития цыплят. PGC могут передавать измененный эпигеном последующим поколениям. Следовательно, анализ транскриптома PGC и тканей до эпигенетического воздействия у вылупившихся цыплят и в следующем поколении позволит проанализировать наследуемость измененного эпигенома. (Сокращения: PGCs, первичные половые клетки; E - день инкубации эмбриона; F, сыновнее поколение.)

Материнский эффект

Материнское программирование — это одно из наиболее быстро развивающихся направлений современной биологии. Оно призвано ответить на вопрос о механизмах передачи фенотипических признаков будущим поколениям без изменения генов/ДНК. Установлено, что многие питательные вещества корма, включая бетаин, витамин В12, фолиевую кислоту и метионин, могут поставлять метильные группы, необходимые для метилирования ДНК, и тем самым влиять на экспрессию определенных генов в организме.



Биологическая полноценность инкубационных яиц (содержание витаминов, микроэлементов, антиоксидантов, жирнокислотный состав, микробиом) оказывает влияние на экспрессию ряда генов в кишечнике, печени, селезенке цыплят.

Стрессирование кур в период яйцекладки приводит к накоплению гормонов стресса в инкубационных яйцах, что изменяет экспрессию генов, связанных с активностью иммуноглобулинов, у цыплят и оказывает иммуносупрессорное действие.

Хронический стресс у мясных кур родительского стада, связанный с ограниченным кормлением, ведет к «перепрограммированию» метаболических эндокринных осей и ухудшению скорости роста и качественных характеристик мяса у потомков-бройлеров.

Экспериментальное введение различных доз **кортикостерона** *in ovo* до инкубации привело к изменениям в агрессивном поведении цыплят, в рефлексе «тонической неподвижности», репродуктивных способностях и экспрессии генов гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (HPG) у цыплят разных возрастов.

Кормление и стимуляция *in ovo*



Искусственная модификацией состава яйца оказывает влияние на метилирование и экспрессию генов у потомства:

- частичное удалением белка из яиц, приводит к долгосрочным изменениям транскриптома в печени кур (Willems et al., 2016).
- доказано влияние многих питательных веществ, такие как селен, фолиевая кислота, флавоноиды и пробиотических бактерий (Jaenisch and Bird, 2003). Лю и др. (2016) показали, что инъекция 150 мкг фолиевой кислоты на 11-й эмбриональный день инкубации может усилить экспрессию генов инсулиноподобного фактора роста 2, модулируя гипометилирование ДНК и улучшая доступность хроматина в промоторной области гена, тем самым способствуя росту эмбриона и развитию органов у бройлеров.

Стимуляции микробиома куриного эмбриона *in ovo* вызывает долгосрочный постэмбриональный эффект (Siwek et al., 2018):

- синбиотики запускают экспрессию генов, которые связаны с иммунным ответом, (активация Т-лимфоцитов, дифференцировка лимфоцитов, продукция цитокинов и пролиферация лимфоцитов). Исследования показали, что, например, хитоолигосахариды в дозе 5 мг, вводимые *in ovo*, модулируют экспрессию генов, связанных с кишечными иммунными реакциями у цыплят-бройлеров (Zhang et al., 2020).

Эпигенетические модификации в течение эмбрионального развития. Влияние температуры.



Эпигенетические процессы играют важную роль в обеспечении механизмов терморезистентности кур. Температурные манипуляции в эмбриональном периоде могут способствовать приобретению термотолерантности у цыплят, о чем свидетельствуют уровни экспрессии мРНК генов, связанных с окислительно-восстановительным путем (Аль-Згул и Салех, 2020).

Corbett et al. (2020) выявили изменения в профилях метилирования сердечной ДНК, которые были связаны с повышением температуры яичной скорлупы (38,9 ° C с E8 и далее) и изменением концентрации CO₂ при инкубации.

Исследования уровня метилирования ДНК и гистонов у цыплят, подвергшихся тепловому стрессу, показывают, что эпигенетические особенности различаются в зависимости от среды, в которой цыплята проживают в период вылупления (Kisliouk and Meiri, 2009).

Было доказано, что экспрессия гена *BDNF*, который является ключевым регулятором терморезистентности в гиппокампе и гипоталамусе, различается между особями контрольной группы и особями, привыкшими к более высоким температурам на ранних стадиях после вылупления. Изменения уровня метилирования сайтов CpG и модификаций гистонов в промоторе гена *BDNF* наблюдались при приобретении терморезистентности на третьи сутки после вылупления (Кислюк и Мейри, 2009 ; Кислюк и др., 2011).

Louau et al. (2016) проанализировали долговременную модификацию физиологических регуляторов, вызванную тепловыми манипуляциями во время эмбриогенеза и последующее воздействие теплового воздействия на большую грудную мышцу 34-дневных бройлеров. В условиях эксперимента бройлеры ТМ демонстрировали значительно измененный профиль общей мышечной экспрессии по сравнению с контролем, что, как полагали, было связано с эпигенетическими модификациями и активным сплайсингом РНК .

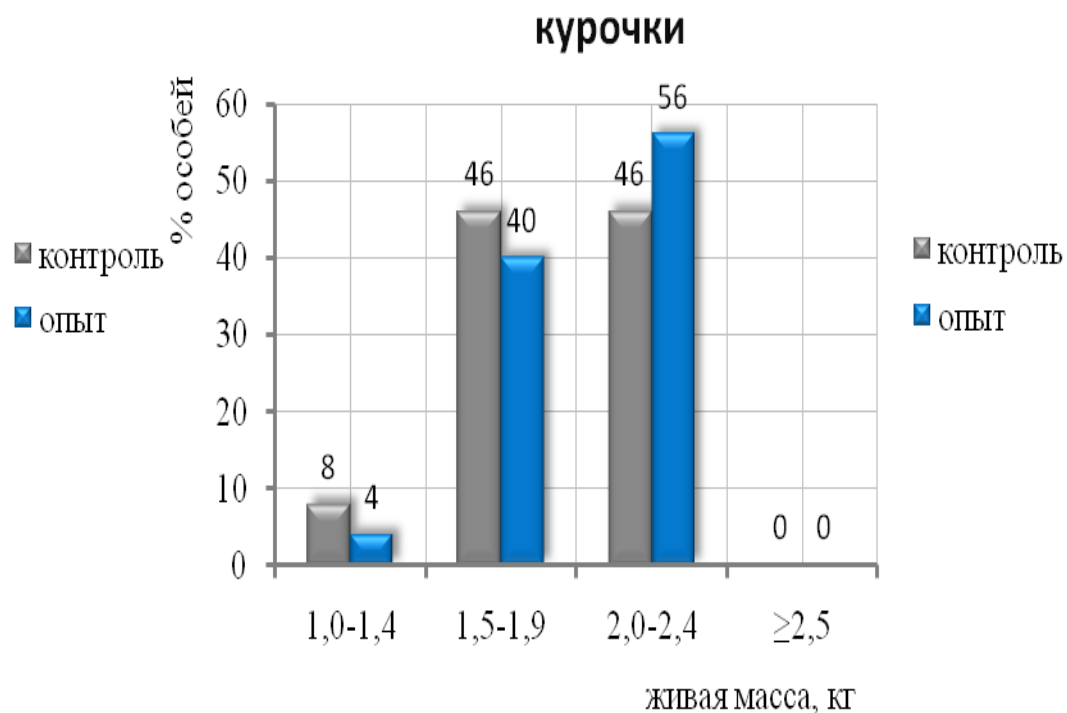
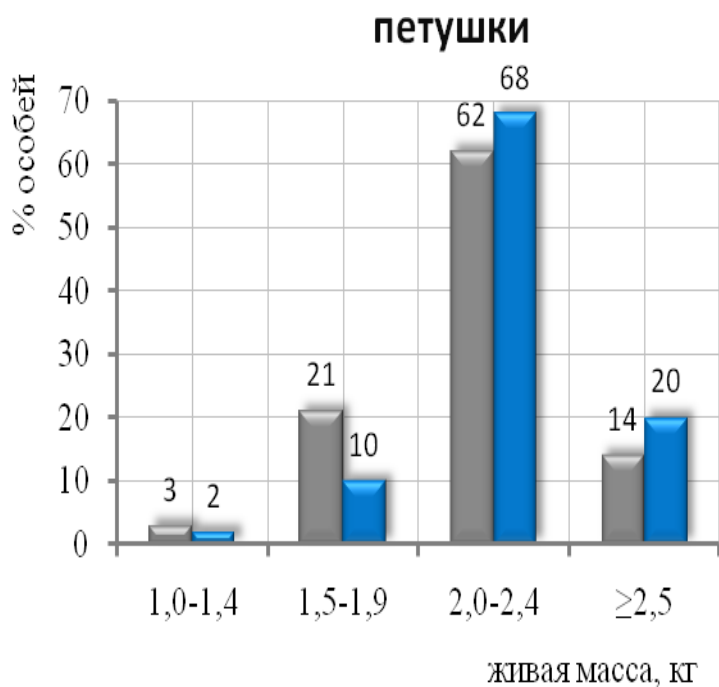
Метод дозированного (температурного) воздействия в чувствительные периоды эмбриогенеза для выявления скрытой генетической изменчивости мясных качеств кур

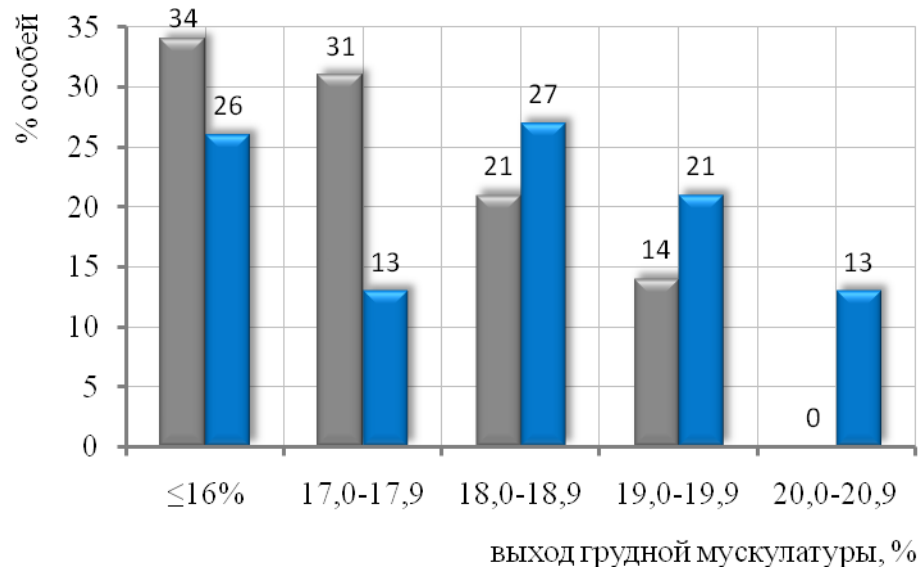
На основании литературных данных и собственных поисковых исследований нами определены **чувствительные периоды эмбриогенеза** для температурной стимуляции развития мышечной ткани не только эмбрионов, но и цыплят до возраста 36-39 дней на птице промышленных кроссов “ROSS-308”, “ISA F15, Flex”, «СК Русь 6».

Первое температурное воздействие (39° - $39,3^{\circ}$ C) проводили в период **с 48 до 96 часов инкубации** в первую миобластическую фазу гистогенеза поперечно-полосатой мышечной ткани.

Второе – при такой же температуре в период **с 14 по 18 сутки инкубации** по 4 часа/сут. для ускорения пролиферации и дифференциации клеток-сателлитов.

Распределение 36-суточных цыплят («Ross-308») по живой массе в зависимости от режимов инкубации

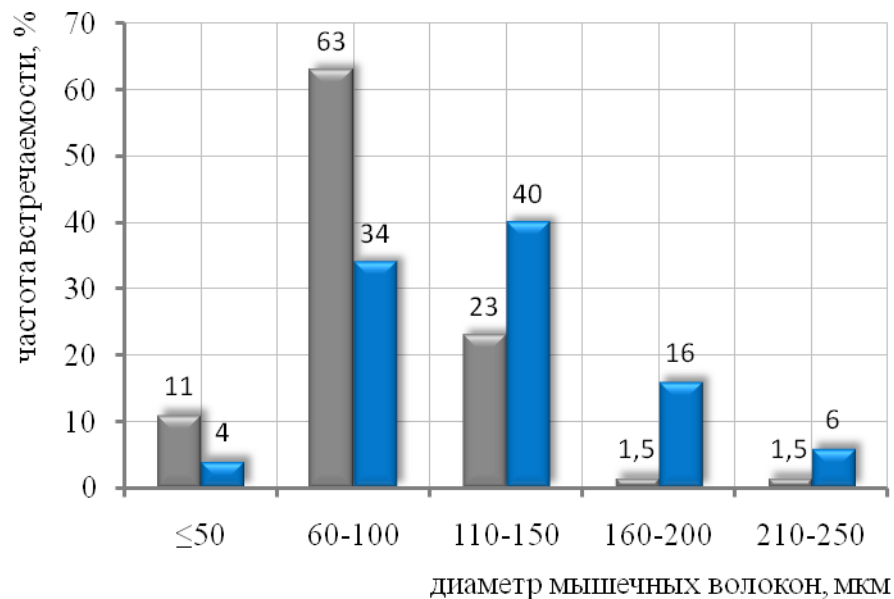




■ контроль

■ опыт

Распределение 39-суточных цыплят-бройлеров кросса «Isa» по выходу грудной мускулатуры (% к живой массе) в зависимости от режима инкубации.



■ контроль

■ опыт

Частота встречаемости мышечных волокон различной толщины у бройлеров кросса «Isa» в возрасте 39 суток в зависимости от температурного режима инкубации (n= 373 измерения)

Проверка предложенного нами способа инкубации, проведенная в Кубанском государственном аграрном университете на бройлерах кросса «СК Русь 6» доказала его эффективность:

- повышение выводимости яиц с 91,3% до 98,0%,**
- повышение живой массы цыплят в 35 суток с 2158 ± 19 г (обычный режим для мясных кур) до 2287 ± 24 г (+129 г или +5,9%);**
- повышение выхода грудных мышц в % к живой массе с 18,75% до 20,64% (+1,2%),**
- в том числе грудного филе в % к живой массе с 16,7% до 17,4% (+0,7%).**

**РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(19)RU (11)0002384053 (13)C2

(51) МПК 7 **A01K 45/00**

(12)

(43) Дата публикации заявки: **20.03.2010**

Адрес для переписки:

**196601, Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское ш., 55А, ГНУ
ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных
животных Россельхозакадемии, Е.С. Торициной**

(71)

Заявитель(и):

(72) Автор(ы):

Станишевская

Ольга

Игоревна (RU)

Торицина

Елена

Сергеевна

(RU)

(54) **СПОСОБ ИНКУБАЦИИ ЯИЦ МЯСНЫХ КУР**

(57) Формула изобретения

Изобретение относится к сельскому хозяйству, а именно к инкубации яиц кур мясных пород. Способ включает инкубацию при влажности 55-65% при следующем температурном режиме: с 1 по 2 сутки при 37,5-37,6°C, с 3 по 4 сутки при 39,0-39,1°C, с 5 по 13 сутки при 37,5-37,6°C, с 14 по 18 сутки при 37,5-37,6°C. В течение 4 часов в каждые сутки этого периода яйца инкубируют при температуре 39,0-39,1°C, с 19 по 21 сутки при температуре 37,2-37,3°C. Повышается скорость роста бройлеров, мясистость тушки цыплят и выход грудного филе. 1 табл.

Иммунологические процессы



Метилирование ДНК связано с подавлением транскрипции, что приводит к этиологии и патогенезу некоторых заболеваний (Liu et al., 2016). Эпигенетические механизмы вовлечены в иммунологические процессы, лежащие в основе восприимчивости цыплят, например, к **болезни Марека** (Luo et al., 2012 , Luo et al., 2012).

Эпигенетическая природа этого заболевания была исследована на основании гистоновой модификации всего генома трех линий кур, устойчивых и восприимчивых к вирусу Марека. Было обнаружено, что триметилирование в обогащении гистона H3 Lys4 положительно коррелирует с экспрессией генов, кодирующих белки, а также генов miRNA, тогда как три-метилирование гистона H3 Lys27 обнаруживает отрицательную корреляцию. Путем выявления специфичных для линии модификаций гистонов при болезни Марека было обнаружено, что уникальные островки H3K4me3 активируются в устойчивых к заболеванию куриных генах, которые связаны с иммунным ответом и клеточной адгезией.

На основе этих исследований было обнаружено, что внутренние эпигенетические механизмы могут играть ключевую роль в устойчивости и восприимчивости к болезни Марека (Luo et al., 2012). Вирус Марека также может вызывать изменения уровня экспрессии всех трех генов семейства метилтрансфераз DNMT (*DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B*). Также было показано, что некоторые гены-кандидаты имеют более высокий уровень метилирования промотора у цыплят, восприимчивых к болезни Марека, чем у цыплят, устойчивых к этой болезни. Гиперметилированные гены участвуют в основном в организации клеточных компонентов и иммунологических процессах и могут играть ключевую роль в восприимчивости к заболеванию, дерегулируя эти гены (Luo et al., 2012)

Заключение

Фенотип индивида является результатом сложных взаимодействий между генотипом и текущей, прошлой и наследственной средой, что приводит к пожизненному ремоделированию его эпигенома (Jammes et al., 2011). Следовательно, геномные инструменты не могут объяснить полностью наследственные изменения хозяйственно-полезных признаков животных.

На сегодняшний день различные эпигенетические паттерны развития были изучены у кур различного направления продуктивности (Hu et al., 2013 ; Tian et al., 2013 ; Bélteky et al., 2018 ; Dunislawska et al., 2021, неопубликованные данные), и эти исследования доказали, что куриный транскриптом может быть перепрограммирован путем манипулирования различными факторами окружающей среды во время раннего эмбриогенеза .

Один из фундаментальных вопросов при изучении эпигенетики в контексте птицеводства заключается в том, могут ли эпигенетические метки быть унаследованы через зародышевую линию и как отбор может воздействовать на эту вариацию напрямую. Мы считаем, что дальнейшие исследования восполнят этот пробел в знаниях и приведут к идентификации новых эпигенетических маркеров для повышения точности отбора с точки зрения текущих и новых признаков, включая устойчивость к болезням.



Сегодня мы живем в эпоху смены парадигм: традиционная **геноцентрическая парадигма** постепенно уступает многие позиции **эпигенетической парадигме** развития и наследования

(акад. РАН В.А. Драгавцев)

Благодарю за внимание!



ГЗ № 121052600357-8 (0445-2021-0012)