

О. Ю. Баркова, М. Г. Смарагдов

## Влияние однонуклеотидной замены 2\_1 на признаки яйца домашней курицы

**Аннотация.** В статье рассмотрено — влияние аллели *SNP2\_1* нуклеотидной последовательности *CR523443* на признаки яйца домашней курицы. Выявлено достоверное влияние аллели *SNP2\_1* на толщину скорлупы и вес яйца. Эффект замещения аллелей *C* на *T* достоверен для яйценоскости 60-ти недельных кур ( $P = 0.027$ ) и толщины скорлупы ( $P = 0.017$ ) у кур линии *УК-72*, а также для массы яйца ( $P = 0.002$ ) у кур гибрида *CD*. *SNP2\_1* может быть рекомендован для использования в селекции кур несушек.

**Ключевые слова:** Лocusы количественных признаков, однонуклеотидные замены, признаки яйца домашней курицы.

**Авторы:**

**Баркова Ольга Юрьевна** — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной организации генома ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург-Пушкин, Московское шоссе, 55а, e-mail: barkoffws@list.ru;

**Смарагдов Михаил Григорьевич** — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной организации генома ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург-Пушкин, Московское шоссе, 55а, e-mail: mik7252@yandex.ru.

**Введение.** Причиной столь большого внимания, которое уделяется в настоящее время однонуклеотидным полиморфным сайтам, является надежда на то, что они могут быть использованы в качестве маркеров для селекции по аллелям генов, оказывающих существенное влияние на хозяйственно ценные признаки (QTL). Для выявления участков генома, в которых частота аллелей SNP различается в разных генотипических классах, рациональным подходом было бы генотипирование совокупности SNP в геноме. Полногеномное генотипирование SNP теоретически возможно для полностью секвенированных геномов, для которых в публичном доступе имеется более миллиона SNP (человек, мышь, крупный рогатый скот, куры и т.д.). Производительность, необходимая для генотипирования нескольких тысяч SNP, и стоимость процедуры генотипирования с помощью сиквенса делают такие проекты в настоящее время очень дорогими. В настоящее время разработана технология генотипирования животных с использованием SNP-чипов, так называемая геномная селекция, которая нашла широкое применение в животноводстве и растениеводстве. В тех редких случаях, когда признак во многом определяется несколькими мажорными QTLs, имеет смысл вести селекцию только по этим QTLs.

За последние 10 лет с помощью генетического картирования хромосом домашней курицы были обнаружены сотни локусов количественных признаков (QTL), определяющих изменчивость хозяйственно-полезных признаков. Они все были

интегрированы в базу данных расположенную на сайте (<http://www.animalgenome.org/QTLdb>). Исходя из данных этого сайта, нами был отобран QTL в 4-ой хромосоме, влияющий на толщину скорлупы яиц.

В четвертой хромосоме курицы рядом с микросателлитом *MCW0114* был картирован QTL, влияющий на толщину скорлупы яиц [1]. С помощью EST (экспрессирующих последовательностей ДНК) в ближайшем окружении микросателлита *MCW0114* был обнаружен транскрипт — клон *ChEST985k21*, экспрессия которого коррелировала с толщиной скорлупы кур польской породы зеленоногая куропатчатая [2].

В непосредственной близости от последовательности *CR523443* были обнаружены шесть SNP, три из которых ассоциировали с толщиной скорлупы яйца [3]. Наиболее достоверная ассоциация SNP — признак установлена для *SNP2\_1*. Нами был осуществлен генетический анализ ассоциации *SNP2\_1* с рядом хозяйственно полезных признаков яиц

**Материал и методы исследований.** Для проведения экспериментов использованы куры двух линий коричнево скорлупного кросса *УК Кубань 7*, созданных на основе генофонда породы род-айленд. Отцовская линия *УК-72* в материнской родительской форме типа белый род-айленд и материнская линия *УК-73* в материнской родительской форме типа белый род-айленд с геном медленно оперения, сцепленным с полом. В обеих этих

линиях отбор велся, в том числе и на повышение массы яйца. Также в экспериментах был использован двухлинейный гибрид CD родительской формы кросса Ломан Браун. Причем, отбор кур в этих линиях и кроссе осуществлялся, в том числе на прочность скорлупы. В работе использовали следующие признаки: 1. Средняя толщина скорлупы яйца в мкм. 2 средняя доля массы скорлупы от массы всего яйца в процентах 3. Средняя масса скорлупы в граммах. 4. Средняя интенсивность пигментации скорлупы яиц у кур 30, 60 недельного возраста. 5. Средняя яйценоскость кур 40, 60, недельного возраста. 6. Средняя масса желтка по отношению к массе яйца. 7. Средняя масса желтка в граммах. 8. Средняя масса яйца у кур 30, 60, недельного возраста. 9. Индекс формы. 10. Средняя деформация скорлупы яйца без нарушения ее целостности в мм под воздействием груза весом 500 гр, снесенных курами 30, 40 недельного возраста. Из 149 образцов крови была выделена ДНК с помощью фенол-хлороформного метода. Дизайн аллелеспецифических олигонуклеотидов-праймеров для генотипирования кур по аллелям SNP 2\_1, расположенных рядом с последовательностью CR523443 проводили на основании информации баз данных сети интернет ([www.nlm.nih.gov](http://www.nlm.nih.gov)) при помощи компьютерной программы PRIMER\_3 ([www.genome.wi.mit.edu](http://www.genome.wi.mit.edu)). Величина амплифицируемого фрагмента была задана в пределах 200–500 п.н. и температура гибридизации при 60°C. Проверка полученных последовательностей праймеров на предмет специфичности и отсутствия возможной внутригеномной гомологии была проведена при помощи пакета программ BLAST.

Амплификацию ДНК при помощи ПЦР проводили с использованием амплификатора IQ-5 (Bio-Rad, США) в следующем режиме:

95°C – 5 минут; 95°C – 1 минута, 60°C – 1 минута, 72°C – 1 минута (30 циклов); 72°C – 7 минут 40°C – хранение.

Разделение фрагментов осуществляли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле. Фрагменты ДНК визуализировали в проходящих УФ лучах. Размеры фрагментов ДНК определяли при сравнении их с размерами фрагментов маркера ДНК.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа. В качестве критерия достоверности использовали критерий Фишера F. Вычисления осуществляли при помощи пакета компьютерной программы Statistica 6.

Проведено генотипирование 149 курицы породы Род Айленд, линиям УК-72, УК-73 и межгибридному кроссу CD. Среди них 51 образец из линии УК-72, 73 из линии УК-73 и 25 из межлинейного гибрида CD.

Для генотипирования кур по аллелям SNP были использованы аллелеспецифические праймеры (полиморфные сайты выделены жирными буквами):

S2\_1\_Up\_T: **ST**GCTCAGTGTCTTAGTCTGATCAGT  
 S2\_1\_Up\_C: **ST**GCTCAGTGTCTTAGTCTGATCAGC  
 S2\_1\_Dn: ACAGTCATGATGAGGAAACAGG

**Анализ и обсуждение результатов.** В табл. 1 представлены данные о величине толщины скорлупы яиц в зависимости от генотипа кур двух линий УК-72, УК-73 и гибрида CD а также у объединенной выборки всех кур. Из данных следует, что достоверный эффект замены аллелей SNP2\_1 наблюдается у кур линии УК-72 и объединенной выборки всех кур, причем для кур линии УК-72 он составляет более одного стандартного откло-

Таблица 1. Толщина скорлупы яиц в зависимости от генотипа кур

Линия	Генотип	Средняя толщина $\pm$ ошибка среднего (мкм)	N	Частота аллелей	Стандартное отклонение	Эффект замещения аллелей (мкм)	P
УК-72	СТ	369,6 $\pm$ 5,8	18	С (0,27)	25	СТ- СС 34	0,017
	ТТ	359,4 $\pm$ 5,9	28	Т (0,73)	31	СТ-ТТ	0,25
	СС	334,8 $\pm$ 14,7	5		33	СС-ТТ	0,11
УК-73	СТ	344,1 $\pm$ 5,1	34	С (0,26)	30	СТ-СС	0,14
	ТТ	340,8 $\pm$ 5,2	37	Т (0,74)	31	СТ-ТТ	0,65
	СС	310 $\pm$ 40	2		56	СС-ТТ	0,20
CD	СТ	380,6 $\pm$ 5,9	8	С (0,16)	17	СТ-ТТ	0,57
	ТТ	385,0 $\pm$ 4,4	17	Т (0,84)	18		
УК-72 УК-73 CD	СТ	356,6 $\pm$ 3,9	60		30	СТ-ТТ	0,95
	ТТ	356,3 $\pm$ 3,7	82		33	СТ-СС 29	0,023
	СС	327,7 $\pm$ 14,2	7		37	СС-ТТ 29	0,034

нения. Следовательно, по силе влияния на толщину скорлупы яиц обнаруженный QTL относится к мажорным QTL.

С помощью дисперсионного анализа были проанализированы данные для 14-ти признаков, принимая во внимание все три генотипа кур СС, СТ и ТТ (табл. 2). Для линии УК-72 только для признаков масса скорлупы в граммах ( $P = 0.06$ ), яйценоскость 60-ти недельных кур ( $P = 0.078$ ) и толщина скорлупы яиц ( $P = 0.07$ ) значения достоверности приближаются к уровню значимости  $P = 0.05$ . Масса скорлупы в граммах коррелирует с толщиной скорлупы яиц. Следовательно, эти данные согласуются друг с другом. Что касается яйценоскости 60-ти недельных кур, то это плеiotропное влияние QTL (табл. 2). Для линии УК-73 различия между генотипами кур для всех признаков не достоверны, что является следствием недостаточного числа кур генотипа СС (2 курицы). У гибридов CD достоверность данных наблюдается для массы яиц у 60-ти недельных кур ( $P = 0.002$ ) и близкие к достоверным данные для массы скорлупы по отношению к массе яйца в процентах ( $P = 0.07$ ) и массы яиц у 30-ти дневных кур ( $P = 0.09$ ). Из литературных источников известно, что корреляция между массой яичной скорлупы и массой яйца не наблюдается. Следова-

но, в данном случае имеет место плеiotропный эффект QTL, но без доминантного эффекта аллеля Т.

В итоговой табл. 3 представлены сводные данные для признаков, имеющих достоверные и близкие к достоверным данные у кур с разными генотипами и принадлежащих к линии УК-72 и межлинейному гибриду CD. К этим признакам относятся толщина скорлупы и масса скорлупы, а так же яйценоскость и масса яиц у 60-ти недельных кур. Следует отметить совпадение направление эффекта (положительное) аллеля Т как для массы скорлупы, так и толщины скорлупы (линия УК-72). Также наблюдается тенденция большего эффекта аллеля Т для массы скорлупы, чем для массы яйца. Эти тенденции хорошо согласуются с отрицательным влиянием аллеля Т на массу яйца 60 недельных кур (гибрид CD).

Таким образом, полученные результаты подтверждают ассоциацию SNP1\_2 с толщиной скорлупы яиц кур породы род-айленд. Межлинейные различия обусловлены разной частотой генотипов кур, принадлежащих той или иной линии, что обусловлено селекцией и генетическим дрейфом, имевшим место при формировании каждой линии. Впервые рассчитан эффект замещения аллелей

Таблица 2. Толщина скорлупы яиц в зависимости от генотипа кур

Линия	Признак	N	Среднее значение для всех генотипов $\pm$ ошибка среднего	Достоверность различия признака между генотипами СС, СТ и ТТ (P)
УК-72	Скорлупа, грамм	51	5.6 0 $\pm$ 0.06	0,06
	Яйценоскость, 60 недель.	51	267 $\pm$ 2	0,078
	Толщина скорлупы, мкм	51	360 $\pm$ 4	0,07
CD	Скорлупа, %	25	9.7 $\pm$ 0,1	0,07
	Масса яйца, 30 нед., гр.	25	64.6 $\pm$ 0.8	0,09
	Масса яйца, 60 нед., гр.	25	65.5 $\pm$ 0.7	0,002

Таблица 3. Связь генотипа кур с признаками яйца

Линия	Признак	Генотип	N	Среднее значение $\pm$ ошибка среднего	Стандартное Отклонение	Эффект замещения аллелей SNP2_1	P	
УК-72	Скорлупа, грамм	СТ	18	5.8 $\pm$ 0.1	0,4	СТ-СС 0.5 $\pm$ 0.2	0,06	
		ТТ	28	5.6 $\pm$ 0.1	0,5		СС-ТТ	0,23
		СС	5	5.3 $\pm$ 0.2	0,6		СТ-ТТ	0,26
	Яйценоскость, 60 нед.	СТ	18	261 $\pm$ 2	9,5	СТ-СС	0,47	
		ТТ	28	271 $\pm$ 3	18		СТ-ТТ 11 $\pm$ 5	0,027
		СС	5	265 $\pm$ 6	14		СС-ТТ	0,44
	Толщина скорлупы, мкм	СТ	18	369 $\pm$ 6	31	СТ-ТТ	0,25	
		ТТ	28	359 $\pm$ 6	33		СС-ТТ	0,11
		СС	5	335 $\pm$ 15	25		СТ-СС 35 $\pm$ 16	0,017
CD	Процент скорлупы	СТ	8	9,40 $\pm$ 0,15	0,44	СТ-ТТ 0.4 $\pm$ 0.15	0,07	
		ТТ	15	9.80 $\pm$ 0.13	0,5			
	Масса яйца, 30 нед., гр.	СТ	8	66.6 $\pm$ 1,6	4,5	СТ-ТТ 2.9 $\pm$ 0.15	0,09	
		ТТ	15	63.7 $\pm$ 0.9	3			
	Масса яйца, 60 нед., гр.	СТ	8	68.7 $\pm$ 0.9	3	СТ-ТТ 5.0 $\pm$ 0.9	0,002	
		ТТ	15	64.0 $\pm$ 0.8	3			

SNP2\_1 на толщину скорлупы и установлено доминирование аллеля Т.

**Выводы.** Многие из перечисленных ассоциаций SNP2\_1 с признаками качества яйца зависят от анализируемой линии кур, что может быть обусловлено разной частотой встречаемости генотипов СС, СТ, и ТТ, а также разной величиной неравновесия по сцеплению в линиях между SNP2\_1 и QTL, и, следовательно, от истории селекции линий. Поэтому необходимо каждую линию кур анализировать отдельно. Совместный анализ нескольких линий кур может привести к потере или искажению информации о связи SNP с признаком.

1. В результате проделанной работы нами обнаружены два мажорных QTL, имеющие плейотропный эффект на признаки яйца домашней курицы.

2. При сравнении трех генотипов SNP2\_1 достоверная ассоциация получена для массы яйца ( $P = 0.002$ ) кур у межлинейного гибрида CD. Близкая к достоверной ассоциация получена для массы скорлупы ( $P = 0.06$ ) и толщины скорлупы ( $P = 0.07$ ) яиц кур линии УК-72, а также соотношения массы скорлупы к массе яйца в процентах ( $P = 0.07$ ) для кур гибрида CD.

3. При сравнении трех генотипов SNP2\_1 в обобщенной выборке кур линии УК-72, УК-73 и межлинейного гибрида CD достоверная ассоциация

получена для яйценоскости 60-ти недельных кур ( $P = 0.02$ ), в то время как в объединенной выборке линий УК-72, УК-73 достоверная ассоциация получена для массы скорлупы  $P = 0.03$ .

4. Эффект замещения аллелей С на Т достоверен для яйценоскости 60-ти недельных кур ( $P = 0.027$ ) и толщины скорлупы ( $P = 0.017$ ) у кур линии УК-72, а также для массы яйца ( $P = 0.002$ ) у кур гибрида CD.

5. Для признака толщина скорлупы аллель Т SNP2\_1 является доминантным по отношению к аллелю С.

6. При объединении кур линии УК-72 УК-73 и гибрида CD эффект замещения аллеля С на Т достоверен как в случае СТ-СС, так и для варианта ТТ-СС. Этот факт подтверждает наличие доминирования аллеля Т в случае толщины скорлупы яйца.

7. Замещение аллеля С на Т у SNP2\_1 приводит к увеличению толщины скорлупы и яйценоскости кур, но к уменьшению массы яйца.

8. Аллели SNP3\_2 неинформативны, так как куры из линий УК-72, УК-73 и межлинейного гибрида CD были гетерозиготными.

9. Неравновесие по сцеплению между SNP2-1 и SNP3-2 равно  $r^2 = 0,04$ . Следовательно, они находятся в полном равновесии по сцеплению.

#### Литература

1. Wardecka, B. Preliminary mapping of QTLs affecting egg quality on chromosomes 1–5 in chickens / B. Wardecka, R. Olszewski, K. Jaszczak, G. Zieba, M. Pierzchala // Czech J. Anim. Sci. — 2003. — V. 48. — P. 97–105.
2. Sazanov A.A. Expression of positional candidates for shell thickness in the chicken / Sazanov A. A., Stekolnikova V. A., Korczak M. // Poultry Sci. — 2007. — V. 86. — P. 202–205.
3. Баркова О. Ю. Создание системы генотипирования Gallus gallus по аллелям rSNP (регуляторных мононуклеотидных полиморфных сайтов), оказывающих влияние на толщину скорлупы яйца / О. Ю. Баркова, А. Л. Сазанова, И. Ю. Благовещенский, К. А. Фомичев, Т. Малевски, А. А. Сазанов // Генетика. — 2011. — Т. 47. — № 2. — С. 241–248.

Barkova O. I., Smaragdov M. G.

## Affection of single nucleotide substitution 2\_1 with egg traits of domestic chicken

**Abstract.** The article considers the influence of alleles SNP2\_1 of nucleotide sequence CR523443 with traits of domestic chicken. A significant influence of alleles SNP2\_1 was revealed with the eggshell thickness and weight of eggs. Allele substitution effect T on C was revealed for egg production of 60 week old chickens ( $P = 0.027$ ) and the eggshell thickness ( $P = 0.017$ ) of UK-72 line chicken, as well as egg weight ( $P = 0.002$ ) in the chicken of CD hybrid. It can be recommended for breeding of laying hens.

**Keywords:** Quantitative trait loci, single nucleotide substitutions, signs of domestic chicken eggs.

**Authors:**

**Barkova Olga Iurevna** — candidate of Biological Science, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Organization of a Genome, All Russia Research Institute of Animal Genetics and Breeding, e-mail: barkoffws@list.ru;

**Smaragdov Michail Grigorievich** — candidate of Biological Science, Head of the Laboratory of Molecular Organization of a Genome, All Russia Research Institute of Animal Genetics and Breeding, e-mail: mik7252@yandex.ru.