

Анализ структуры неравновесия по сцеплению однонуклеотидной замены SNP2_1 последовательности CR523443 с близлежащими генами на четвертой хромосоме домашней курицы

Баркова О.Ю., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных - филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства - ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

Аннотация: Анализ структуры неравновесия по сцеплению однонуклеотидного полиморфизма SNP2_1 последовательности CR523443 с близлежащими генами COMMD, FAM199X на четвертой хромосоме кур породы род-айленд (линии 72, 73, межлинейный гибрид CD) показал высокий уровень неравновесия по сцеплению между SNP2_1 и FAM199X у линии 72 (0,962) и у гибрида CD (0,88). Из полученных данных следует, что наиболее вероятным кандидатом на эффекты QTL является малоизученный пока ген FAM199X, у человека связанный с X-хромосомой. Мажорный QTL SNP2_1 на четвертой хромосоме кур может быть рекомендован для создания системы QTL, направленных на повышение качества куриного яйца, поскольку оказывает достоверное влияние на массу яйца, упругую деформацию и толщину яичной скорлупы, что позволит ускорить процесс селекции кур-несушек.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм (SNP), локус количественных признаков (QTL), признаки яйца, аллель, куры, неравновесие по сцеплению (LD).

Введение. Признаки качества яйца имеют сложный полигенный тип наследования и контролируются многими генами, расположенными в локусах количественных признаков QTL (quantitative trait loci), проявление которых можно выявить с помощью методов молекулярной генетики, способствуя, тем самым, ускорению процесса селекции. По признакам качества яйца за последние 15 лет была накоплена большая база данных по картированию QTL с помощью микросателлитов ([\[animalgenome.org/\]\(http://www.animalgenome.org/\)\). Однако эти данные, в силу разных причин, не нашли практического применения, и экспериментальная селекция с использованием микросателлитов для улучшения прочности яичной скорлупы не была успешной \[1\]. Метод полногеномного ассоциативного анализа с помощью однонуклеотидных замен \(GWAS\) позволяет точно локализовать гены-кандидаты, и в некоторых случаях - определить замены нуклеотидов, непосредственно влияющие на тот или иной признак.](http://www.</p></div><div data-bbox=)

В настоящее время выявлено 62 QTL, ассоциированных с качеством скорлупы куриного яйца, 66 QTL, связанных с семью признаками яйценоскости, такими как интервал между снесениями яиц, возраст снесения первого яйца, количество снесенных яиц и т.д. Кроме того, 223 QTL были связаны с показателями качества яйца, такими как толщина и упругая деформация скорлупы, масса желтка и т.д.; эти данные собраны в базе данных AnimalQTLdb ([4](http://www.animalgenome.org/cgi-</p></div><div data-bbox=)



bin/QTLdb/index), данные приведены в Chicken QTLdb, (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/GG/index>). Эти QTL, в основном, относятся к минорным, которые трудно выявить современными методами.

Большинство хозяйственно ценных признаков - количественные, и определяются большим количеством генов, каждый из которых вносит очень малый вклад в формирование данного признака. Данная модель соответствует классической модели Р. Фишера «infinitesimal». Использование таких генов на практике малоэффективно, поскольку их суммарное влияние мало. Некоторые гены вносят большой вклад в формирование признака (с мажорным эффектом). Такие гены наиболее благоприятны для использования в молекулярно-генетической селекции, но они достаточно редко встречаются.

Один из методов обнаружения QTL основан на смешанной модели (Mix Model), использующей микросателлиты в качестве маркеров. В этом случае величина влияния QTL на признак измеряется либо с использованием генетической вариации, либо с помощью стандартного отклонения (σ). QTL с эффектом 0,6-1,5 σ считаются мажорными [2]. Точность этой оценки определяется количеством животных, использованных в ана-

лизе. Мощность этого анализа невелика. В этом случае эффект QTL можно косвенно оценить по величине P-value (достоверности ошибки первого рода). Чем меньше значение P, тем более мажорным является QTL. Еще один вариант оценки - определение разности значений признака между генотипами, измеренная в шкале единиц σ .

Влияние SNP2_1 последовательности CR523443 на признаки яйца можно отнести к мажорным QTL, поскольку его эффект составляет 1,0 σ ; данная последовательность показала достоверное различие генотипов породы род-айленд (97 особей) по массе яйца, упругой деформации и толщине скорлупы ($P < 0,001$). Эффект замещения аллелей СТ-СС для толщины скорлупы составил 38,3 мкм, замены СС на ТТ 33,4 мкм ($P < 0,001$). Для упругой деформации скорлупы эффект замещения аллелей СТ на ТТ составил 5,3 мм, СС на ТТ 4,0 мм ($P < 0,001$). Эффект замены аллелей для массы яйца наблюдался при замене СС-ТТ ($P < 0,001$) и составлял 1 г [3]. При сравнении трех генотипов нуклеотидной замены SNP2_1 получена достоверная ассоциация для упругой деформации ($P < 0,001$) и толщины скорлупы ($P < 0,001$) у кур популяции Аврора (137 особей). Влияния на массу яйца обнаружено не было. Эффект замещения аллелей СТ на ТТ для толщины скорлупы ($P < 0,001$)

составил 6,4 мкм, СТ на СС ($P < 0,001$) 6,3 мкм. Эффект замещения аллелей СТ на СС для упругой деформации скорлупы составил ($P < 0,002$) 2,7 мм, СТ на ТТ ($P < 0,0001$) 4,8 мм, СТ на СС ($P = 0,006$) 2,0 мм [3]. Достоверный эффект замены нуклеотидов SNP2_1 наблюдался у кур линии УК 72 породы род-айленд и популяции Аврора и составил более 1 σ [4]. Следовательно, по силе влияния на толщину и упругую деформацию скорлупы яиц обнаруженный QTL относится к каузальным мажорным QTL.

Целью данной работы являлось предварительное определение локализации QTL, маркированного SNP2_1, оказывающего достоверное влияние на массу яйца, толщину и упругую деформацию скорлупы.

Материал и методика исследований. Для определения локализации QTL, маркированного SNP2_1, использованы куры двух линий коричневоскорлупного кросса УК Кубань 7, созданных на основе генофонда породы белый род-айленд: отцовская линия УК-72 в материнской родительской форме (51 особь) и материнская линия УК-73 в материнской родительской форме с геном медленно оперения, сцепленным с полом (73 особи). В обеих линиях отбор велся, в том числе, и на повышение массы яйца. Также в эксперимен-



тах был использован двухлинейный гибрид CD родительской формы кросса Ломанн Браун (25 особей).

Дизайн аллелеспецифических олигонуклеотидов-праймеров для генотипирования кур по аллелям SNP генов COMMD и FAM199x, расположенных рядом с последовательностью CR523443, проводили на основании информации баз данных сети Интернет (www.nlm.nih.gov) при помощи компьютерной программы PRIMER_3 (www.genome.wi.mit.edu).

Анализ *in silico* был выполнен с использованием баз данных последовательностей генома кур (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi/taxid=9031 и http://www.ensembl.org/Gallus_gallus). Кодирующие последовательности внутри контигов были идентифицированы и сравнены с последовательностями известных генов других организмов с использованием пакета программ BLAST. Отбор олигонуклеотидных праймеров для SNP2_1 проводился на основе баз данных Интернета и программного обеспечения PRIMER_3. Специфичность и отсутствие возможной внутригеномной гомологии полученных последовательностей праймеров проверяли с использованием пакета программного обеспечения BLAST с переменным размером окна, приемлемым процентом идентичности пар

оснований и повторной фильтрацией.

ДНК выделяли из образцов куриной крови при помощи фенольного метода. Куры были генотипированы с использованием двух аллелеспецифических праймеров для SNP2_1, которые находятся в положении -958 от CR523443 [2].

Аллелеспецифические прямой и обратный праймеры:

C5'CTGCTCAGTGTCTTAGTCTGATCAGC3'
T5'CTGCTCAGTGTCTTAGTCTGATCAGT3'
Dn5'ACAGTCATGATGAGGAAACAGG3'.

Аллелеспецифические праймеры генов COMMD и FAM199x:

COMMDA: CATTTGGCAGCCTACTTGCTTGCA

G: CATTTGGCAGCCTACTTGCTTGCG
Dn: ACCTTTCAATCTCAACCATCCATGAA

FAM199xUp_T: AAGTGATGCCATGCTCC
TATGCCTT

Up_C: AAGTGATGCCATGCTCCTATGCCTC
Dn:CCAGGCACATTCATAGTACTGTGTGA

RS 10727014 COMMD (MET-LYS) G/A
RS 315536718 FAM199X (GLY-SER) T/C

Условия ПЦР: реакционная смесь содержала 240 нг ДНК-матрицы; реакционный буфер (20 мМ Трис-HCl, pH 8,4, и 50 мМ KCl); дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (200 мкМ каждого); 1,5 мМ MgCl₂; 1,25 единиц Taq-полимеразы (BioRad, США); и 100 нМ каждого праймера. Конечный объем реакции составлял 25 мкл. Амплификацию ДНК проводили с использованием термоциклера

IQ5 (BioRad, США). Условия реакции включали 5 мин при 95°C; 95°C в течение 30 с; 60°C в течение 30 с; и 72°C в течение 1 мин (30 циклов); 7 мин при 72°C; и 4°C - ∞. Полученные фрагменты ДНК разделяли в 1,5% агарозном геле.

Анализ неравновесия по сцеплению: полученные результаты генотипирования по аллелям SNP генов COMMD и FAM199x анализировали при помощи пакета статистической программы «Haploview 4.2».

Частоты гаплотипов определяли с помощью EM-алгоритма. LD между парами SNP оценивалось с помощью коэффициента D', предложенного Левонтином, и коэффициента корреляции r² Пирсона. Блочная структура определялась посредством алгоритма «Solid Spine LD» [5], предусмотренного программным обеспечением «Haploview 4.2», с заданным порогом D'≥0,75.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ *in vitro* последовательности CR523443. В предыдущих исследованиях *in silico* были получены следующие данные: программа, определяющая открытую рамку считывания - ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orf-finder>) - показала, что данная последовательность содержит 9 рамок считывания, распределенных по всей длине. Самая длинная

рамка считывания содержит 141 п.н., а самая короткая 84 п.н., а не единую непрерывную рамку считывания. CR523443 является последовательностью из библиотеки кДНК мышечной ткани курицы и должна содержать единую непрерывную рамку считывания. Программа GENSCAN для статистического распознавания экзон-интронных границ, промоторов и сайтов полиаденилирования генов (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) не обнаружила экзон-интронную структуру или полипептидную кодирующую последовательность в CR523443. Поиск основного промотора с использованием `GENESH 2.6` (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind>) также дал отрицательные результаты. Вышеуказанные анализы *in silico* дали основания предполагать, что CR523443 является длинной некодирующей последовательностью с неопределенной функциональной значимостью [6,7]. Кроме того, CR523443 также не была идентифицирована как ген на MapView. Рядом с CR523443 были выявлены следующие гены: COMMD5, регулируемый кальцием ген, участвующий в регуляции кровяного давления; FAM199x, принадлежащий к семейству 199 генов, связанных с X-хромосомой; RHOXF1, принадлежащий к семейству генов гомео-



бокса RHOX, члены которого участвуют в таких биологических процессах как гаметогенез, формирование стероидных гормонов и т.д. Все они являлись потенциальными генами-кандидатами для рассматриваемого QTL, причем наиболее вероятными являются FAM199x и RHOXF1. В то же время, CR523443 может представлять собой последовательность, которая является частью пре-транскрипта FAM199x и была включена в библиотеку кДНК в результате обработки пре-РНК [4]. Не исключено, что CR523443 может играть свою собственную функциональную роль в геноме кур. Таким образом, все обсуждаемые факты указывают на то, что CR523443 не является геном, кодирующим полипептид, но ее влияние на качество скорлупы яйца является достоверно высоким, что вызывает определенные вопросы.

Для идентификации гена, ответственного за наблюдаемое влияние SNP2_1 на признаки качества яиц, изучалось неравновесие по сцеплению (LD) между данной заменой и нуклеотидными заменами вышеуказанных близлежащих генов. Куры кросса Кубань анали-

зировались отдельно, поскольку линии УК 72, УК 73 и межлинейный гибрид CD различаются по происхождению и истории селекции и, следовательно, имеют разную величину LD между маркером SNP2_1 и QTL, что может исказить информацию.

В идеальной популяции по нейтральной модели на LD могут влиять два фактора - мутация и рекомбинация. Поскольку частота мутаций очень низкая ($\sim 1,1 \times 10^{-8}$ на сайт за поколение, [8]), рекомбинация оказывает большее влияние на снижение LD при обмене соответствующими хромосомными сегментами от обоих родителей во время мейоза. Вероятность рекомбинации между двумя локусами возрастает с увеличением генетического расстояния между ними, а степень LD обычно уменьшается с увеличением генетического расстояния. Для этих аллелей при небольшом расстоянии (например, 0,01 cM) друг от друга степень LD среди них все еще может уменьшаться в течение тысяч поколений [9].

Заключение. Проведенное генотипирование кур породы род-айленд (линии УК 72 и 73, гибрид



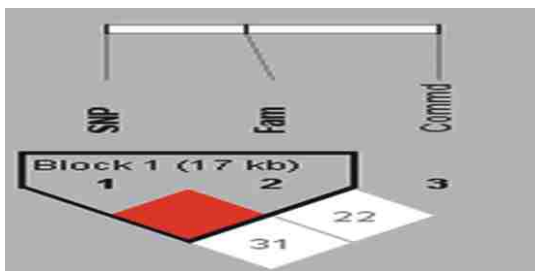


Рисунок 2. Структура неравновесия по сцеплению у линии 72 породы род-айленд. В ячейках указано значение коэффициента сцепления $D' \times 0,01$ (пустая ячейка обозначает $D'=1$), цветовая гамма отображает силу сцепления между SNPs: красный - сильное сцепление ($D'=1$, $LOD > 2$).

Таблица 1. Результаты анализа неравновесия по сцеплению у линий кур УК-72, УК-73, гибрида CD породы род-айленд

Исследуемые линии кур породы род-айленд	Комбинация аллелей	r^2	Расстояние, п.н.
Линия 72	SNP 2_1 FAM 199x	0,962	2706
	SNP2_1 COMMD	0,31	21138
	FAM COMMD	0,22	18432
Межлинейный гибрид CD	SNP 2_1 FAM 199x	0,88	2706
	SNP2_1 COMMD	0,5	21138
	FAM COMMD	0,47	18432
Линия 73	SNP 2_1 FAM 199x	0,0	2706
	SNP2_1 COMMD	0,65	21138
	FAM COMMD	0,43	18432



CD) по праймерам генов CR523443, COMMD и FAM199X и анализ LD при помощи программы Haploview (рис. 2-4 и табл. 1) показал высокий уровень LD между SNP2_1 и FAM199X (0,962; рис. 2) у линии УК 72. У гибрида CD наблюдался средний уровень LD (0,88; рис. 3). Из полученных данных следует, что наиболее вероятным кандидатом на эффекты QTL является ген FAM199X. Данный ген мало изучен; у человека данный ген связан с X-хромосомой.

Мажорный QTL (SNP2_1) на четвертой хромосоме кур может быть рекомендован для создания системы QTLs, направленных на повы-

шение качества яйца, в частности на увеличение его массы, упругой деформации и толщины скорлупы, что позволит ускорить процесс селекции кур-несушек.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России (Госзадание № ААААА-А18-118021590138-1).

Литература

- Dunn L. Genetic variability of egg quality and prospects for selection // Proc. XXIV World's Poult. Congr., Salvador, Bahia, Brazil. 2012.
- Weller J.I. Quantitative Trait Loci Analysis in Animals. 2nd ed. London, CABI Publ., 2012. 272 pp.

3. Баркова О.Ю. Ассоциация однонуклеотидной замены SNP2-1 с признаками качества яйца у кур-несушек // Птицеводство. - 2019. - № 7-8. - С. 14-18.

4. Barkova O. Y. Association of a single nucleotide substitution in the intergenic region of chromosome 4 with traits of egg quality in domestic chicken / O.Y Barkova, M.G. Smaragdov // Rus. J. Genet. - 2013. - V. 49, No 7. - P. 746-750.

5. Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps // Bioinformatics. - 2005. - V. 21. - P. 263-265.

6. Esteller M. Non coding RNAs in human disease // Nat. Rev. Genet. - 2011. - V. 18. - P. 861-872.

7. Huang W., Long N., Khatib H. Genome-

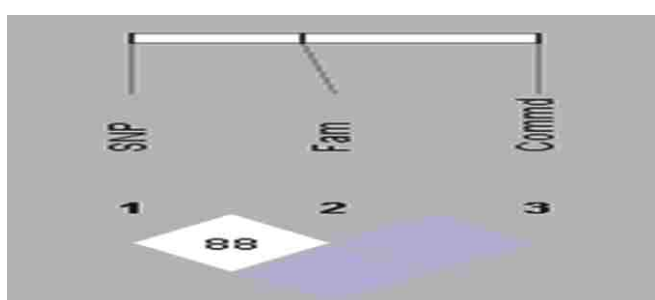


Рисунок 3. Структура неравновесия по сцеплению у гибрида CD породы род айленд

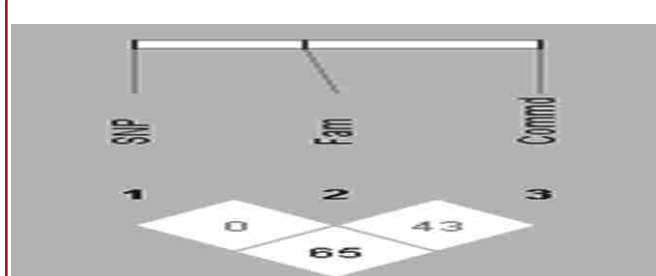


Рисунок 4. Структура неравновесия по сцеплению у линии 73 породы род айленд

wide identification and initial characterization of bovine long noncoding RNAs from EST data // Anim. Genet. - 2012. - V. 43 - P. 674-682.

8. Roach J.C., Glusman G., Smith A.F.A.,

Huff C.D., Hubley R. [et al.] Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing // Science. - 2010. - V. 328. - P. 636-639.

9. Kimura M. The Neutral Theory of

Molecular Evolution. Cambridge Univ. Press, 1984.

Для контакта с автором:

Баркова Ольга Юрьевна

E-mail: barkoffws@list.ru



The Analysis of Linkage Disequilibrium between SNP2_1 in CR523443 Sequence and the Adjacent Genes in Chromosome 4 in Chicken

Barkova O.Yu.

Federal Scientific Center for Animal Husbandry of L.K. Ernst

Summary: The analysis of linkage disequilibrium (LD) between the single nucleotide polymorphism SNP2_1 in CR523443 sequence and the adjacent genes in chromosome 4 (COMMD, FAM199X) in different genotypes of Rhode Island chicken (preparental lines UK-72 and UK-73 of UK Kuban-7 cross and parental interline hybrid CD of Lohmann Brown cross) revealed the high levels of LD between SNP2_1 and FAM199X in UK-72 (0.962) and CD (0.880). These results suggest that FAM199X is the most prospective candidate gene for QTL effects; this understudied gene is linked with X chromosome in human. Major QTL SNP2_1 in chromosome 4 in chicken can be recommended for the development of a system of QTL aimed at the improvement of egg quality due to its significant effects on egg weight and on the thickness and strength (elastic deformation) of the eggshell. This system can accelerate the process of selection of laying hens.

Key words: single nucleotide polymorphism (SNP), quantitative trait loci (QTL), egg quality traits, allele, chicken, linkage disequilibrium (LD).

ОТРАСЛЕВЫЕ НОВОСТИ

Минсельхоз сохранил прогноз по сбору зерна в 2020 году

В условиях пандемии вируса COVID-19 и введенных ограничительных мер Минсельхоз сохраняет прогноз по сбору зерна в этом году. В 2020 году планируется сбор 125,3 млн тонн зерна против 121,2 млн в 2019 году, подтвердил прогноз первый замминистра сельского хозяйства Джамбулат Хатуов. Ранее источники "Ъ" рассказывали о проблемах с посевной.

Общая площадь посевов в этом году должна составить более 80 млн га. При этом господин Хатуов добавил, что на собираемые объемы еще могут повлиять некоторые факторы, в том числе наличие осадков. «Мы все же прогнозируем и ждем, что осадки, необходимые для вегетации определенных культур, мы получим в полном объеме. Но из зимы вышли с определенном дефицитом», — сказал он журналистам (цитата по ТАСС).

Ранее стало известно о сложностях, с которыми столкнулись сельхозпроизводители на юге России. По оценкам источников "Ъ", проблемы с проведением посевной кампании из-за введенных ограничений могут повлиять на обеспечение страны продовольствием.

Источник: kommersant.ru