

## ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГАПЛОТИПОВ В ЛОКУСЕ ИНСУЛИНА В ПОПУЛЯЦИЯХ КУР КОМБИНИРОВАННОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ

Л. В. ШУЛИКА, Р. А. КУЛИБАБА

Институт животноводства НААН Украины  
г. Харьков, Украина, 61026

(Поступила в редакцию 08.01.2019)

Изучены особенности распределения гаплотипов и гаплогрупп для мутаций T+3737C и A+3971G в локусе инсулина в популяциях кур породы род-айленд красный (линия 38) и плимутрок белый (линия Г2) украинской селекции. В целом по группам выявлено 3 гаплотипа (H2, H3 и H4) из 4 возможных. Гаплотип H1 (CA) в опытных популяциях не обнаружен. Популяции кур линий 38 и Г2 высокодостоверно отличались друг от друга по частотам H2, H3 и H4 ( $p < 0,001$ ). Значения частот гаплотипов H2 (CG), H3 (TA) и H4 (TG) составили соответственно 0,635; 0,245 и 0,12 в линии 38, и 0,035; 0,518 и 0,447 – в линии Г2. По результатам анализа особенностей распределения комбинаций гаплотипов выявлено, что в популяции кур породы род-айленд красный с наиболее высокой частотой представлена гаплогруппа H2/H2, а в популяции кур породы плимутрок белый – гаплогруппа H3/H4 соответственно. Оценка стандартизированной меры неравновесия по сцеплению показала наличие полного неравновесия по сцеплению для локуса инсулина в обеих изученных популяциях ( $D' = 1$ ). Полученные данные могут быть использованы в дальнейшей селекционно-племенной работе с опытными популяциями для формирования микролиний с заданными гаплотипами в их пределах.

**Ключевые слова:** популяция, гаплотип, неравновесие по сцеплению, ген инсулина, ПЦР-ПДФ, куры.

We have studied peculiarities of the distribution of haplotypes and haplogroups for T + 3737C and A + 3971G mutations in the insulin locus in populations of the Rhode Island Red breed of chicken (line 38) and Plimutrok white (Line G2) of Ukrainian breeding. In general, the groups revealed 3 haplotypes (H2, H3 and H4) out of 4 possible. Haplotype H1 (CA) was not found in the experimental populations. The populations of chicken of lines 38 and G2 highly differed from each other in the frequencies H2, H3 and H4 ( $p < 0.001$ ). Frequencies of haplotypes H2 (CG), H3 (TA) and H4 (TG) were, respectively, 0.635; 0.245 and 0.12 in line 38, and 0.035; 0.518 and 0.447 are in the G2 line. According to the results of the analysis of patterns of distribution of haplotype combinations, it was found that the H2 / H2 haplogroup is the most frequent in the population of the Rhode Island red chicken, and the H3 / H4 haplogroup in the population of the Plimutrok white chicken is, respectively. Evaluation of a standardized linkage disequilibrium measure showed the presence of complete linkage disequilibrium for the insulin locus in both studied populations ( $D' = 1$ ). The obtained data can be used in further selection and breeding work with experimental populations for the formation of microlines with given haplotypes within them.

**Key words:** population, haplotype, linkage disequilibrium, insulin gene, PCR-RFLP, chickens.

### Введение

В настоящее время использование молекулярно-генетических методов исследований в мировой практике селекции сельскохозяйственной птицы становится необходимостью с учетом поддержания темпов развития птицеводческой отрасли (чей дальнейший рост прогнозируется Всемирной продовольственной организацией) [1]. Изучение полиморфизма ДНК, его связи с хозяйственно ценными признаками создает основу для проведения эффективной селекционно-племенной работы с опытными популяциями кур. Особую ценность для исследований представляет изучение полиморфизма генов-кандидатов, задействованных в регуляции основных физиологических процессов организма (в первую очередь гормонов и регуляторных факторов), связанных с формированием хозяйственно полезного признака [2]. При этом, как правило, в каждом из целевых генов может быть выявлена более чем одна мутация (полиморфизм). При изучении двух и более полиморфизмов в пределах одного гена представляет интерес не только анализ отдельных мутаций в частности, но и гаплотипов в целом. Для нескольких отдельно взятых полиморфизмов может быть выявлено существование неравновесия по сцеплению (Linkage Disequilibrium, LD), что в свою очередь приводит к их наследованию в виде единого функционального целого [3]. Степень неравновесия по сцеплению может варьировать вплоть до полного LD (complete LD), что проявляется в наследовании сцепленных полиморфизмов как единой функциональной единицы, и в свою очередь может быть использовано при создании линий птицы с заданными гаплотипами. Подобный подход особенно актуален при использовании маркер-ассоциированной селекции с помощью ДНК-маркеров, так как приводит к снижению затрат по сравнению с проведением селекционной работы на основе отдельных (не сцепленных) мутаций [4]. Таким образом, анализ особенностей организации генетического материала птицы посредством оценки степени неравновесия по сцеплению отдельных ДНК-полиморфизмов представляет существенный интерес для практических целей селекции.

К генам, перспективным для использования с целью маркер-ассоциированной селекции на улучшение продуктивных качеств кур, относится ген инсулина [5]. Ген инсулина (*INS*) имеет

относительно небольшого размер, содержит в своем составе 3 экзона и 2 интрона. Расположен в 5 хромосоме. Кодирован гормон инсулин, который участвует в регуляции широкого спектра физиологических функций организма: углеводного и жирового обмена, транспорта аминокислот, синтеза белков, стимуляции роста и деления клеток и т. д. Известно, что у кур значения концентраций циркулирующего инсулина сравнимы с таковыми у млекопитающих, однако для них характерна низкая чувствительность к экзогенному инсулину [6].

Изучение последовательностей гена инсулина привело к обнаружению ряда полиморфизмов, что отражено в соответствующих публикациях. Так, в одной из работ изучали однонуклеотидные полиморфизмы G11303145A, C11304264T, T11306685C и C11306451T в гене инсулина, а также их влияние на содержание жира в тушке и свойства мышечных волокон кур [7]. В другом исследовании обнаружено 26 полиморфизмов (2 indel, 24 SNP), 7 из которых находились в пределах сайтов рестрикции для различных эндонуклеаз: C195T, T409C, A428G, C1218A, C1549T, T3737C и A3971G, что позволяет выявлять их с использованием метода ПЦР-ПДРФ (Полимеразная Цепная Реакция – Полиморфизм Длин Рестриционных Фрагментов) [8]. По мутациям C1549T, T3737C и A3971G изучена генетическая структура нативных пород кур Вьетнама [9]. Еще в одном исследовании показана связь мутаций A+428G, C+1549T, T+3737C и A+3971G, а также гаплотипов по всем 4 мутациям с мясной продуктивностью кур; при этом оценка неравновесия по сцеплению авторами не проводилась [10].

Таким образом, ген инсулина у кур обладает довольно высокой степенью полиморфизма, что делает его весьма перспективным в контексте использования в маркер-ассоциированной селекции. Что касается мутаций T+3737C и A+3971G, то они представляют интерес как полиморфизмы, ассоциированные, в первую очередь, с показателями мясной продуктивности кур. Изучение особенностей распределения гаплотипов и оценка LD для указанных полиморфизмов в популяциях кур украинской селекции комбинированного направления продуктивности, к которым относятся линии 38 и Г2, ранее не проводилось, что и определяет новизну и актуальность предлагаемых исследований.

**Цель работы** – изучить особенности распределения гаплотипов для мутаций T+3737C и A+3971G в локусе инсулина в популяциях кур пород род-айленд красный (линия 38) и плимутрок белый (линия Г2).

#### **Основная часть**

Работа проведена на базе Государственной опытной станции птицеводства и Института животноводства Национальной академии аграрных наук Украины. Для исследования было сформировано две опытные группы кур комбинированного направления продуктивности: линия 38 породы род-айленд красный (n=100) и линия Г2 породы плимутрок белый (n=100). Индивидуальные генотипы кур по каждой из мутаций определяли с помощью метода ПЦР-ПДРФ. В качестве источника генетического материала использовали кровь птицы. Экстракцию ДНК осуществляли коммерческим набором реагентов «ДНК-Сорб Б» («ДНК-технология», РФ). При детекции мутаций T+3737C и A+3971G в локусе инсулина для амплификации целевых фрагментов ДНК использовали две пары праймеров, описанных Qiu et al (2006) [10]. Последующую рестрикцию ампликонов выполняли с помощью эндонуклеазы MspI («Сибэнзим», РФ). Рестриционные фрагменты разделяли методом горизонтального электрофореза в агарозных гелях и для визуализации окрашивали бромистым этидием. На основе полученных данных определяли частоты гаплотипов. Расчет частот гаплотипов производили по EM-алгоритму с использованием программы EH+ [11]. Оценку неравновесия по сцеплению осуществляли с помощью программы 2LD [12]. Достоверность различий частот гаплотипов между опытными популяциями оценивали методом угловой трансформации Фишера [13]. Методику изучения энтропии в опытных популяциях, предложенную О. О. Катериничем с соавторами не использовали вследствие ее недостаточности в качестве основы для расчетов в частности и выраженного антинаучного характера в целом [14].

В результате исследований показано, что в обеих опытных популяциях ген инсулина относится к полиморфным и представлен двумя аллелями по каждой из изучаемых мутаций: для T+3737C обнаружены аллели С и Т, для A+3971G – А и G. Исходя из полученных данных, теоретически ожидается наличие четырех вариантов гаплотипов – СА (Н1), СG (Н2), ТА (Н3) и TG (Н4). Рассчитанные фактические частоты гаплотипов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Гаплотипы по локусу инсулина (мутации T+3737C и A+3971G) и их частоты в опытных популяциях кур

Гаплотип	Мутация		Порода (линия)	
	T+3737C	A+3971G	род-айленд красный (38)	плимутрок белый (Г2)
H1 (CA)	C	A	0,000	0,000
H2 (CG)	C	G	0,635	0,035
H3 (TA)	T	A	0,245	0,518
H4 (TG)	T	G	0,120	0,447

Исходя из приведенных данных по частотам гаплотипов, можно сделать вывод о выраженных различиях в генетической структуре опытных популяций. Так если для популяции кур породы род-айленд красный (линия 38) характерно преобладание только одного гаплотипа – H2, то в популяции кур породы плимутрок белый (линия Г2) с довольно высокой частотой встречается уже два гаплотипа – H3 и H4 (частота встречаемости гаплотипа H3 выше таковой для H4). В то же время гаплотип H2 в линии Г2 имеет относительно самую низкую частоту, в отличие от линии 38, где реже всего встречается гаплотип H4. Различия в частотах встречаемости указанных гаплотипов (H2, H3, H4) оказались высокодостоверными ( $p < 0,001$ ) между опытными популяциями.

В то же время в каждой из опытных популяций выявлено полное отсутствие гаплотипа H1 (CA). Поскольку, как отмечено выше, теоретически ожидается, что будут присутствовать все возможные варианты гаплотипов, полученные данные указывают на вероятное наличие отклонения от равновесия по сцеплению (LD) в линиях 38 и Г2.

Расчеты стандартизированной меры неравновесия по сцеплению ( $D'$ ) подтвердили данное предположение. Для обеих изученных популяций данный показатель принимает максимальное значение ( $D'=1$ ), что указывает на полное неравновесие по сцеплению (complete LD) для мутаций T+3737C и A+3971G в гене инсулина. Предположительно, полученные результаты можно пояснить близким расположением выявленных мутаций в пределах одной хромосомы – на расстоянии около 250 пар нуклеотидов в пределах одного локуса.

Обнаруженное неравновесие по сцеплению в опытных популяциях дает возможность, в случае необходимости (например, если будет обнаружена связь между продуктивностью кур и определенными гаплотипами), создать в пределах опытных популяций микролинии с заданными гаплотипами (ассоциированными с повышенной продуктивностью), которые будут наследоваться как один функциональный элемент.

Кроме того, наряду с проведенными исследованиями проанализированы особенности распределения комбинаций гаплотипов (гаплогрупп) в опытных популяциях. Результаты расчетов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Комбинации гаплотипов (гаплогруппы) и особенности их распределения в опытных популяциях кур

	H1 (CA)	H2 (CG)	H3 (TA)	H4 (TG)
Линия 38				
H1 (CA)	0	–	–	–
H2 (CG)	0	0,42	–	–
H3 (TA)	0	0,31	0,07	–
H4 (TG)	0	0,12	0,04	0,04
Линия Г2				
	H1 (CA)	H2 (CG)	H3 (TA)	H4 (TG)
H1 (CA)	0	–	–	–
H2 (CG)	0	0	–	–
H3 (TA)	0	0,03	0,25	–
H4 (TG)	0	0,04	0,51	0,17

Поскольку в обеих популяциях частота гаплотипа H1 равна нулю, гаплогруппы, содержащие его в своем составе, также полностью отсутствуют. Более того, как следует из представленных выше данных, в популяции кур породы плимутрок белый на момент исследования отсутствовала комбинация гаплотипов H2/H2, возможно, вследствие низкой частоты встречаемости в ней гаплотипа H2. Напротив, в популяции кур породы род-айленд красный чаще всего встречаются особи с гаплогруппой H2/H2, несколько реже – с гаплогруппой H2/H3. В линии Г2 с самой высокой частотой представлена гаплогруппа H3/H4, и практически в два раза более низкой – H3/H3. Касательно комбинаций гаплотипов, которые встречались реже всего в опытных популяциях – в линии 38 ими оказались гаплогруппы H3/H4 и H4/H4, тогда как в линии Г2 – гаплогруппы H2/H3 и H3/H4. Таким образом, как следует из полученных результатов исследований, опытные популяции существенно отличаются не только по частотам гаплотипов, но

и по распределению их комбинаций, несмотря на то, что обе они относятся к комбинированному типу продуктивности.

### **Заключение**

Проведенные исследования позволили впервые в популяциях кур украинской селекции выявить факт полного неравновесия по сцеплению в локусе инсулина ( $D' = 1$ ) между мутациями T+3737C и A+3971G, что может быть использовано в дальнейшей селекционно-племенной работе с данными популяциями. Изучены особенности распределения частот гаплотипов и гаплогрупп в гене инсулина по указанным мутациям в линиях 38 (род-айленд красный) и Г2 (плимутрок белый), между опытными группами выявлены достоверные различия. Показано, что в линии 38 с наиболее высокой частотой представлен гаплотип H2 и гаплогруппа H2/H2, в то время как в линии Г2 – гаплотип H3 и гаплогруппа H3/H4 соответственно.

### *ЛИТЕРАТУРА*

1. OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027 / OECD/FAO. – Paris/Rome : OECD Publishing/FAO, 2018. – 108 p.
2. Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификация племенного материала в животноводстве: учеб. пособие / Н. А. Зиновьева [и др.]. – М.: РУДН, 2008. – 329 с.
3. Slatkin M. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future / M. Slatkin // *Nat Rev Genet.* – 2008. – Vol. 9, № 6. – P. 477–485.
4. Кулібаба, Р. О. Аналіз розподілу гаплотипів у локусах пролактину та інсуліноподібного ростового фактора-I у популяціях курей різних порід / Р. О. Кулібаба, П. С. Юрко, Ю. В. Ляшенко // *Вісник аграрної науки.* – 2018. – № 3. – С. 30–34.
5. Xu Z. Overview of genomic insights into chicken growth traits based on genome-wide association study and microRNA regulation / Z. Xu, Q. Nie, X. Zhang // *Current genomics.* – 2013. – Vol. 14, № 2. – P. 137–146.
6. Dupont J. Insulin signaling in chicken liver and muscle / J. Dupont, S. Tesseraud, J. Simon // *General and Comparative Endocrinology.* – 2009. – Vol. 163. – P. 522–57.
7. Polymorphism of growth-correlated genes associated with fatness and muscle fiber traits in chickens / M. Lei [et al.] // *Poultry Science.* – 2007. – Vol. 86. – P. 835–842.
8. Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography / Q. Nie [et al.] // *Genet. Sel. Evol.* – 2005. – Vol. 37. – P. 339–360.
9. Single nucleotide polymorphisms in GH, GHR, GHSR and insulin candidate genes in chicken breeds of Vietnam / D. Khoa [et al.] // *Greener J. of Agricultural Sci.* – 2013. – Vol. 10. – P. 716–724.
10. Association of Single Nucleotide Polymorphisms of the Insulin Gene with Chicken Early Growth and Fat Deposition / F.F. Qiu [et al.] // *Poultry Sci.* – 2006. – Vol. 85 – P. 980–985.
11. Zhao J. H. Model-free analysis and permutation tests for allelic associations / J. H. Zhao, D. Curtis, P. C. Sham // *Hum Hered.* – 2000. – Vol. 50. – P. 133–139.
12. Zapata C. Sampling variance and distribution of the D measure of overall gametic disequilibrium between multiallelic loci / C. Zapata, C. Carollo, S. Rodriguez // *Ann Hum Genet.* – 2001. – Vol. 65. – P. 395–406.
13. Лакин, Г. Ф. Биометрия: 4-е изд. / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
14. Катеринич, О. О. Мінливість інформаційних параметрів імуногенетичної структури курей / О. О. Катеринич, Т. Е. Ткачик, В. П. Хвостик // *Сучасне птахівництво.* – 2014. – № 2 (135). – С. 8–10.