



Особенности организации геномной ДНК в генофондных популяциях кур, выявляемые мультилокусным ДНК-зондом

Валерий Павлович Терлецкий, Валентина Ивановна Тыщенко

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

Аннотация: Молекулярно-генетические технологии занимают все большее место в селекционной работе по совершенствованию существующих пород и популяций кур, а также в программах сохранения ценного генофонда. Малочисленные локальные породы являются источником ценных генов, которые можно использовать в селекции. Мультилокусный анализ с использованием меченых ДНК-зондов позволяет одновременно учитывать большое число генетических локусов и рассчитать популяционно-генетические параметры как внутри популяций, так и между ними. В статье представлены данные по использованию мультилокусного зонда (ГТГ)5 в реакции молекулярной гибридизации на шести породах и популяциях кур различного происхождения. Показано, что большое генетическое расстояние наблюдалось между черно-пестрым австралорпом и голошейной породой ($D=0,155$). По критерию средней гетерозиготности популяция голошейных кур превосходила юрловских голосистых и черно-пестрых австралорпов. Выявлены маркерные фрагменты ДНК, специфичные для отдельных пород. В другом эксперименте отмечена генетическая близость павловских кур из Московской области и популяции из биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ. Таким образом, мультилокусный анализ является эффективным инструментом выявления особенностей организации генома в породах и популяциях кур.

Ключевые слова: породы кур, генетическое разнообразие, гетерозиготность.

Для цитирования: Терлецкий, В.П. Особенности организации геномной ДНК в генофондных популяциях кур, выявляемые мультилокусным ДНК-зондом / В.П. Терлецкий, В.И. Тыщенко // Птицеводство. – 2023. – №2. – С. 14-18.

doi: 10.33845/0033-3239-2023-72-2-14-18

Введение. Генетический анализ ДНК кур различных пород позволяет установить их исторические взаимоотношения, направления селекции, уточнить происхождение пород, биологическое разнообразие и выявить ассоциации отдельных участков генома с продуктивными признаками [1-3]. Особенно актуальными такие исследования являются в отношении малочисленных генофондных пород и популяций [4,5]. В ряде случаев выведение новых пород происходило путем скрещиваний различных групп птицы с последующим закреплением нужных фенотипов. В этом случае «следы» самых различных пород могут вы-

являться при анализе [6]. Нужно отметить, что интенсивная селекция на продуктивные признаки может снизить вариабельность генов, определяющих резистентность у птицы [7].

В программах скрещивания при создании гибридных форм можно использовать генофондные породы с уникальными генами [8]. С практической точки зрения важно понять вклад каждой породы в конечный результат. Поддержание необходимого уровня разнообразия в популяциях является необходимым элементом в селекционной работе. Известно, что снижение генетического разнообразия выражается в виде инбредной де-

прессии, с проявлением целого комплекса негативных последствий. Причиной этого считается переход вредных рецессивных аллелей, не экспрессирующихся в гетерозиготном состоянии, в гомозиготное состояние. В последнее время также показано, что при инбридинге возможны изменения в метилировании ДНК, что вносит вклад в депрессию [9].

Цель исследований – выявить популяционно-генетические параметры, такие как межпопуляционное разнообразие (коэффициент сходства и генетическое расстояние) и внутривидовое разнообразие (гетерозиготность), в шести породах и популяциях кур.

Материал и методика исследований. В работе использовали биоматериал (кровь из подкрыльцовой вены), полученный от особей ($n=10\div 15$) кур шести пород и популяций биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ. Для предотвращения свертывания крови в пробирку помещали 1 каплю 0,5 М раствора этилендиаминотетрауксусной кислоты (ЭДТА). Клетки лизировали в буфере TES (50 мМ трис - 20 мМ ЭДТА - 10 мМ NaCl, pH 8,0), содержащем 0,5% раствор додецилсульфата. Параллельно в раствор вносили протеиназу К до конечной концентрации 100 мкг/мл, обеспечивающей расщепление белков смеси. После проведения инкубации при 60°C в пробирку вносили равный объем водонасыщенного фенола, встряхивали и центрифугировали для полного разделения фаз. Верхнюю фазу с ДНК отбирали в новую пробирку, ДНК осаждали этанолом и растворяли в буфере TE (10 мМ трис - 1 мМ ЭДТА).



Геномную ДНК расщепляли эндонуклеазой рестрикции *HaeIII*, полученные фрагменты ДНК разделяли по длине в агарозном геле, переносили на нейлоновый фильтр, фиксировали в ультрафиолетовом свете, проводили реакцию молекулярной гибридизации с меченым

олигонуклеотидным зондом (ГТГ)₅, как описано ранее [5] (рис. 1).

Анализ количества и распределения фрагментов ДНК на фильтре позволил рассчитать попарное сходство между особями как внутри каждой группы, так и между группами. Доля общих фрагментов

Таблица 1. Популяционно-генетические параметры в 3 популяциях кур (юрловская голосистая, черно-пестрый австралорп, голошейная), рассчитанные методом ДНК-фингерпринтинга

Популяции кур	n	Полос на дорожку, $X \pm m$	P	BS ¹	BS ²	D
юрловская голосистая	10	27,7±0,9	9,2x10 ⁻¹³	0,37		
черно-пестрый австралорп	11	27,4±0,5	6,9x10 ⁻¹²	0,39	0,29	0,090
юрловская голосистая	10	27,7±0,9	9,2x10 ⁻¹³	0,37		
голошейная	11	22,7±1,6	4,6x10 ⁻¹²	0,32	0,20	0,145
черно-пестрый австралорп	11	27,4±0,5	6,9x10 ⁻¹²	0,39		
голошейная	11	22,7±1,6	4,6x10 ⁻¹²	0,32	0,20	0,155

P – вероятность встречаемости двух особей с идентичным набором фрагментов ДНК; BS¹ – коэффициент сходства внутри групп; BS² – коэффициент сходства между группами; D – генетическое расстояние.

Таблица 2. Специфические фрагменты ДНК и аллели, имеющие разную частоту встречаемости в 3 популяциях кур (юрловская голосистая, черно-пестрый австралорп, голошейная), рассчитанные методом ДНК-фингерпринтинга

Фрагмент ДНК	Частота фрагментов ДНК			Частота встречаемости аллелей $q=1-\sqrt{1-p}$		
	юрлов. голос.	ч-п авст.	голош.	юрлов. голос.	ч-п авст.	голош.
85	0,80	0,27	0,18	0,55	0,15	0,09
106	0,10	0,00	0,73	0,05	0,00	0,48
108	0,60	0,91	0,00	0,37	0,68	0,00
112	0,00	0,91	0,18	0,00	0,05	0,09





Таблица 3. Гетерозиготность (H) в 3 популяциях кур (юрловская голосистая, черно-пестрый австралорп, голошейная)

Популяции кур	n	Число локусов	Число аллелей	Число полиморфных локусов	H
юрлов. голос.	10	16,16	5,88	1,00	0,71
ч-п. австрал.	11	16,05	5,48	1,00	0,71
голошейная	11	12,91	6,50	1,00	0,76

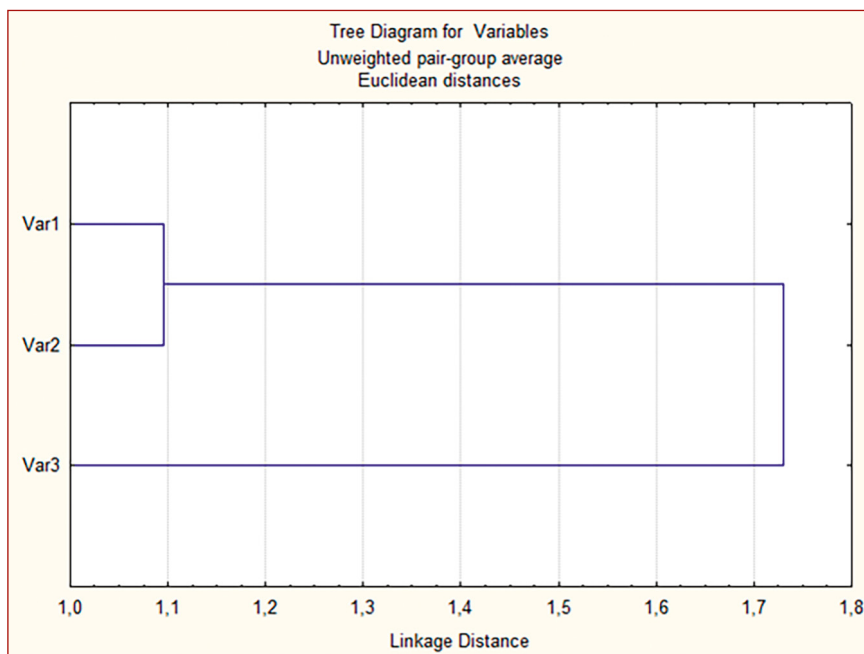


Рис. 2. Филогенетическое древо, показывающее генетические взаимоотношения в породах кур по данным программы Statistica® 6.0 (модуль Cluster analysis): Var1 – юрловская голосистая, Var2 – черно-пестрый австралорп, Var3 – голошейная

ДНК выражалась в виде коэффициента сходства (BS). Гетерозиготность рассчитывали по формуле Стивенса и др. [10] с использованием программы Gelstats®. Филогенетические древа строили с использованием программы Statistica® 6.0 (модуль Cluster analysis).

Результаты исследований и их обсуждение. В первом эксперименте были определены популяционно-генетические параметры в трех группах (породах) кур: юрловская голосистая, черно-пестрый австралорп и голошейная (табл. 1). Наибольшее генетическое расстояние наблюда-

лось между черно-пестрым австралорпом и голошейной ($D=0,155$), а также между юрловской голосистой и голошейной ($D=0,145$). Это свидетельствует о том, что данные породы имеют разные корни в происхождении. Относительную близость показали куры пород юрловская голосистая и черно-пестрый австралорп. Наиболее разнообразной группой является голошейная, в особях которой доля общих фрагментов ДНК при попарном сравнении была наиболее низкой ($BS^1=0,32$).

Поиск специфических фрагментов ДНК в этой группе (табл. 2) привел к выявлению фрагментов №№ 108 и 112 – маркерные фрагменты для черно-пестрого австралорпа, встречаются с частотой 0,91, а у особей голошейной и юрловской голосистой пород не встречаются вообще.

Расчеты, проведенные для выявления внутривидового генетического разнообразия в этих популяциях кур (табл. 3), подтвердили предположение о том, что наиболее разнообразной группой является голошейная, показавшая наибольшую гетерозиготность ($H=0,76$). Тем не менее, достаточно высокая гетерозиготность наблюдалась и у двух других пород ($H=0,71$).

Известно, что голошейные куры являются редкой генофондной породой народной селекции, разводимой в условиях коллек-

Таблица 4. Популяционно-генетические параметры в 3 группах кур павловской породы (ВНИИГРЖ, Московская обл., Барнаул), рассчитанные методом ДНК-фингерпринга

Группы павловских кур	n	Количество полос на дорожку, $\bar{X} \pm m$	P	BS ¹	BS ²	D
ВНИИГРЖ	15	10,6±0,9	4,7×10 ⁻⁵	0,39	0,43	0,055
Московская обл.	12	13,6±0,9	5,5×10 ⁻⁴	0,58		
ВНИИГРЖ	15	10,6±0,9	4,7×10 ⁻⁵	0,39	0,36	0,100
Барнаул	13	15,0±1,4	7,5×10 ⁻⁵	0,53		
Московская обл.	12	13,6±0,9	5,5×10 ⁻⁴	0,58	0,45	0,105
Барнаул	13	15,0±1,4	7,5×10 ⁻⁵	0,53		

P – вероятность встречаемости двух особей с идентичным набором фрагментов ДНК; BS¹ – коэффициент сходства внутри групп; BS² – коэффициент сходства между группами; D – генетическое расстояние.



ционариев и у любителей. Признак голошейности имеет генетическую природу, наследуется как доминантный, стойко передается потомству. Порода не скрещивается с другой птицей и содержится в изолированном состоянии на протяжении длительного времени, что обуславливает генетическую удаленность. Эти представления нашли подтверждение при построении филогенетического древа, как с использованием значений коэффициента сходства, так и генетических расстояний (рис. 2).

Аналогичная работа была проведена на трех популяциях

кур павловской породы: из биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ, из Московской области, из фермерского хозяйства в г. Барнаул (табл. 4). Наибольшим коэффициентом сходства внутри популяции отличались павловские куры из Московской обл. ($BS^1=0,58$), а наименьшим – куры из коллекции ВНИИГРЖ ($BS^1=0,39$), но, тем не менее, по генетическим расстояниям они очень близки ($D=0,055$). Наиболее выраженная генетическая дистанция определялась между павловскими курами из Барнаула и Московской области ($D=0,105$), а также между

курами из Барнаула и коллекции ВНИИГРЖ ($D=0,100$).

Заключение. Таким образом, ДНК-зонд (ГТГ)5 может эффективно использоваться при выяснении особенностей организации генома у кур различных пород и популяций. С его помощью можно рассчитать основные популяционно-генетические параметры, такие как коэффициент сходства, средняя гетерозиготность и генетические расстояния.

Работа выполнена в рамках государственного задания, № гос. рег. 0445-2021-0010 (121052600352-3).

Литература

1. Коршунова, Л.Г. Молекулярная генетика в селекции сельскохозяйственной птицы / Л.Г. Коршунова, Р.В. Карапетян // Птицеводство. - 2018. - №2. - С. 2-5.
2. Коршунова, Л.Г. Использование генетических методов на основе ДНК-маркеров продуктивных признаков в селекции кур / Л.Г. Коршунова, Р.В. Карапетян // Птицеводство. - 2021. - №5. - С. 4-7.
3. Zhuang, Z.X. Genomic regions and pathways associated with thermotolerance in layer-type strain Taiwan indigenous chickens / Z.X. Zhuang, S.E. Cheng, C.F. Chen, E.C. Lin, S.Y. Huang // J. Therm. Biol. - 2020. - V. 88. - P. 102486.
4. Гальперн, И.Л. Использование двух генофондных пород кур для создания трехлинейного яично-мясного кросса / И.Л. Гальперн, О.Ю. Перинек, З.Л. Федорова // Птица и птицепродукты. - 2020. - №1. - С. 34-39.
5. Тыщенко, В.И. Генетическая изменчивость в 3-х популяциях межпородных гибридов генофондных кур биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ / В.И. Тыщенко // Генетика и разведение животных. - 2018. - №1. - С. 28-32.
6. Chen, L. Population genetic analyses of seven Chinese indigenous chicken breeds in a context of global breeds / L. Chen, X. Wang, D. Cheng, K. Chen, Y. Fan, G. Wu, J. You, S. Liu, H. Mao, J. Ren // Anim. Genet. - 2019. - V. 50. - No.1. - P. 82-86.
7. Бородин, А.М. Селекция продуктивности кур влияет на гены иммунной системы / А.М. Бородин, Я.И. Алексеев, К.Е. Герасимов, Н.В. Коновалова, Е.В. Терентьева, Д.Н. Ефимов, Ж.В. Емануйлова, Л.И. Тучемский, А.А. Комаров, В.И. Фисинин // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2020. - Т. 24. - №7. - С. 755-760.
8. Макарова, А.В. Пример использования генофонда кур в селекционной программе / А.В. Макарова // Генетика и разведение животных. - 2019. - №3. - С. 24-28.
9. Han, W. Genome-wide analysis of the role of DNA methylation in inbreeding depression of reproduction in Langshan chicken / W. Han, Q. Xue, G. Li, J. Yin, H. Zhang, Y. Zhu, W. Xing, Y. Cao, Y. Su, K. Wang, J. Zou // Genomics. - 2020. - V. 112. - No. 4. - P. 2677-2687.
10. Stephens, J.C. Estimation of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints / J.C. Stephens, D.A. Gilbert, N. Yuhki, S.J. O'Brien // Mol. Biol. Evol. - 1992. - V. 9. - No 4. - P. 729-743.

Сведения об авторах:

Терлецкий В.П.: доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник; valeriter@mail.ru.

Тыщенко В.И.: кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; tinatvi@mail.ru.

Статья поступила в редакцию 19.12.2022; одобрена после рецензирования 13.01.2023; принята к публикации 23.01.2023.



Specific Features of the Genomic DNA Structure in Gene Pool Chicken Populations as Revealed by Multilocus DNA Probe

Valery P. Terletsky, Valentina I. Tyshchenko

All-Russian Research Institute of Animal Genetics and Breeding, branch of the Federal Science Center for Animal Husbandry of L.K. Ernst

Abstract. Molecular genetic technologies are presently taking an increasingly important place in breeding programs aimed at the improvement of existing breeds and populations of chickens as well as preservation of valuable gene pool breeds. Small-sized local breeds are a source of valuable genes that can be used in breeding of commercial chickens. Multilocus analysis using labeled DNA probes enables the simultaneous analysis of multiple genetic loci and calculation of genetic parameters both within and between the populations. The data on the use of the multilocus probe (GTG)₅ in molecular hybridization reaction on six breeds and populations of chickens of various origins are presented. The large genetic distance was observed between the Black-White Australorp and the Bald-necked breeds ($D=0.155$). According to the criterion of average heterozygosity, the internal genetic diversity in population of Bald-necked chickens surpassed that in the Yurlov Crows and Black-White Australorps. Marker DNA fragments specific for individual breeds have been identified. In another experiment the genetic closeness of Pavlov chicken population from Moscow Province and the population from the gene pool collection of our Institute was noted. It was concluded that multilocus analysis is an effective tool for investigation of the specific features of genome organization in chicken breeds and populations.

Keywords: chicken breeds, genetic variability, heterozygosity.

For Citation: Terletsky V.P., Tyshchenko V.I. (2023) Specific features of the genomic DNA structure in gene pool chicken populations as revealed by multilocus DNA probe. *Ptitsevodstvo*, 72(2): 14-18. (in Russ.)
doi: 10.33845/0033-3239-2023-72-2-14-18

References

1. Korshunova LG, Karapetyan RV (2018) Molecular genetic methods in poultry selection. *Ptitsevodstvo*, (2):2-5 (in Russ.).
2. Korshunova LG, Karapetyan RV (2021) *Ptitsevodstvo*, (5):4-7; doi 10.33845/0033-3239-2021-70-5-4-7 (in Russ.).
3. Zhuang ZX, Cheng SE, Chen CF, Lin EC, Huang SY (2020) *J. Therm. Biol.*, **88**:102486; doi 10.1016/j.jtherbio.2019.102486.
4. Galpern IL, Perinek OY, Fedorova ZL (2020) *Poultry Chicken Prod.*, (1):34-9; doi 10.30975/2073-4999-2020-22-1-34-39 (in Russ.).
5. Tyshchenko VI (2018) *Anim. Genet. Breed.*, (1):28-32; doi 10.31043/2410-2733-2018-1-28-32 (in Russ.).
6. Chen L, Wang X, Cheng D, Chen K, Fan Y, Wu G, You J, Liu S, Mao H, Ren J (2019) *Anim. Genet.*, **50**(1):82-6; doi 10.1111/age.12732.
7. Borodin AM, Alekseev YI, Gerasimov KE, Konovalova NV, Terentjeva EV, Efimov DN, Emanuylova ZV, Tuchemsky LI, Komarov AA, Fisinin VI (2020) *Vavilov J. Genet. Sel.*, **24**(7):755-60; doi 10.18699/VJ20.670 (in Russ.).
8. Makarova AV (2019) *Anim. Genet. Breed.*, (3):24-8; doi 10.31043/2410-2733-2019-3-24-28 (in Russ.).
9. Han W, Xue Q, Li G, Yin J, Zhang H, Zhu Y, Xing W, Cao Y, Su Y, Wang K, Zou J (2020) *Genomics*, **112**(4):2677-87; doi 10.1016/j.ygeno.2020.02.007.
10. Stephens JC, Gilbert DA, Yuhki N, O'Brien SJ (1992) *Mol. Biol. Evol.*, **9**(4):729-43. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040755.

Authors:

Terletsky V.P.: Dr. of Biol. Sci., Prof., Chief Research Officer; valeriter@mail.ru. **Tyshchenko V.I.:** Cand. of Biol. Sci., Senior Research Officer; tinatvi@mail.ru.

Submitted 19.12.2022; revised 13.01.2023; accepted 23.01.2023.