

АССОЦИАЦИЯ ЗАМЕНЫ RS13730111 В ГЕНОМЕ КУР РУССКОЙ БЕЛОЙ ПОРОДЫ С УРОВНЕМ ВЫХОДА ЭКСТРАЭМБРИОНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В ЭМБРИОНАХ

О. В. МИТРОФАНОВА, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики,
Н. В. ДЕМЕНТЬЕВА, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики,
Е. С. ФЕДОРОВА, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц,
А. П. ДЫСИН, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной генетики,
Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста
(196601, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а; e-mail: mo1969@mail.ru)

Ключевые слова: куриный эмбрион, выход экстраэмбриональной жидкости, куры, русская белая порода, SNP, полиморфизм.

В настоящее время развивающиеся эмбрионы кур продолжают оставаться сырьем для производства вирусных вакцин. Существует потребность в селекционных решениях, направленных на получение яиц, содержащих высокий уровень выхода экстраэмбриональной жидкости (ВЭЭЖ). В биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» на основе популяции русских белых кур ведется работа по созданию линий птицы с высоким ВЭЭЖ. Цель настоящей работы – выявить ассоциацию замены С/Т в положении rs13730111 в геноме кур-матерей с различным уровнем ВЭЭЖ у эмбрионов, а также охарактеризовать эмбрионы кур по данным зоотехнического учета. Обнаружено, что показатель ВЭЭЖ в куриных эмбрионах ассоциирован с генотипом матерей по замене rs13730111. Наибольший ВЭЭЖ эмбрионов наблюдался у кур, обладавших гомозиготным генотипом ТТ ($n = 3$, $p < 0,05$), наименьший – у особей с генотипом СС ($n = 87$, $p < 0,05$). При этом в популяции с частотой 0,8 встречался аллель С, а частота аллеля Т составила всего 0,2. Отклонения от генетического равновесия обнаружено не было ($\chi^2 = 2,4$ при $f = 1$). Оценка данных зоотехнического учета куриных эмбрионов показала, что распределение по признаку ВЭЭЖ приближается к нормальному. Средний выход жидкости у эмбрионов ($n = 431$) составил $11,7 + 2,06$ мл. Отмечена высокая положительная корреляция ($r = 0,599$) между массой яйца при закладке на инкубацию и ВЭЭЖ. Повышение процента усушки яйца в ходе развития эмбриона приводит к снижению ВЭЭЖ ($r = -0,334$). Обнаруженные закономерности можно использовать при оценке птицы в ходе селекции.

ASSOCIATION OF THE REPLACEMENT OF RS13730111 IN THE GENOME OF THE CHICKENS OF THE RUSSIAN WHITE BREED WITH THE EXTREME EMBRYONIC FLUID OUTPUT LEVEL IN EMBRYOS

O. V. MITROFANOVA, candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of molecular genetics,
N. V. DEMENTIEVA, candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of molecular genetics,
E. S. FEDOROVA, candidate of biological sciences, senior researcher of department of genetics, breeding and conservation of genetic resources of agricultural birds,
A. P. DYSIN, research assistant of the laboratory of molecular genetics,
All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry – All-Russian Institute of Animal Husbandry named after academician L. K. Ernst
(55a Moscow highway, 196601, St. Petersburg, Pushkin; e-mail: mo1969@mail.ru)

Keywords: chicken embryo, extraembryonic fluid yield, chickens, Russian white breed, SNP, polymorphism.

Currently, developing chicken embryos continue to be the raw material for the production of viral vaccines. There is a need for breeding solutions aimed at obtaining eggs containing a high level of extraembryonic fluid (YEF). In the RRIFAGB bioresource collection "Genetic collection of rare and endangered breeds of chickens" on the basis of the population of Russian white chickens, work is underway to create poultry lines with high extraembryonic fluid outlet. The purpose of this work is to identify the association of C/T substitutions in the rs13730111 position in the genome of mothers with different levels of YEF in embryos, and also to characterize the embryos of chickens according to zootechnical accounting. It was found that the YEF release in chick embryos is associated with the genotype of mothers by replacing rs13730111. The highest YEF of embryos was observed in chickens with a homozygous TT genotype ($n=3$, $p<0.05$), the smallest - in individuals with the CC genotype ($n = 87$, $p<0.05$). At the same time, the allele C was found in the population with a frequency of 0.8, and the frequency of the allele T was only 0.2. No deviations from genetic equilibrium were found ($\chi^2 = 2.4$ with $f = 1$). Evaluation of zootechnical records of chicken embryos showed that the distribution on the basis of the YEF is approaching normal. The average fluid yield in embryos ($n = 430$) was $11.7 + 2.06$ ml. There was a high positive correlation ($r = 0.599$) between the egg mass when laying on the incubation and the YEF. An increase in the percentage of egg drying during the development of the embryo leads to a decrease in the yield of extraembryonic fluid ($r = -0.334$). The observed patterns can be used in the evaluation of birds during breeding.

Введение

В настоящее время развивающиеся эмбрионы кур (РЭК) продолжают оставаться базой для производства вирусных вакцин. Существует потребность в селекционных решениях, направленных на получение яиц, содержащих высокий выход экстраэмбриональной жидкости (ВЭЭЖ). Повышение ВЭЭЖ приводит к увеличению титра вируса, что дает существенный экономический эффект для производителей биологических препаратов.

Генофондные породы кур отличаются фенотипическим разнообразием по сравнению с промышленной птицей, обладают высоким уровнем адаптации к различным условиям окружающей среды, качественным мясом, уникальными генетическими особенностями и внешним видом [1]. Одной из таких пород является русская белая, разведение которой началось с 1929 года со скрещивания местных цыплят с представителями породы белый леггорн, импортированной из Дании, Великобритании и США в Пятигорский и Кучинский племенные центры [2].

С 1953 года русские белые куры разводятся на базе биоресурсной коллекции «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (ВНИИГРЖ) (<http://vniigen.ru/ckp-geneticheskaya-kollekciya-redkix-ischezayushhix-porod-kur/>). До 2003 года популяция подвергалась сильному селекционному давлению, направленному на отбор цыплят по устойчивости к низким температурам выращивания. Этот признак предположительно контролировался рецессивным геном *sw*, определяющим цвет пуха у суточных цыплят [3]. В настоящее время русские белые куры используются для создания линий птицы, пригодной для производства вирусных вакцин. Использование развивающихся куриных эмбрионов позволяет увеличить производство вакцин и расширить спектр вирусов, культивируемых в лаборатории [4].

Большой интерес к экстраэмбриональной жидкости куриных эмбрионов направлен на изучение ее физико-биохимической структуры [5], анализа содержащихся в ней белков [6] или иммунологических свойств [7]. В то же время генетика признака ВЭЭЖ в развивающихся эмбрионах кур изучена недостаточно, мало внимания уделяется и ассоциациям этого признака с другими показателями [8]. Сканирование генома кур русской белой породы с помощью чипа Illumina 60KBeadChip позволило выявить значимые однонуклеотидные замены, достоверно влияющие на уровень ВЭЭЖ. В первую очередь это замена С/Т в положении rs13730111 на хромосоме 2 у кур [9]. Дальнейшее изучение выявленных ассоциаций и отбор по полиморфным вариантам в этой замене может стать основой для проведения раннего отбора кур.

Цель и методика исследований

Цель нашего исследования – выявить ассоциацию замены С/Т в положении rs13730111 в геноме кур-матерей с различным уровнем ВЭЭЖ у эмбрионов, а также охарактеризовать эмбрионы кур по данным зоотехнического учета.

Материалом для исследования послужили данные по двум группам кур:

1) родительская группа (n = 141), которая была прогенотипирована с помощью чипа Illumina 60KBeadChip по замене в положении rs13730111 и оценена по уровню выхода экстраэмбриональной жидкости (мл) в эмбрионах;

2) 12,5-суточные эмбрионы (n = 430), полученные от потомков оцененных кур, для которых измеряли следующие показатели: массу яйца (г) при снесении, массу яйца (г) на 12,5 суток инкубации, усушку (%), выход экстраэмбриональной жидкости (мл), массу эмбриона (г).

Массу яйца и эмбрионов определяли путем взвешивания на весах марки «Госметр» с точностью до 0,1 г. Объем выхода экстраэмбриональной жидкости измеряли с помощью мерного цилиндра (точность 0,1 мл). Процент усушки рассчитывали по формуле: (масса яйца на 12,5 суток инкубации / масса яйца при закладке) × 100 (%).

Данные по фенотипической вариабельности исследуемых признаков были обработаны биометрически с использованием программы Microsoft Office Excel 2007. При этом вычислены следующие величины: среднеарифметическая (M), среднеквадратическая ошибка ($\pm m$) и уровень значимости (p).

Результаты исследований

На основании полногеномного генотипирования родительской группы кур были получены частоты генотипов и аллелей по замене rs13730111. Подавляющее большинство особей в группе составили гомозиготы СС (n = 87), а реже всего встречались куры с генотипом ТТ (n = 3). В результате в изученной популяции наблюдалось преобладание аллеля С.

При этом рассчитанное для группы значение $\chi^2 = 2,4$ ниже критического ($\chi^2 = 3,84$, при f = 1), а значит, популяция находится в генетическом равновесии (таблица 1).

При сравнении уровня выхода экстраэмбриональной жидкости у кур с разными генотипами наибольшие значения наблюдались у гомозигот ТТ, которые достоверно превосходили по этому показателю кур с генотипом СС. Достоверные отличия по уровню амниотической жидкости отмечены также между курами с генотипом СС и гетерозиготами СТ (таблица 1).

На рис. 1 представлен график распределения 12,5-суточных эмбрионов (n = 430), потомков родительской популяции, по уровню выхода амниоти-

Таблица 1
Выход экстраэмбриональной жидкости (ВЭЭЖ) в эмбрионах кур в зависимости от генотипов по замене rs13730111
Table 1
Output of extraembryonic fluid in chick embryos depending on genotypes by replacing rs13730111

Показатели <i>Indicators</i>	Генотипы <i>Genotypes</i>			Аллели <i>Alleles</i>	
	СС	СТ	ТТ	С	Т
Поголовье, п <i>Livestock, n</i>	87	51	3		
Частота <i>Frequency</i>	0,62	0,36	0,02	0,8	0,2
ВЭЭЖ, мл <i>YEF, ml</i>	8,96 ± 0,16 ^{1,2}	10,14 ± 0,23 ¹	12,20 ± 1,56 ²		

^{1,2} различия статистически значимы, $p < 0,05$

^{1,2} the differences are statistically significant, $p < 0.05$

Таблица 2
Вариабельность фенотипических признаков 12,5-суточных эмбрионов (n = 430) кур русской белой породы
Table 2
Variability of phenotypic characteristics of 12.5-day embryos (n = 430) of Russian white breed chickens

Показатели <i>Indicators</i>	М ± m	Среднее <i>Median</i>	Минимум <i>Min</i>	Максимум <i>Max</i>
Масса яйца, г <i>Egg weight, g</i>	58,59 ± 5,01	58,3	45,9	77,0
Масса яйца на 12,5 сутки инкубации, г <i>The weight of the eggs on the 12.5 day incubation, g</i>	54,3 ± 4,88	54,0	42,0	70,6
Масса эмбриона, г <i>Embryomass, g</i>	5,69 ± 0,56	5,7	2,9	7,1
ВЭЭЖ, мл <i>YEF, ml</i>	11,7 ± 2,06	12,0	6,5	17,0
Усушка, % <i>Drying, %</i>	7,39 ± 1,52	7,2	2,9	16



Рис. 1. Распределение 12,5-суточных эмбрионов (n = 430) по уровню выхода амниотической жидкости (по x – выход экстраэмбриональной жидкости, мл; по y – количество эмбрионов с определенным уровнем ВЭЭЖ)
Fig. 1. The distribution of 12.5-day embryos (n = 430) according to the level of amniotic fluid (x is the yield of extraembryonic fluid, ml; y is the number of embryos with a certain level of YEF)

ческой жидкости. Распределение приближается к нормальному, что позволит в дальнейшем выбрать для генотипирования по rs13730111 особей с разным уровнем ВЭЭЖ, чтобы оценить влияние генотипа самого эмбриона на этот показатель.

Оценка 12,5-суточных эмбрионов по фенотипической вариабельности признаков, ассоциированных с выходом амниотической жидкости, представлена в таблице 2. Следует отметить высокую массу яйца у представителей русских белых кур (58,59 ± 5,01 г),

Таблица 3
Коэффициент линейной корреляции (r) между фенотипическими признаками яиц кур русской белой породы на 12,5 сутки инкубации

Table 3
The linear correlation coefficient (r) between the phenotypic characteristics of eggs of chickens of the Russian white breed on the 12.5-day incubation

Корреляции Correlations	r
Масса яйца – масса эмбриона Egg mass – embryo mass	0,124
Масса яйца – ВЭЭЖ Egg mass – YEF	0,599
Масса эмбриона – ВЭЭЖ Embryo mass – YEF	0,183
Масса яйца – усушка, % Egg mass – drying, %	–0,154
Масса эмбриона – усушка, % Embryo mass – drying, %	–0,088
Усушка, % – ВЭЭЖ Drying, % – YEF	–0,334

что превышает стандарт породы по этому показателю (56–57 г) [10].

Анализ корреляций между основными фенотипическими признаками, изучаемыми при анализе

12,5-суточных эмбрионов, показал, что наибольшая взаимосвязь наблюдалась между массой яйца при закладке на инкубацию и выходом экстраэмбриональной жидкости ($r = 0,599$). Отмечена отрицательная корреляция показателя ВЭЭЖ с процентом усушки ($r = -0,334$).

Выводы. Рекомендации

Обнаружены ассоциации показателя выхода экстраэмбриональной жидкости в куриных эмбрионах с генотипом по замене rs13730111. Наибольший ВЭЭЖ наблюдался у гомозигот ТТ, наименьший – у особей с генотипом СС. При изучении эмбрионов кур распределение по признаку ВЭЭЖ приближается к нормальному. Средний выход жидкости у эмбрионов составил $11,7 \pm 2,06$ мл. Отмечена высокая положительная корреляция ($r = 0,599$) между массой яйца при закладке на инкубацию и ВЭЭЖ. Повышение процента усушки яйца в ходе инкубации приводит к снижению выхода экстраэмбриональной жидкости в эмбрионах кур ($r = -0,334$). Обнаруженные закономерности можно использовать при оценке птицы в ходе селекции.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России по теме Государственного задания «Изучение структурной и функциональной изменчивости животных и птиц на основе использования ДНК-маркеров с целью оценки аллельного биоразнообразия и идентификации ценных генотипов для внедрения в селекционный процесс» АААА-А18-118021590138-1.

Коллектив авторов выражает благодарность Ольге Игоревне Станишевской, руководителю Отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц ВНИИГРЖ (г. Санкт-Петербург – Пушкин) за предоставленный для работы зоотехнический и биологический материал.

Литература

1. Станишевская О. И., Черепанов С. В., Силюкова Ю. Л. Организационные аспекты сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных животных: мировой опыт // Генетика и разведение животных. 2017. № 3. С. 3–11.
2. Юрченко О., Макарова А., Карпухина И., Вахрамеев А. Отечественные породы и популяции кур // Животноводство России. 2017. № 2. С. 7–10.
3. Demytyeva N. V., Romanov M. N., Kudinov A. A., Mitrofanova O. V., Stanishevskaya O. I., Terletsky V. P., Fedorova E. S., Nikitkina E. V., Plemiyashov K. V. Studying the structure of a gene pool population of the Russian white chicken breed by genome-wide SNP scan // Agricultural biology. 2017. Vol. 52. Pp. 1166–1174.
4. Лапа М. А. Влияние генотипа матерей, отцов и возраста развивающихся эмбрионов кур на объем и качество аллантаино-амниотической жидкости // Генетика и разведение животных. 2015. № 1. С. 14–20.
5. Omede A. A., Bhuiyan M. M., Lslam A. F., Iji P. A. Physico-chemical properties of late-incubation egg amniotic fluid and a potential in ovo feed supplement // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2017. Vol. 30 (8). Pp. 1124–1134.
6. DaSilva M., Dombre C., Brionne A., Monget P., Chessé M., De Pauw M., Mills M., Combes-Soia L., Labas V., Guyot N., Nys Y., Réhault-Godbert S. The unique features of proteins depicting the chicken amniotic fluid // Molecular & Cellular Proteomics. 2019. Vol. 15 (18). Pp. 174–190.
7. Hinckea M. T., Da Silva M., Guyot N., Gautron J., McKee M. D., Guabiraba-Brito R., Réhault-Godbert S. Dynamics of structural barriers and innate immune components during incubation of the avian egg: critical interplay between autonomous embryonic development and maternal anticipation // Journal of Innate Immunity. 2019. Vol. 11 (2). Pp. 111–124.
8. Тяпугин Е. Селекция по развитию эмбриона // Животноводство России. 2017. № S3. С. 33–34.

9. Kudinov A. A., Dementyeva N. V., Mitrofanova O. V., Stanishevskaya O. I., Fedorova E. S., Larkina T. A., Mishina A. I., Plemyashov K. V., Griffin D. K., Romanov M. N. Genome-wide association studies targeting the yield of extraembryonic fluid and production traits in Russian white chickens // *BMC Genomics*. 2019. Apr 4; 20:270.

10. Федорова Е. С., Станишевская О. И., Силукова Ю. Л. Эффективность селекции кур породы русская белая на повышение выхода вакцинного сырья // *Генетика и разведение животных*. 2017. № 3. С. 46–50.

References

1. Stanishevskaya O. I., Cherepanov S. V., Silyukova Yu. L. Organizational aspects of the conservation of genetic resources of farm animals: international experience // *Genetics and animal breeding*. 2017. No. 3. Pp. 3–11.

2. Yurchenko O., Makarova A., Karpukhina I., Vakhrameev A. Domestic Breeds and Populations of Chickens // *Russian Animal Husbandry*. 2017. No. 2. Pp. 7–10.

3. Dementyeva N. V., Romanov M. N., Kudinov A. A., Mitrofanova O. V., Stanishevskaya O. I., Terletsky V. P., Fedorova E. S., Nikitkina E. V., Plemyashov K. V. Studying the structure of a gene pool population of the Russian white chicken breed by genome-wide SNP scan // *Agricultural biology*. 2017. Vol. 52. Pp. 1166–1174.

4. Lapa M. A. Influence of the genotype of mothers, fathers and the age of developing chick embryos on the volume and quality of allantoic-amniotic fluid // *Genetics and animal breeding*. 2015. No. 1. Pp. 14–20.

5. Omede A. A., Bhuiyan M. M., Lslam A. F., Iji P. A. Physico-chemical properties of late-incubation egg amniotic fluid and a potential in ovo feed supplement // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2017. Vol. 30 (8). Pp. 1124–1134.

6. DaSilva M., Dombre C., Brionne A., Monget P., Chessé M., De Pauw M., Mills M., Combes-Soia L., Labas V., Guyot N., Nys Y., Réhault-Godbert S. The unique features of proteins depicting the chicken amniotic fluid // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2019. Vol. 15 (18). Pp. 174–190.

7. Hincka M. T., Da Silva M., Guyot N., Gautron J., McKee M. D., Guabiraba-Brito R., Réhault-Godbert S. Dynamics of structural barriers and innate immune components during incubation of the avian egg: critical interplay between autonomous embryonic development and maternal anticipation // *Journal of Innate Immunity*. 2019. Vol. 11 (2). Pp. 111–124.

8. Tyapugin E. Breeding for the development of the embryo // *Animal Breeding of Russia*. 2017. No. S3. Pp. 33–34.

9. Kudinov A. A., Dementyeva N. V., Mitrofanova O. V., Stanishevskaya O. I., Fedorova E. S., Larkina T. A., Mishina A. I., Plemyashov K. V., Griffin D. K., Romanov M. N. Genome-wide association studies targeting the yield of extraembryonic fluid and production traits in Russian white chickens // *BMC Genomics*. 2019. Apr 4; 20:270.

10. Fedorova E. S., Stanishevskaya O. I., Silyukova Yu. L. The effectiveness of breeding chickens breed Russian white to increase the yield of vaccine materials // *Genetics and animal breeding*. 2017. No. 3. Pp. 46–50.