

Обзор значимых локусов количественных признаков, ассоциированных с качеством скорлупы яиц кур

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: Рассмотрены последние данные исследований молекулярной генетики кур, которые могут способствовать повышению яичной продуктивности птицы отечественной селекции. Современные технологии селекции используют ДНК-маркеры, которые помогают идентифицировать локусы количественных признаков (QTL), связанные с признаками яйценоскости. Маркерная селекция может значительно ускорить процесс селекции птицы по хозяйственно-полезным признакам. Идентификация многочисленных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в геномах животных, прогресс в области высокопроизводительного секвенирования, разработка вычислительных методов анализа данных SNP, выполняемых с помощью массивов высокой плотности, позволили использовать их в геномном картографировании генов-кандидатов. В данной работе проанализированы литературные данные, полученные при помощи полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) для отбора QTL и генов-кандидатов, влияющих на яйценоскость, массу, прочность и толщину яичной скорлупы для дальнейшего создания системы QTL, отвечающей за яичную продуктивность кур-несушек и качество яиц.

Ключевые слова: локусы количественных признаков (QTL), однонуклеотидный полиморфизм (SNP), куры, качество яиц, масса скорлупы, прочность скорлупы.

Фундаментальной основой селекции кур является выбор конкретных особей с желаемыми качествами. Селекция современных несушек длится десятилетия, но в процессе разведения яичных пород селекционеры столкнулась с двумя основными проблемами: сложность измерения фенотипических параметров для каждой особи и отсутствие данных о влиянии петухов на яичную продуктивность. Несмотря на успех, достигнутый в птицеводстве за последние десятилетия, традиционные программы разведения не могут в полной мере решить задачи по ускорению селекционного процесса по увеличению яичной продуктивности и качеству яйца. Современные технологии молекулярной генетики и наличие ДНК-маркеров, помогающих идентифицировать ло-

кусы количественных признаков (QTL), отвечающие за признаки яйца, и использовать их в маркерной селекции позволяют значительно ускорить селекционный процесс [1].

Анализ популяций с помощью микросателлитных и SNP-маркеров (SNP – single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм) позволил выявить тысячи QTL, оказывающих влияние на экстерьер, здоровье, физиологию и продуктивные качества кур. Несмотря на то, что выявлено множество QTL и некоторые каузальные гены, применение этих результатов в коммерческих линиях кур по-прежнему неосуществимо из-за точности картирования QTN (нуклеотиды количественных признаков). Идентификация многочисленных SNP в геномах животных, про-

гресс в секвенировании с высокой пропускной способностью, развитие и разработка вычислительных методов для анализа данных SNP-чипов высокой плотности сделали возможным использование геномной оценки в животноводстве. Успехи исследования генома, такие как полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) для обнаружения локусов, влияющих на молочную продуктивность, рождаемость и рост у крупного рогатого скота [2], вызвало интерес к использованию SNP-платформ с высокой плотностью генотипирования для идентификации нуклеотидных последовательностей, влияющих на яичную продуктивность и количественные признаки у кур.

В настоящее время выявлено 784 QTL, ассоциированных с качеством скорлупы куриного





яйца, и QTL, связанных с такими признаками как яйценоскость (315), масса яйца (382); эти данные собраны в базе AnimalQTLdb (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>).

Во всем мире для потребления человеком производится миллиарды яиц ежегодно. Изменения свойств яичной скорлупы напрямую связаны с повышением риска болезней пищевого происхождения для потребителя. Низкое качество яичной скорлупы также приводит к большому количеству треснувших яиц при автоматической сортировке и упаковке в условиях их промышленного производства. С другой стороны, яичная скорлупа является биологически значимой структурой для развития эмбриона, контролируя газообмен и обмен кальция у развивающегося цыпленка. Эмбрионы из яиц с тонкой скорлупой имеют высокую смертность из-за высоких потерь воды во время инкубации. Более того, масса яичной скорлупы уменьшается в процессе старения кур-несушек, что препятствует продлению цикла яйцекладки, поэтому понимание механизма генетического контроля качества скорлупы с возрастом несушек имеет большое экономическое и биологическое значение [3].

В 2016 г. были опубликованы данные первого GWAS-анализа популяции кур с чипом SNA (60 K) средней плотности для уточнения ассоциаций с признаками качества яйца, такими как масса, толщина и упругая деформация скорлупы, в 11 временных точках от начала яйцекладки до 72 недель жизни [4]. Почти весь значимый локус находился в районе, охватывающем 57,3 до 71,4 Mb хромосомы 1 (GGA1). Всего выявлено пять значимых миссенс-мутаций на GGA1 и одна – на GGA4. Они локализованы в 6 генах: фосфатидилинозитол-4-фосфат-3-киназа, каталити-

ческая субъединица типа 2 гамма (PIK3C2G); инозитол 1,4,5-трифосфатный рецептор типа 2 (ITPR2); RecQ-подобная геликаза (RECQL); С-член 9 подсемейства АТФ-связывающей кассеты (ABCC9) и кандидат на восприимчивость к раку 1 (CASC1) на GGA1 и не-SMC-субъединица G-комплекса конденси-на I (NCAPG) на GGA4. Тем не менее, только два SNP, rs312347405 и rs316607577, расположенные на PIK3C2G и ITPR2, оставались наиболее ассоциированными с признаками качества скорлупы после многомерного GWAS.

Аллели rs312347405 в гене PIK3C2G оказывали наибольшее влияние на фенотипическую изменчивость качества скорлупы. Куры, гомозиготные по rs312347405 аллелям GG, несли яйца с высокой прочностью скорлупы, которая уменьшалась по мере старения несушек. Ген PIK3C2G принадлежит к семейству фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), содержит липид-киназную каталитическую область, а также С-концевой C2 домен, который действует как кальций-связывающий фосфолипид [5]. Протеомный анализ выявил высокую концентрацию липид-связывающих белков, таких как внеклеточный белок, связывающий жирные кислоты (экс-FABP), просапозин и аполипопротеин D, в белковом матриксе скорлупы. Анализ ассоциаций выявил ген, связанный с рецептором липопротеина низкой плотности белка 8 (LRP8), как нового кандидата в матриксе скорлупы, значительно ассоциированного с качеством скорлупы яйца [4]. PIK3C2G, за счет домена C2, действует как мотив связывания липидов и также ассоциирован с образованием яичной скорлупы; он может опосредовать транслокацию белков на липидные мембраны, а также регулирует белок-белковые взаимодействия у человека и млекопитаю-

щих. Взаимодействие белков матрикса и кальцита образуют биокерамическую структуру яичной скорлупы [6].

Ген ITPR2, в котором расположен SNP rs316607577 (экзон 25), был позиционным и функциональным геном-кандидатом для качества яичной скорлупы. Мутация rs316607577 гена ITPR2 является неконсервативной заменой серина на глицин, при этом глицин-кодирующий аллель ассоциируется с более прочной яичной скорлупой. Ген ITPR2 был известен как медиатор в эндоплазматическом ретикулуме, запускающий процесс высвобождения кальция путем мобилизации его ионов из внутриклеточного депо во многих типах клеток [4]. ITPR2 выявлен в маточной эпителиальной ткани у кур, и его экспрессия в матке во время кальцификации яичной скорлупы была значительно выше, чем в яйцеводе и 12-перстной кишке, которые также характеризуются активным метаболизмом кальция. ITPR2 играет роль в регуляции внутриклеточного транспорта ионного кальция в матке и способствует процессу кальцификации скорлупы.

Вследствие этого PIK3C2G и ITPR2 были впервые рассмотрены как первичные гены-кандидаты, связанные с качеством яичной скорлупы [4].

В другом исследовании было выявлено 66 QTL, ассоциированных с 7 признаками яичной продуктивности, такими как интервал между яйцекладкой, возраст снесения первого яйца, количество снесенных яиц и т.д., и 223 QTL, ассоциированных с признаками качества яйца, такими как толщина, масса и упругая деформация скорлупы и т.д. (см. Chicken QTLdb); путем проведения ассоциативного анализа маркеров внутри или рядом с генами-кандидатами было выявлено несколько нуклеотидных замен,



влияющих на качество яиц [7]. Значимым достижением вышеуказанного исследования является то, что большинство SNPs, найденные в геноме кур, находятся в пределах известных генов, указывающих на наличие неравновесия по сцеплению между SNP-маркерами и каузальными мутациями внутри или вблизи генов, хотя функции и характеристики данных генов детально изучены не были. Идентификация этих локусов может дать новые сведения о генетических основах яичной продуктивности. Авторы определили несколько важных SNP, влияющих на массу скорлупы в разном возрасте; так, один значительный SNP (rs13636444), связанный с этим признаком, находится во втором интроне гена GALNT1. У человека некоторые нуклеотидные мутации GALNT1 могут вызывать рак яичников. С другой стороны, «дикий» тип гена GALNT1 может обеспечить нормальные функции яичника человека [8]. Характеристика этого гена у кур все еще до конца не изучена, и названное исследование является первой работой о том, что полиморфизм данного гена связан с качеством яйца.

Другой SNP (rs14411624), связанный с массой скорлупы, расположен на GGA3 в гене тирозиновой протеинкиназы BLK, и может быть новым QTL, поскольку он не совпадает с ранее сообщенными QTL или генами-кандидатами для данного признака у кур [7]. В этом предполагаемом районе QTL существует множество известных генов, включая гены, связанные с ДНК-модификацией, транскрипцией, репликацией и РНК-трансляцией (NEIL2, GATA4, MCM3 и TRAM2); гены, связанные с иммунными функциями организма (IL17, антимикробный пептид CNP1 и кластер гена бета-дефензина); ген, играющий роль в гомеостазе кальция

(EFHC1). Функции большинства генов, упомянутых выше, не полностью изучены у кур, хотя они широко изучались у человека [9].

Был также выявлен SNP rs14022717 на GGA11, имеющий значительную ассоциацию с массой скорлупы и расположенный в третьем интроне гена ZNF536, который кодирует ДНК-связывающий белок и функционирует как транскрипционный репрессор. Это первое сообщение о том, что ZNF536 может влиять на массу скорлупы яйца у кур. Многие области QTL, влияющие на толщину яичной скорлупы, были обнаружены предыдущими исследованиями и расположены на GGA1, GGA2, GGA5 и GGA7. Некоторые гены-кандидаты для толщины яичной скорлупы также были идентифицированы на GGA2, GGA4, GGA8 и GGA9 [7]. Обнаружены две ассоциации на GGA1 для толщины скорлупы: rs13978498, который находится в гипотетическом локусе LOC418918, а другой – rs13968878 в известном гене ENOX1 (ecto-NOX дисульфид-тиоловый обменник 1), который участвует в клеточном иммунитете и росте, способствуя клеточной выживаемости. Район покрывает эти два SNP от 171,22 Мб до 179,35 Мб на GGA1, который может быть новым QTL для толщины скорлупы, и около 70 Мб от QTL, о котором сообщалось в исследовании [10].

В исследовании [11] установлен наиболее значимый SNP (GGaluGA315030), имеющий ассоциацию с яйценоскостью, локализованный в интроне 12 гена GRB14 и кодирующий фактор роста рецептор-связывающего белка. У человека и млекопитающих ген GRB14 имеет высокие уровни экспрессии в яичнике, печени, почках, скелетных мышцах. Он взаимодействует с рецепторами инсулина (IR) и инсулиноподобным рецептором фактора роста

(IGFR), и может играть ингибирующую роль сигнальных путей тирозинкиназного рецептора. Известно, что IGF и IGFR у кур регулируют функции яичников и развитие в нем фолликулов. Хотя функция GRB14 у кур не определена, она может сочетаться с системой IGF и влиять на яйценоскость. Также был выявлен значимый SNP rs317449530, локализованный в 3'-UTR в гене GTF2A1 на GGA5 для признака яйценоскости. GTF2A1 является общим фактором транскрипции и взаимодействует с TFIIID-промоторным комплексом, необходимым для инициации транскрипции, посредством РНК-полимеразы II. Он используется в медицине как точный биомаркер для выявления овариальной опухоли [11].

Возраст снесения первого яйца характеризует скорость полового созревания кур; на него влияет несколько факторов, таких как питание, продолжительность светового дня и генетический потенциал. SNP GGaluGA092322 во втором интроне гена ODZ2 имел значительную ассоциацию с вышеуказанным признаком [11]. ODZ2, также известный как тенеурин 2, кодирует белок поверхности нейронных клеток и играет важную роль в развитии нервной системы. Было обнаружено, что тенеурин имеет значительный уровень экспрессии в развивающемся мозге цыплят, и особенно в зрительной системе, включая сетчатку и зрительный тектум [12]. В этом исследовании было впервые выявлено, что тенеурин 2 может влиять на половую зрелость молодых. Кроме того, некоторые предыдущие исследования показали, что интенсивность света влияет на возраст снесения первого яйца, и более длительные периоды воздействия света на кур могут привести к более ранней половой зрелости. Поскольку световой день стимулирует яйцекладку, главным образом,



через зрительную и нервную системы, гены, связанные с этими системами, могут влиять на половую зрелость у кур [11].

Основываясь на результатах GWAS при помощи Affymetrix Axiom 600K Chicken Genotyping Array (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), китайские ученые [13] идентифицировали геномную область на хромосоме 20, включающую несколько генов-кандидатов: EDN3, BMP7, BPIFB3 и PCK1, участвующих в развитии гребня и репродуктивной системы кур. Проведенный анализ ассоциации вышеуказанных генов с яичной продуктивностью подтвердил плейотропный эффект выбранных локусов и идентифицировал 37 SNP, в значительной степени связанных с яйценоскостью. Данные SNP тесно распределены на хромосоме 20, которая охватывала область размером 2,4 Мб от 10785 456 до 13243 956 п.н., включая гены EDN3 и BMP7, что указывает на геномную область, оказывающую сильное влияние на яйценоскость. Эти два гена играют известную роль в регуляции как функции яичников, так и меланогенеза, что указывает на плейотропный эффект на гиперпигментацию и яйценоскость у кур местной китайской синескорлупной породы дунсян (Dongxiang). Эндотелины (EDN) представляют собой вазоактивные пептиды, состоящие из 21 аминокислоты, которые играют роль в различных репродуктивных процессах, таких как образование стероидных гормонов, фолликулогенез и овуляция. Обнаружено, что экспрессия EDN3 повышена в яичниках у кур с темными гребнями. Основываясь на плейотропных эффектах EDN3, авторы пришли к выводу, что повышенная экспрессия EDN3 увеличивает меланогенез

и ингибирует фолликулогенез, что приводит к ассоциации между цветом гребня и яйценоскостью. Ген BMP7 выполняет известные функции в фолликулогенезе и овуляции у млекопитающих и кур: он может увеличивать экспрессию гена рецептора фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в клетках гранулезы человека и снижать экспрессию гена рецептора лютеинизирующего гормона. Он также увеличивает выработку эстрадиола, стимулируя активность ФСГ. У кур BMP7 может способствовать развитию фолликулов, стимулируя пролиферацию гранулезных клеток. Установлено подавление экспрессии BMP7 в яичниках у кур с темными гребнями, что потенциально может быть связано с яйценоскостью и количеством меланина [12].

В результате многолетних исследований нами было выявлено два мажорных и каузальных QTL на 4 хромосоме кур, значительно ассоциированных с яичной продуктивностью. Первый SNP rs14491030 находится в 14 экзоне гена NCAPG (не-SMC-субъединице CAP-G комплекса конденсина I) в позиции 78775527 п.н. и оказывает значительное влияние на массу яйца [14]. Конденсин I является субъединичным белковым комплексом структурного поддержания хромосом (SMC), основной функцией которого является компактизация хроматина и разделение хроматид в ходе их митотической сегрегации, а также участвует в регуляции экспрессии, рекомбинации и репарации генов. Ген NCAPG у крупного рогатого скота на 6 хромосоме определяет рост, вес, отложение жира, потребление корма и мясную продуктивность [15]. Таким образом, ген NCAPG имеет тенденцию оказывать влияние на признаки роста животных.

Второй SNP 2_1 нуклеотидной последовательности CR523443 был выявлен при анализе экспрессии в реальном времени тканей яйцевода и значительно ассоциирован с толщиной и упругой деформацией скорлупы и массой яйца [16].

По влиянию на признаки яйца данные SNP можно отнести к мажорным QTL, поскольку их эффект составляет одну сигму, что дает возможность использовать их в качестве селекционного маркера по признакам: масса яйца, толщина и упругая деформация скорлупы [14,16].

Система QTL, влияющих на яйценоскость кур, будет создана путем интеграции литературных данных с собственными экспериментальными данными. Стратегия обнаружения QTL основана на наличии в геноме гомозиготных участков хромосом как признаков интенсивного отбора кур по яичной продуктивности. Для решения этой проблемы будут использоваться технология массивов SNP и методы обнаружения расширенной гомозиготности гаплотипов (ЕНН), таких как XP-ЕНН, hapFLK и XP-CLR. Основой для определения QTL, влияющих на яйценоскость, будут разные породы кур (декоративные, мясные и яичные). Среди обнаруженных областей ЕНН будут выбраны только те, которые либо совпадают с QTL из литературных источников, либо включают гены, потенциально участвующие в яичной продуктивности.

Литература

1. Matukumalli L.K., Lawley C.T., Schnabel R.D., Taylor J.F., Allan M.F. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle // PLoS One. – 2009. – V. 4. – P. e5350.
2. Sahana G., Guldbbrandtsen B., Bendixen C., Lund M.S. Genome-wide as-



- sociation mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle // *Anim. Genet.* – 2010 – V. 41. – P. 579–588.
3. Meir M., Ar A. Changes in eggshell conductance, water loss and hatchability of layer hens with flock age and moulting // *Brit. Poult. Sci.* – 2008. – V. 49, No 6. – P. 677–684.
 4. Sun C., Qu L, Yi G, Yuan J, Duan Z, Shen M, Qu L, Xu G, Wang K., Yang N. Genome-wide association study revealed a promising region and candidate genes for eggshell quality in an F2 resource population // *BMC Genomics.* – 2015. – V. 16. – P. 565.
 5. Yao J.F., Chen Z.X., Xu G.Y., Wang X.L., Ning Z.H., [et al.] Low-density lipoprotein receptor-related protein 8 gene association with egg traits in dwarf chickens // *Poult. Sci.* – 2010. – V. 89, No 5. – P. 883–886.
 6. Balla T. Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions // *J. Cell Sci.* – 2005. – V. 118, No 10. – P. 2093–2104.
 7. Dunn I.C., Joseph N.T., Bain M., Edmond A., Wilson P.W. Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hen // *Anim. Genet.* – 2009. – V. 40. – P. 110–114.
 8. Sellers T.A., Huang Y., Cunningham J., Goode E.L., Sutphen R. Association of single nucleotide polymorphisms in glycosylation genes with risk of epithelial ovarian cancer // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2008 – V. 17. – P. 397–404.
 9. Sasaki O., Odawara S., Takahashi H., Nirasawa K., Oyamada Y. [et al.] Genetic mapping of quantitative trait loci affecting body weight, egg character and egg production in F2 intercross chickens // *Anim. Genet.* – 2004. – V. 35. – P. 188–194.
 10. Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D. [et al.] Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – P. 16899–16903.
 11. Liu W., Li D., Liu J., Chen S., Qu L., Zheng J., Xu G., Yang N.A. Genome-wide SNP scan reveals novel loci for egg production and quality traits in White Leghorn and Brown-Egg Dwarf layers // *PLoS One.* – 2011. – V. 6, No 12. – P. e28600
 12. Kenzelmann D., Chiquet-Ehrismann R., Leachman N.T., Tucker R.P. Teneurin-1 is expressed in interconnected regions of the developing brain and is processed in vivo // *BMC Dev. Biol.* – 2008. – V. 8. – P. 30.
 13. Dong X., Li J., Zhang Y., Han D., Hua G., Wang J., Deng X., Wu C. Genomic analysis reveals pleiotropic alleles at EDN3 and BMP7 involved in chicken comb color and egg production // *Front. Genet.* – 2019. – V. 10. – P. 612.
 14. Barkova O.Y., Smaragdov M.G. Association of a nonsynonymous substitution in the condensin NCAPG gene with traits of eggs in laying hens // *Rus. J. Genet. Appl. Res.* – 2016. – V. 6, No 8. – P. 804–808.
 15. Eberlein A., Takasuga A., Setoguchi K. [et al.] Dissection of genetic factors modulating fetal growth in cattle indicates a substantial role of the non-SMC condensin I complex, subunit G (NCAPG) gene // *Genet.* – 2009. – V. 183, No 3. – P. 951–964.
 16. Баркова О.Ю. Ассоциация однонуклеотидной замены SNP2-1 с признаками качества яйца у кур-несушек // *Птицеводство.* – 2019. – № 7–8. – С. 14–18.

Для контакта с автором:

Баркова Ольга Юрьевна
E-mail: barkoffws@list.ru

Overview of Significant Quantitative Trait Loci Associated with Eggshell Quality in Chicken

Barkova O.Yu.

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

Summary: *The recent data on molecular genetics of chicken are reviewed which can contribute to the improvement of egg productivity in domestically selected chicken. Current selection strategies involve DNA markers to identify quantitative traits loci (QTL) associated with egg productivity; marker assisted techniques can significantly accelerate the selection for economically valuable traits. The identification of numerous single-nucleotide polymorphisms (SNP) in animal genomes, progress in high-performance sequencing, and the development of computational methods for analysis of SNP data using high-density arrays have allowed for the use of SNP in genomic mapping of candidate genes. In the study presented the published data of the genome-wide association studies (GWAS) aimed at the identification of QTL and candidate genes which affect egg production, weight, thickness and strength of the eggshell in chicken are reviewed; these data will be used for further development of the QTL system responsible for egg production and quality traits in laying hens.*

Keywords: *quantitative trait loci, single-nucleotide polymorphism, chicken, egg quality, eggshell weight, eggshell strength.*