

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ГЕНОВ В ROH ОСТРОВКАХ У КУР ПОРОДЫ ЧЕШСКАЯ ЗОЛОТИСТАЯ\*

Михаил Григорьевич Смарагдов, кандидат биологических наук

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Научный Центр Животноводства-ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ВНИИГРЖ), г. Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: spbvniigen@mail.ru

**Аннотация.** Современные технологии позволяют идентифицировать гомозиготные районы хромосом, возникающие в результате селекции животных. В статье представлены результаты, полученные при генотипировании кур с использованием чипа Illumina Chicken 60K SNP iSelect Bead Chip. Впервые был осуществлен полногеномный анализ протяженных гомозиготных последовательностей SNPs (ROH) в геноме кур породы Чешская Золотистая. Среднее количество ROH сегментов в геноме кур составило  $143 \pm 8$ . Установлено, что они имеют тенденцию к случайному распределению в хромосомах. Исходя из полученных данных, предложено запретить применение разрешенных гетерозиготных SNPs в ROH сегментах для предотвращения переоценки результатов ROH анализа. Рассчитанный из ROH данных средний коэффициент инбридинга у кур породы Чешская Золотистая равен  $0,34 \pm 0,03$ . В хромосомах кур 2, 3, 9 и 22 обнаружены ROH островки. В них расположены гены, ассоциированные с иммунитетом, деградацией нейронов, весом сумки Фабрициуса, ожирением, пигментацией пера и регуляцией генов теплового шока. Таким образом, у Чешской Золотистой породы кур селекция и сопровождающий ее инбридинг повлиял на гены, участвующие в перечисленных выше биологических процессах.

**Ключевые слова:** куры, полногеномный анализ, однонуклеотидный полиморфизм, инбридинг, ROH, ROH островки

## FUNCTIONAL ROLE OF GENES IN ROH SITES IN CZECH GOLDEN CHICKENS

M.G. Smaragdov, PhD in Biological Sciences

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the I.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, St. Petersburg, Russia  
E-mail: spbvniigen@mail.ru

**Abstract.** Modern technologies make it possible to identify homozygous chromosome regions that have arisen as a result of animal selection. The article presents the results obtained in the genotyping of chickens using the Illumina Chicken 60K SNP iSelect Bead Chip. For the first time, a genome-wide analysis of the extended homozygous SNP sequences (ROH) was performed in the genome of Czech Golden hens. The average number of ROH segments in the chicken genome was  $143 \pm 8$ . ROH segments are usually randomly distributed in chicken chromosomes. It has been proposed to prohibit the use of heterozygous SNPs in ROH segments to prevent overestimation of ROH data. The average inbreeding coefficient in chickens calculated from ROH data was  $0.34 \pm 0.03$ . ROH islands were found on chromosomes 2, 3, 9 and 22. They contain genes associated with immunity, degradation of neurons, Fabricius bursa weight, obesity, feather pigmentation, and regulation of hit-shock genes. In the Czech Golden chicken breed, selection and the associated inbreeding have therefore influenced the genes involved in several biological processes.

**Keywords:** chickens, genome – wide analysis, single nucleotide polymorphism, inbreeding, ROH, ROH islands

Одомашнивание кур сопровождалось селекцией, способствующей выведению большого разнообразия пород, которые отличаются по генотипу и фенотипу. Следовательно, кур можно считать идеальной моделью для генетических исследований о влиянии селекции на инбридинг и выявление генов, находящихся в районах, затронутых инбридингом. Инбридинг приводит к образованию протяженных гомозиготных последовательностей SNPs (ROH) в хромосомах животных. С появлением современных технологий (чипы, позволяющие обнаружить однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в геноме животных) стало возможным идентифицировать в хромосомах ROH сегменты. Предложено несколько вариантов программного обеспечения сканирования генома животных для выявления ROH сегмен-

тов. [16] Такие исследования проведены у многих видов сельскохозяйственных животных. [14] На практике используют два подхода для сканирования генома – последовательное и заданной рамкой. Для обнаружения ROH у кур породы Чешская Золотистая (ЧЗ) мы применяли метод последовательного сканирования генома, так как он позволяет идентифицировать больше ROH сегментов. В результате продолжительного интенсивного инбридинга формируются ROH островки, в которых одни и те же ROH последовательности встречаются у многих животных. Анализ генов, расположенных в ROH островках может свидетельствовать о функциональном направлении селекции породы кур.

Цель работы – изучить функции генов в ROH островках у кур породы Чешская Золотистая.

\* Исследование выполнено в рамках ГЗ № 124020200114-7 / The study was carried out as part of GO № 124020200114-7.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали 16 куриц породы *Чешская Золотистая (ЧЗ)*, случайно отобранных из популяции, находящейся в генетической коллекции редких и исчезающих пород (ВНИИ генетики сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург). Порода ЧЗ была завезена в Россию из Чехии в 1977 году. Легкая, активная и подвижная птица с оперением цвета куропатки и грифельными ногами, относится к яичному типу. Яйценоскость за 52...56 недель жизни – 150...170 яиц. Масса яйца после 52 недели – 55...56 г. Живая масса курицы – 1,4...1,6 кг, петуха – 2,0...2,3 кг.

Куры были генотипированы чипом Illumina Chicken 60KSNP iSelect Bead Chip. Работали только с аутосомами. Контроль качества генотипирования осуществляли с помощью программного обеспечения PLINK 1.9. [15] На первом этапе были удалены SNPs с показателем качества (QS) менее 0,7, затем в SNPs данных оставили не более 5% негенотипированных SNPs, также удалили SNPs с минорной частотой аллелей (MAF) < 0,01. В результате проведения контроля качества было получено 53780 SNPs.

РОН сканирование генома кур осуществлено программой detectRUNS со следующими параметрами: последовательные прогоны по аутосомам выполняли с 20 SNP; минимальный размер РОН сегментов – 250 т.п.н.; максимальное расстояние между РОН сегментами – 1 Мб. [1] Программа позволяет выявлять РОН островки. При их обнаружении гетерозиготные SNP в РОН сегментах были запрещены. В РОН островках идентичные РОН сегменты встречались у 90% кур.

Ранг хромосом вычисляли по формуле:

$$\text{Ранг хромосомы}_i = \frac{\frac{\text{количество РОН в хромосоме } (i)}{\text{сумма всех РОН}}}{\frac{\text{длина хромосомы}(i)}{\text{сумма длин 28 хромосом}}}$$

По данным РОН рассчитывали коэффициент инбридинга:

$$F_{\text{РОН}} = L_{\text{РОН}} / L_{\text{геном}}$$

где  $L_{\text{РОН}}$  – суммарная длина сегментов РОН в геноме каждой курицы;  $L_{\text{геном}}$  – совокупная длина аутосом курицы покрытых SNPs.

Гены, расположенные в РОН островках, были идентифицированы из браузера Ensembl BioMart. [4] Данные транскрипционной активности – TPM в тканях курицы получали в программе GalBase. [7] Транскрипты на миллион (TPM) – метод нормализации РНК последовательностей, свидетельствующий об интенсивности транскрипции гена. Функции генов определяли из статей в PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) и Google Академия (<https://scholar.google.com/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным РОН сканирования генома кур было выявлено среднее количество  $143 \pm 8$  РОН сегментов на курицу при условии запрета в них гетерозигот-

Таблица 1. Количество РОН сегментов в зависимости от числа разрешенных гетерозиготных SNP в РОН

Значение РОН*	Гетерозиготные SNP запрещены	Разрешен один гетерозиготный SNP	Разрешено два гетерозиготных SNP
Среднее	143 ± 8	181 ± 8	232 ± 8
Максимальное	202	246	289
Минимальное	88	118	170

Примечание. \* – число кур 16.

Таблица 2. Количество РОН сегментов в пяти классах длин у 16 кур породы ЧЗ

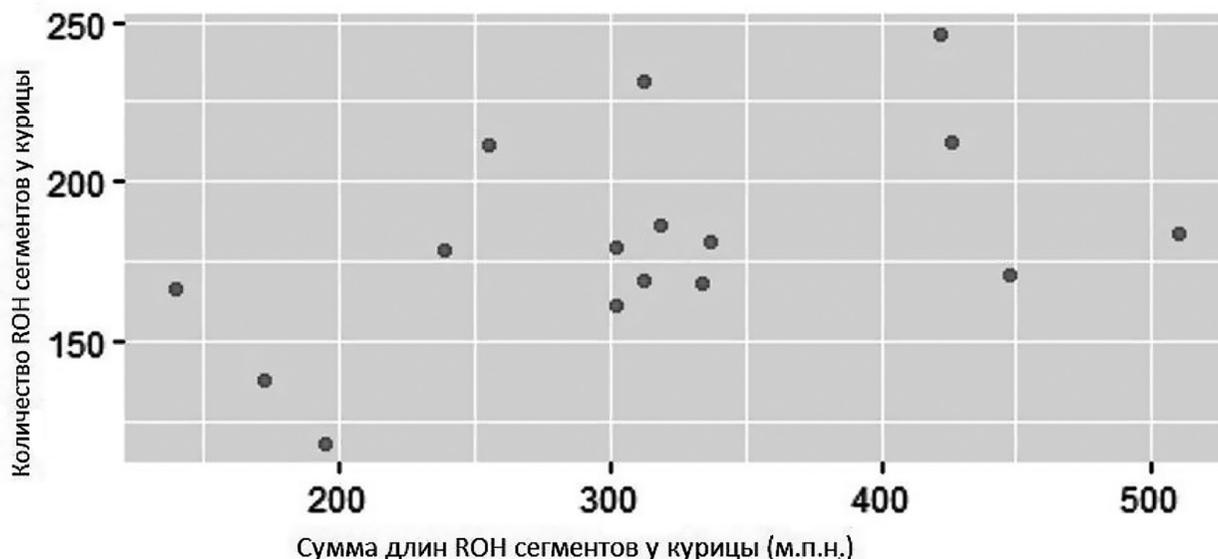
Класс длин (м.п.н.)	Гетерозиготный SNP в РОН сегментах запрещен	Разрешен один гетерозиготный SNP в РОН сегментах
0,25...2,0	1667	2264
2...4	357	357
4...8	178	178
8...16	67	76
>16	24	27

ных SNP (табл. 1). Если допускался один гетерозиготный SNP, то среднее количество РОН сегментов увеличивалось до  $181 \pm 8$ , если два, то –  $232 \pm 8$ . Допущение даже одного гетерозиготного SNP в РОН сегментах приводит к достоверному увеличению среднего количества РОН. Такой результат может привести к переоценке данных, так как в случае допущения гетерозиготных SNPs объединяются короткие (250...500 т.п.н.) гомозиготные РОН сегменты, которые не всегда аутозиготные. Среднее значение количества РОН сегментов ( $143 \pm 8$ ) для кур породы *Чешская Золотистая* значительно превышает этот показатель у других пород сохраняемых в коллекции ВНИИГРЖ – *Амрокс* ( $18,9 \pm 1,5$ ), *Брама палевая* ( $36,6 \pm 2,1$ ), *Корниш белый* ( $40,4 \pm 1,1$ ), *Леггорн светло-коричневый* ( $47,5 \pm 2,3$ ), *Пушкинская* ( $68,3 \pm 2,0$ ), *Суссекс светлый* ( $23,1 \pm 1,5$ ). [5] Увеличенное количество РОН сегментов, обнаруженное у кур породы *Чешская Золотистая*, приводит к большому коэффициенту инбридинга.

В таблице 2 представлены данные о количестве РОН сегментов, находящихся в разных классах длин. При допущении даже одного гетерозиготного SNP в РОН сегментах значительно увеличивается количество РОН сегментов в самом коротком классе длин – 0,25...2,0 м.п.н. Таким образом, такое допущение может привести к появлению в данных не аутозиготных РОН сегментов, то есть не обусловленных селекцией РОН.

На рисунке представлено распределение кур в зависимости от соотношения суммарной длины РОН сегментов к их количеству. Наблюдается различие (более чем в два раза) как по суммарной длине, так и количеству РОН сегментов в хромосомах. По этим показателям паттерна РОН сегментов только шесть кур (центральная область рисунка) имеют близкие значения.

Ранг хромосомы, вычисленный как отношение доли РОН сегментов в хромосоме к доле длины хромосомы в геноме, представлен в таблице 3. Он сви-



Распределение кур по соотношению суммарной длины и количеству ROH сегментов.

детельствует о плотности заполнения хромосомы ROH сегментами. В основном микрохромосомы (с номером < 10) более других заполнены ROH сегментами. Частота рекомбинации в микрохромосомах в 2,8 раза больше, чем в макрохромосомах. [12] В хромосоме 16 с наименьшей плотностью заполнения ROH сегментами расположены гены ответственные за иммунитет, включая комплекс гистосовместимости. [13] Аллели этих генов имеют тенденцию к гетерозиготности. Возможно, это объясняет наименьшее число ROH сегментов в хромосоме.

Коэффициент корреляции между долей количества ROH сегментов в хромосоме от их общего числа в 28 хромосомах и долей длины хромосомы от их суммарной длины характеризует тип заполнения хромосом ROH сегментами. Рассчитанная корреляция по Пирсону составляет 0,99 ( $P = 8,8E-23$ ), Спирмену – 0,94 ( $P = 2,0E-7$ ). Такие высокие значения коэффициента корреляции свидетельствуют об общей тенденции к случайному распределению ROH сегментов в 28 хромосомах кур. Хромосома 16 – исключение из общей закономерности.

Средний коэффициент инбридинга у кур породы ЧЗ равен  $0,34 \pm 0,03$ . Такой результат может быть следствием малочисленности ЧЗ популяции кур сохраняемой в генетической коллекции редких и исчезающих пород ВНИИГРЖ. Для сравнения средний коэффициент инбридинга у других пород из коллекции ВНИИГРЖ: Амрокс –  $0,105 \pm 0,009$ , Брама палевая –  $0,167 \pm 0,015$ , Корниш белый –  $0,055 \pm 0,007$ , Леггорн светло-коричневый –  $0,167 \pm 0,011$ , Пушкин-

ская –  $0,112 \pm 0,009$ , Русская белая –  $0,307 \pm 0,014$ , Суссекс светлый –  $0,127 \pm 0,003$ . [5]

В хромосомах GGA2, GGA3, GGA9 и GGA22 были найдены четыре ROH островка. Их длина (93...403 т.п.н.) характерна для многих пород кур. [19, 21]

В хромосоме GGA2 в районе 143452130 ... 143696199 п.н. расположен ROH островок, включающий ген альфа последовательность коллагена типа XXII (COL22A1). Наибольшая транскрипционная активность этого гена обнаружена в проксимальной передней конечности, TPM = 36, коже – 32 и сетчатке глаз, TPM = 37. [7] Он был ассоциирован с целостностью тканей и клеточной адгезией. Считают, что у людей мутации в гене COL22A1 могут приводить к фиброзу легких и кожи. [22]

В хромосоме GGA3 (район 61542241 ... 61634781 п.н.) есть ROH островок, включающий ген TBC1 домен член семейства 32 (TBC1D32). Наибольшая транскрипционная активность обнаружена в мозге, TPM = 24, семенниках – 27, сетчатке глаз – 37, эмбрионе – 37 и голени, TPM = 37. [6] У ресурсных кур в F2 поколении ген TBC1D32 был ассоциирован с весом сумки Фабрициуса. [18]

Еще один ген ENS1 (другое название ядерный сигнал 1 для эндоплазматического ретикулума (ERN1)) тоже находится в этом ROH островке. Установлено, что он экспрессирует в эмбриональных яичниках и семенниках кур, а также в эмбриональных стволовых клетках. По мере дифференцировки стволовых клеток экспрессия гена ENS1 уменьшается. [9]

Таблица 3.

Ранг хромосом у кур породы ЧЗ

Хромосома	25	23	22	27	26	17	20	28	11	19
Ранг	0,874	0,853	0,823	0,739	0,667	0,643	0,625	0,601	0,590	0,511
Хромосома	24	18	21	12	10	15	7	6	9	14
Ранг	0,504	0,460	0,425	0,414	0,406	0,397	0,385	0,369	0,350	0,349
Хромосома	8	13	1	2	4	3	5	16		
Ранг	0,341	0,317	0,292	0,266	0,265	0,260	0,260	0,110		

В хромосоме GGA9 (17727833...17952104 п.н.) расположен ROH островок с геном X-сцепленный рецептор 1 трансдукции бета 1 (*TBL1XR1*). Наибольшая транскрипционная активность гена обнаружена в сумке Фабрициуса, TPM = 118 и голени, TPM = 77. [7] У кур породы *Ghana* он был ассоциирован с иммунным ответом на заражение вирусом болезни Ньюкасла. [20] У человека ген *TBL1XR1* связан с множественными нарушениями развития и несколькими неврологическими проявлениями. [11]

В хромосоме GGA22 (454878...516797 п.н.) найден ROH островок, включающий несколько генов. Один из них переносчик растворенного вещества семейства 23, члена 2 (*SLC23A2*) – трансмембранный транспортер. Он максимально транскрибируется в мозге, TPM = 146, сетчатке глаз – 106 и голени, TPM = 122. [7] Известно, что ген *SLC23A2* влияет на пигментацию пера у китайских пород кур. [8]

Другой ген *Ras* ассоциированный домен, член семейства 2 (*RASSF2*) максимально транскрибируется в коже, TPM = 177, селезенке – 195 и сумке Фабрициуса, TPM = 184. Этот ген у человека – супрессор рака легкого, у мышей – регулирует дифференцировку остеобластов и остеокластов, ингибируя передачу сигналов NF-κB. [3, 17]

Еще один ген прионный белок (*PRNP*) расположен в этом ROH островке. Его максимальная транскрипционная активность наблюдается в мозжечке, TPM = 752. Прионные заболевания были зарегистрированы у нескольких млекопитающих-хозяев, но у кур обнаружена устойчивость к экспериментальной прионной инфекции. Установлено, что у перепела ген *PRNP* регулирует деградацию нейронов. [10]

Неклассические гены теплового шока служат для защиты клеток от вредных стрессов. Ген проминин 2 (*PROM2*) участвует в регуляции таких генов у мышей и кур. [6] Его максимальная транскрипционная активность наблюдается в фолликулах, TPM = 293. Еще один ген в этом ROH островке – дигидропиримидиназа 2 (*DPYSL2*), участвует в формировании ожирения у кур. [2] Его максимальная транскрипция в мозге, TPM = 1250.

ROH островки можно рассматривать как индикаторы обусловленного селекцией инбридинга. У кур породы *ЧЗ* находятся гены ответственные за иммунитет (*TBL1XR1*), вес сумки Фабрициуса (*TBC1D32*), ожирение (*DPYSL2*), пигментацию пера (*SLC23A2*), регуляцию «хит шоковых» генов (*PROM2*) и деградацию нейронов (*PRNP*). Таким образом, перечисленные выше признаки были затронуты селекцией у кур породы *ЧЗ*. Исходя из данных в опубликованных статьях, ROH островки у кур других пород не совпадают по локализации с найденными в нашем исследовании, что свидетельствует об их уникальности для *Чешской Золотистой* породы кур.

**Выводы.** В геноме кур породы *ЧЗ* выявлены ROH сегменты. Среднее количество ROH на курицу – 143 ± 8. Установлена тенденция случайного распределения ROH сегментов в хромосомах кур. Коэффициент инбридинга, вычисленный исходя из ROH данных, оказался высоким (0,34 ± 0,03), по сравнению с другими породами, сохраняемыми

в коллекции ВНИИГРЖ. В хромосомах кур GGA2, GGA3, GGA9 и GGA22 обнаружены ROH островки. Гены, локализованные в них, участвуют в иммунитете, деградации нейронов, степени ожирения птицы и пигментации пера.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Biscarini F., Cozy P., Gaspa G., Maras G. detectRUNS: An R package to detect runs of homozygosity and heterozygosity in diploid genomes. CRAN (The Compr. R Arch. Network, 2019).
2. Byerly M.S., Simon J., Cogburn L.A. et al. Transcriptional profiling of hypothalamus during development of adiposity in genetically selected fat and lean chickens // *Physiol. Genomics*. 2010. Vol. 42 (2). P. 157–167. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00029.2010>
3. Cooper W.N., Dickinson R.E., Dallol A. et al. Epigenetic regulation of the ras effector/tumour suppressor RASSF2 in breast and lung cancer // *Oncogene*. 2008. Vol. 27 (12). P. 1805–1811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210805>
4. Cunningham F., Allen J.E., Allen J. et al. Ensembl // *Nucleic Acids Res.* 2022. Vol. 50 (1). Article D988-D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>
5. Dementieva N.V., Kudinov A.A., Larkina T.A. et al. Genetic Variability in Local and Imported Germplasm Chicken Populations as Revealed by Analyzing Runs of Homozygosity // *Animals*. 2020. Vol. 10 (10). Article 1887. <https://doi.org/10.3390/ani10101887>
6. Fujimoto M., Nakai A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress // *FEBS J.* 2010. Vol. 277. P. 4112–4125. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07827.x>
7. Fu W., Wang R., Xu N. Galbase: a comprehensive repository for integrating chicken multi-omics data // *BMC Genomics*. 2022. Vol. 23 (1). Article 364. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08598-2>
8. Huang X., Otecko N.O., Peng M. et al. Genome-wide genetic structure and selection signatures for color in 10 traditional Chinese yellow-feathered chicken breeds // *BMC Genomics*. 2020. Vol. 21. Article 316. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6736-4>
9. Intarapat S., Stern C.D. Sexually dimorphic and sex-independent left-right asymmetries in chicken embryonic gonads // *PloS ONE*. 2013. Vol. 8. Article e69893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069893>
10. Kim Y., Kim Y.C., Jeong B.H. et al. Novel Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and Genetic Features of the Prion Protein Gene (PRNP) in Quail (*Coturnix japonica*) // *Front. Vet. Sci.* 2022. Vol. 9. Article 870735. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.870735>
11. Mastrototaro G., Zaghi M., Massimino L. et al. TBL1XR1 Ensures Balanced Neural Development Through NCOR Complex-Mediated Regulation of the MAPK Pathway // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9. Article 641410. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641410>
12. Megens H.J., Crooijmans R.P., Bastiaansen J.W. et al. Comparison of linkage disequilibrium and haplotype diversity on macro- and microchromosomes in chicken // *BMC Genetics*. 2009. Vol. 10. Article 86. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-86>
13. Miller M.M., Taylor R.L. Brief review of the chicken Major Histocompatibility Complex: the genes, their distribution on chromosome 16, and their contributions to disease resistance // *Poultry Sci.* 2016. Vol. 95 (2). P. 375–392. <https://doi.org/10.3382/ps/pev379>

14. Peripolli E., Munari D., Silva M. et al. Runs of homozygosity: current knowledge and applications in livestock // Anim. Genet. 2016. Vol. 48 (3). P. 255–271. <https://doi.org/10.1111/age.12526>
15. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // Am. J. Hum. Genet. 2007. Vol. 81. P. 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
16. Smaragdov M.G. Identification of homozygosity-rich regions in the Holstein genome // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2023. Vol. 27 (5). P. 471–479. <https://doi.org/10.18699/VJGB-23-57>
17. Song H., Kim H., Lee K. et al. Ablation of *Rassf2* induces bone defects and subsequent haematopoietic anomalies in mice // EMBO J. 2012. Vol. 31 (5). P. 1147–1159. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.480>
18. Sun Y., Li Q., Hu Y. Genomewide association study of immune traits in chicken F2 resource population // J. Anim. Breed. Genet. 2016. Vol. 133 (3). P. 197–206. <https://doi.org/10.1111/jbg.12186>
19. Tian S., Tang W., Zhong Z. Identification of Runs of Homozygosity Islands and Functional Variants in Wenchang Chicken // Animals 2023. Vol. 13 (10). Article 1645. <https://doi.org/10.3390/ani13101645>
20. Walugembe M., Amuzu-Aweh E.N., Botchway P.K. et al. Genetic Basis of Response of Ghanaian Local Chickens to Infection with a Lentogenic Newcastle Disease Virus // Front. Genet. 2020. Vol. 11. Article 739. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00739>
21. Wang H., Wang Q., Tan X. et al. Estimation of genetic variability and identification of regions under selection based on runs of homozygosity in Beijing-You Chickens // Poultry Sci. 2023. Vol. 102 (2). Article 102342. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102342>
22. Watanabe T., Baker Frost D.A., Mlakar L. A Human Skin Model Recapitulates Systemic Sclerosis Dermal Fibrosis and Identifies COL22A1 as a TGF\_ Early Response Gene that Mediates Fibroblast to Myofibroblast Transition // Genes 2019. Vol. 10. Article 75. <https://doi.org/10.3390/genes10020075>

*Поступила в редакцию 11.01.2024  
Принята к публикации 25.01. 2024*