

© А. Г. Демин, М. И. Данилова,
С. А. Галкина

ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Проанализирован полиморфизм полной последовательности контрольной области митохондриальной ДНК (D-петля длиной 1231/1232 п.н.) у кур павловской породы в трех популяциях (ВНИТИП, ФГУП «Генофонд», г. Барнаул). Проведено сравнение с последовательностями, маркерами для гаплогрупп А-I, W, X. Генетическая однородность и стабильность показана для популяций ВНИТИП и Барнаула, тогда как высокий полиморфизм — для популяции ФГУП «Генофонд». Выявлена тенденция к генетической фрагментации павловской породы, что в обозримом будущем может привести к формированию нескольких филогенетически не связанных пород.

✿ **Ключевые слова:** контрольная область; *Gallus gallus domesticus*; гаплотип; гаплогруппа; материнская линия.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА D-ПЕТЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОПУЛЯЦИОННОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУР ПОРОДЫ ПАВЛОВСКАЯ

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития науки изучение генетического разнообразия, центров происхождения, а также истории формирования пород домашних кур (*Gallus gallus domesticus*) тесно связано с внедрением и совершенствованием методов, основанных на применении молекулярно-филогенетических маркеров. К числу наиболее востребованных методов изучения доместификации сельскохозяйственных животных, в том числе кур, относится анализ полиморфизма последовательностей митохондриальной ДНК (мтДНК): либо некодирующей контрольной области (D-петли), либо полных митохондриальных геномов (Fumihito et al., 1994, 1996; Niu et al., 2002; Miao et al., 2013). Использование подобных маркеров позволяет определять количество материнских линий, участвовавших в формировании породы, оценивать их географическое происхождение, а также выявлять предполагаемые дикие предковые формы, послужившие основой для последующей селекции.

МтДНК обладает рядом уникальных особенностей, позволяющих эффективно использовать маркеры на ее основе в филогенетических исследованиях широкого спектра организмов. МтДНК легко выделяется из биологических образцов, так как представлена в клетках большим числом копий. Гены мтДНК эволюционируют в 5–10 раз быстрее ядерных, при этом различные участки митохондриального генома изменяются с разной скоростью (Lynch, 2007), что позволяет выбирать наиболее подходящий маркер для исследований микро- и макроэволюционных процессов. МтДНК в большинстве случаев не рекомбинирует и наследуется по материнской линии, что значительно упрощает исследование и последующий анализ результатов.

D-петля (D-loop, control region, CR) мтДНК курицы представляет собой некодирующую область длиной 1231/1232 п.н. (позиции 1–1231 в последовательности #AP003317 из базы данных GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>). Здесь располагаются сайт инициации репликации и гипервариабельный домен размером 591 п.н. (Hoque et al., 2013), скорость накопления нуклеотидных замен в котором максимальна для мтДНК, что позволяет проводить филогенетические исследования с высоким разрешением, вплоть до дифференциации отдельных популяций (Stoneking et al., 1991). Гипервариабельный домен располагается в некодирующей области ДНК, и возникшие в его последовательности мутации являются эволюционно нейтральными, что позволяет получать эволюционные схемы, максимально коррелирующие со временем дивергенции. Начиная с 2000 годов маркеры на основе мтДНК активно используются для изучения генетического разнообразия и истории происхождения современных пород кур. Особенно интенсивно исследуются популяции кур Юго-Восточной Азии, где располагались центры первоначального одомашнивания (Fumihito et al., 1994, 1996; Niu et al., 2002; Liu et al., 2004, 2006; Miao et al., 2013; Wu et al., 2014). В результате несколькими независимыми группами авторов (Liu et al., 2006; Miao et al., 2013) была разработана классификация гаплотипов мтДНК кур, основанная, в частности, на полиморфизме последовательности D-петли, что значительно упростило задачу изучения родственных связей между различ-

Поступила в редакцию 14.11.2015
Принята к публикации 07.12.2015

ными породами. Все многообразие существующих гаплотипов мтДНК кур согласно их генетическому сходству было сведено в 13 основных гаплогрупп (Miao et al., 2013). Отметим, что разработанная система гаплогрупп вместе с обширной базой данных секвенированных последовательностей D-петли мтДНК локальных популяций и традиционных пород кур из различных регионов мира (около 5000 последовательностей в базе данных GenBank) представляют ценный ресурс для детального изучения происхождения разных, в том числе и российских, пород домашней курицы.

По данным лаборатории сравнительной генетики животных ИОГен РАН, где на протяжении многих лет проводились комплексные исследования генофондов отечественных пород и популяций одомашненных животных, на территории Российской Федерации разводятся около 50 пород домашних кур, созданных отечественной народной и промышленной селекцией (Моисеева, 2006). Среди них — широко известная за пределами России павловская порода, предположительно созданная в XVIII веке на территории Нижегородской губернии. Небольшой хохолок, большие борода и баки, крепкие оперенные ноги, черно-каемчатое золотистое или серебристое оперение придают этой породе экзотический, выразительный и запоминающийся вид. Обобщающее описание морфологических и генотипических характеристик, а также гипотез о происхождении этой декоративной породы дано в исчерпывающем обзоре И. Г. Моисеевой (Моисеева, 2006). Заметим, что после Октябрьской революции, событий Гражданской и Первой мировой войн, раскулачивания значительная часть поголовья павловской породы была утрачена, что привело к угрозе полного ее исчезновения (Серебровский, 1976). Долгое время существование породы поддерживалось лишь силами птицеводов-любителей, и только со второй половины XX века началась интенсивная работа по восстановлению павловской породы на базе научно-исследовательских институтов. В настоящий момент павловская порода активно разводится не только в России, но и за рубежом (Моисеева, 2006).

Результаты исследования морфотипологических характеристик показали близость павловской породы с бентамками (русский королек) и тремя разновидностями шабо (японская бентамка), однако на весьма далеком от них расстоянии (Моисеева, 2006). Куры павловской породы из трех российских популяций были также протестированы по шести биохимическим локусам, контролирующим белки яйца и сыворотки крови. Сравнение частот локусов G (3) (вариант овоглобулина) и ES (1) (активность эстеразы-1 сыворотки крови) с аналогичными показателями европейских и азиатских пород выявило, что павловская относится к европейским курам. Коэффициент ожидаемой гетерозиготности (Ht) павловских кур составил 0,133 против 0,191 у «мирового» генофонда, 0,170 у европейских

и 0,190 у азиатских пород (Моисеева, 2006). Таким образом, по морфологическим признакам куры павловской породы ближе к азиатским породам, а по биохимическим — к европейским.

В настоящей работе проведен анализ полиморфизма D-петли мтДНК представителей павловской породы. Использование данного маркера в свете современных представлений о происхождении и генетическом разнообразии кур расширяет наши представления об истории формирования и современном состоянии генофонда одной из самых знаменитых российских пород кур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили образцы геномной ДНК 37 особей кур породы павловская из коллекции Федерального государственного унитарного предприятия «Генофонд» (ФГУП «Генофонд», г. Пушкин) — 10 особей, из популяции Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства (ФГБНУ ВНИТИП, г. Сергиев Посад) — 18 особей, из частных хозяйств Алтая (г. Барнаул) — 9 особей.

Аmplификацию последовательности D-петли мтДНК (1231/1232 п.н.) кур выполняли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров 1F 5'-AGGACTACGGCTTGAAGAGC-3' и 2R 5'-CATCTTGGCATCTTCAGTGCC-3' (Niu et al., 2002). ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: однократный буфер для Taq-полимеразы, 2 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого нуклеотида дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, 2,5 ед. Taq-полимеразы (все — НПО Силекс, Москва), 1 мкМ каждого праймера (НПО «Бигль», Санкт-Петербург), 100–400 нг геномной ДНК в качестве матрицы. Пробирки с реакционной смесью помещали в термоциклер MJ Mini (BioRad, США) и использовали следующую программу амплификации: денатурация 95 °С — 4', далее 35 циклов 95 °С — 30", 60 °С — 35", 72 °С — 70", завершающий синтез 72 °С — 10'. Электрофоретическая детекция полученных ПЦР-продуктов проводилась в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Секвенирование выполнялось с использованием анализатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США). Помимо праймеров 1F и 2R для секвенирования применялись праймеры 3F 5'-TGGTTCCTCGGTCAGGCACATCC-3' и 4R 5'-CGCAACGCAGGTGTAGTC-3' (Oka et al., 2007). Полученные последовательности опубликованы в базе данных GenBank под номерами: KP307061–KP307097.

Первичный анализ нуклеотидных последовательностей проводили в программе BioEdit v.5.0.9 (Hall et al., 1999). Нуклеотидный полиморфизм (Nd) и гаплотипическое разнообразие (Hd) анализировали при помощи программы DnaSP v.4.0 (<http://www.ub.edu/dnasp/>) (Rozas et al., 2003). Для анализа распре-

деления выявленных гаплотипов по известным гаплогруппам мтДНК конструировали генетическую сеть с использованием метода медианного соединения (Median Joining, MJ) в программе Network 4.613 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharnet.htm>) (Bandelt et al., 1999). Для построения медианной сети были использо-

ваны 37 полученных в данном исследовании первичные последовательности D-петли мтДНК кур павловской породы и 80 последовательностей (табл. 1) из общедоступной базы NCBI GenBank, принадлежащих к 11 гаплогруппам по классификации, предложенной Мiao и соавторами (Miao et al., 2013).

Таблица 1

Последовательности гаплотипов D-петли, маркирующие гаплогруппы согласно Мiao и др. (Miao et al., 2013)

№ депонирования в GenBank	Гаплогруппа	Авторы	Номер депонирования в GenBank	Гаплогруппа	Авторы
AB268521	A	Oka et al., 2007	AF512118	E1	Liu et al., 2006
AB263973	A	Wada et al. неопубл.	AY644988	E1	Liu et al., 2006
GU261684	A	Miao et al., 2013	GU447924	E1	Miao et al., 2013
GU447980	A	Miao et al., 2013	EU352856	E1	Ramadan et al., 2011
AB009444	A	Miyake et al., неопубл.	AY704698	E1	Liu et al., 2004
EU847801	A	Kanginakudru et al., 2008	EU367397	E1	Karaman et al., неопубл.
GU261705	B	Miao et al., 2013	GU261686	E1	Miao et al., 2013
GU448883	B	Miao et al., 2013	AP003318	E1	Nishibori et al., 2002
GQ258699	B	Revay et al., 2010	AY235570	E1	Froman et al., 2005
AY644972	B	Liu et al., 2006	AP003580	E1	Nishibori et al., 2002
AY704720	B	Liu et al., 2004	AM746040	E1	Muchadeyi et al., 2008
AY704729	B	Liu et al., 2004	GQ258694	E1	Revay et al., 2010
GU447895	B	Miao et al., 2013	GU447801	E1	Miao et al., 2013
GU261718	C1	Miao et al., 2013	GU447986	E1	Miao et al., 2013
GU447975	C1	Miao et al., 2013	GU447818	E1	Miao et al., 2013
HM015608	C1	Dana et al., 2011	GU447894	E1	Miao et al., 2013
GU448406	C1	Miao et al., 2013	AY645017	E1	Liu et al., 2006
GU261681	C1	Miao et al., 2013	HQ857209	E2	Miao et al., 2013
GU261680	C2	Miao et al., 2013	GU448376	E2	Miao et al., 2013
GU448724	C2	Miao et al., 2013	GU448666	E2	Miao et al., 2013
D82901	C2	Fumihito et al., 1996	EU847815	E2	Kanginakudru et al., 2008
GU261716	C3	Miao et al., 2013	HQ857211	E3	Miao et al., 2013
GU261707	C3	Miao et al., 2013	HQ857212	E3	Miao et al., 2013
AF512160	C3	Liu et al., 2006	GU447982	E3	Miao et al., 2013
AY588636	C3	Dana et al., 2011	AY588630	E3	Dana et al., 2011
AY704718	C3	Liu et al., 2004	EU847808	E3	Kanginakudru et al., 2008
GU261687	D	Miao et al., 2013	GU447701	F	Miao et al., 2013
GU261677	D	Miao et al., 2013	GU261711	F	Miao et al., 2013
GU261685	D	Dana et al., 2011	GU261691	F	Miao et al., 2013
GU261697	D	Miao et al., 2013	GU261688	F	Miao et al., 2013
NC_007237	D	Nishibori et al., 2005	HM015609	F	Dana et al., 2011
EU095053	D	Mwacharo et al., 2011	GU448379	F	Miao et al., 2013
AB268529	D	Oka et al., 2007	GU261710	G	Miao et al., 2013
GU261683	D	Miao et al., 2013	GU261678	G	Miao et al., 2013
GU261713	E1	Miao et al., 2013	GU447702	G	Miao et al., 2013
GU261709	E1	Miao et al., 2013	HM462144	G	Berthouly-Salazar et al., 2010
AP003319	E1	Nishibori et al., 2005	GU261715	H	Miao et al., 2013
AY704726	E1	Liu et al., 2004	AB268543	H	Oka et al., 2007
AM746042	E1	Muchadeyi et al., 2008	GU261698	I	Miao et al., 2013
GU261706	W	Miao et al., 2013	GU261692	X	Miao et al., 2013

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы провели анализ полной последовательности контрольного региона (D-петли) мтДНК у 37 особей из трех популяций кур породы павловская. Все нуклеотидные последовательности имели длину 1231/1232 п. н. В суммарной выборке представителей трех изученных популяций последовательность D-петли содержала 22 полиморфных сайта, в 16 из которых замены были представлены только транзициями, в 5 — только трансверсиями, а сайт в 859-м положении охарактеризован нами как индел (табл. 2).

Исследованные выборки кур павловской породы характеризуются высокой полиморфностью — в трех популяциях в общей сложности выявлено 11 самостоятельных гаплотипов. При этом в популяции ВНИТИП присутствует 4 гаплотипа, в популяции из Барнаула — 5, в популяции ФГУП «Генофонд» — тоже 5. Один из выявленных гаплотипов был обнаружен во всех популяциях и оказался полностью идентичным эталонной последова-

тельности D-петли белого леггорна (#AB098668 в базе данных GenBank (Nishibori et al., 2005)), что предполагает наличие общего для изученных популяций предка по материнской линии. Еще один гаплотип является общим для популяций ВНИТИП и Барнаула, остальные 9 гаплотипов специфичны для разных популяций. Нуклеотидное разнообразие, рассчитанное на основе сравнения полученных первичных последовательностей как среднее число нуклеотидных замен на позицию между двумя случайно выбранными последовательностями (Nei, 1973), оказалось минимальным для популяции ВНИТИП (табл. 3), так же как и гаплотипическое разнообразие. В совокупности это может указывать на то, что данная популяция первоначально была сформирована из особей, объединенных общим происхождением. Высокий уровень нуклеотидного и гаплотипического разнообразия, наблюдаемый в выборке кур из популяции ФГУП «Генофонд» (табл. 3), косвенно свидетельствует о существовании горизонтального потока генов между данной популяцией и неродственными ей популяциями

Таблица 2

Расположение полиморфных сайтов в последовательности D-петли мтДНК выявленных гаплотипов у кур породы павловская. РМ — популяция ВНИТИП (г. Сергиев Посад), Р — популяция ВНИИРГЖ (г. Пушкин), РВ — популяция г. Барнаула

Гаплотипы	Позиции полиморфных сайтов																					
	73	97	167	190	210	217	225	243	246	250	256	261	310	396	446	686	859	1139	1149	1157	1214	1225
AP003317 (Nishibori et al., 2002)	A	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T	G	—	A	A	C	T	A
РМ1,3,5-15,18,20 Р2,9,10 РВ4,5,7-9	A	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T	G	—	A	A	C	T	A
РМ4,19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	—	—	—	.
РМ16	C	G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	G	A	C	.
РМ17,18	—	G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.
Р1,3,6,8	—	—	C	—	T	T	T	T	—	—	T	C	C	—	C	A	—	—	—	—	C	.
Р4	—	—	C	—	—	T	T	T	—	—	T	C	C	C	C	—	C	—	—	—	C	.
Р5	—	—	—	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.
Р20	—	—	C	—	T	T	T	T	—	—	T	C	C	—	C	A	—	—	—	—	—	.
РВ6	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.
РВ10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	.
РВ12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	—	—	—	T

Таблица 3

Нуклеотидное (Nd) и гаплотипическое (Hd) разнообразие в трех популяциях кур павловской породы. n — объем выборки, Hn — количество гаплотипов

Популяция и объем выборки	Контрольный регион (D-петля) мтДНК
ФГУП «Генофонд» (г. Пушкин) n = 10	Hn = 5, Nd = 0,005, Hd = 0,8
ВНИТИП (г. Сергиев Посад) n = 18	Hn = 4, Nd = 0,00077, Hd = 0,399
Популяция г. Барнаула n = 9	Hn = 5, Nd = 0,0009, Hd = 0,72

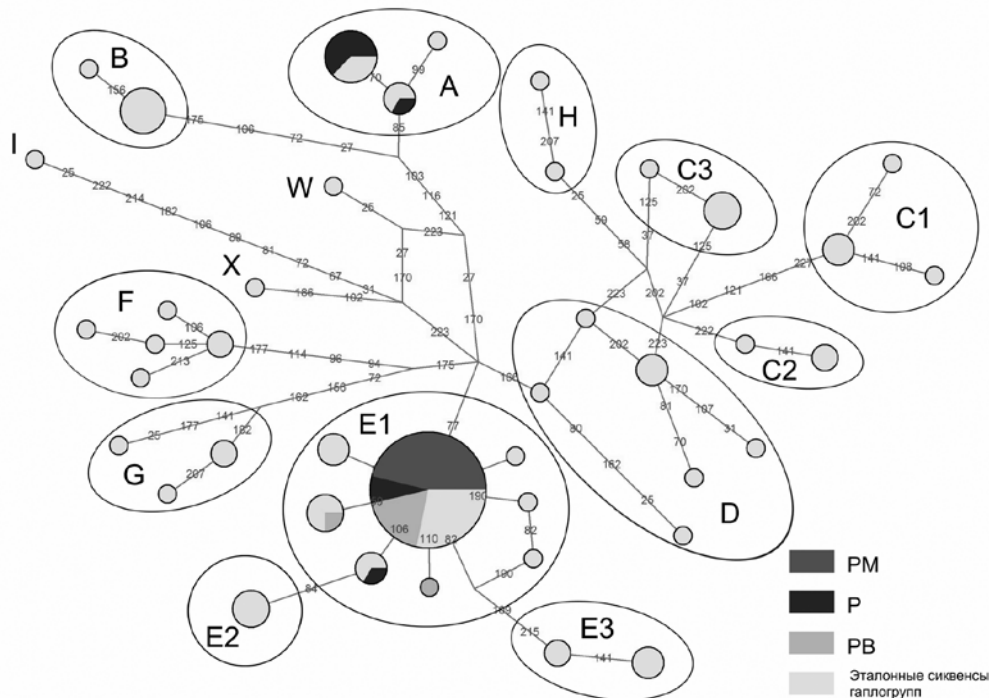


Рис. 1. Медианная сеть расстояний (MJ-сеть), демонстрирующая распределение выявленных гаплотипов у кур породы павловская по гаплогруппам мтДНК домашней курицы *G.g. domesticus*. Цифры между гаплотипами — позиции нуклеотидных замен. Крупными латинскими буквами и цифрами обозначены названия гаплогрупп по Мiao и др. (Miao et al., 2013). P — популяция ФГУП «Генофонд» (г. Пушкин), PB — популяция г. Барнаула, PM — популяция ВНИТИП (г. Сергиев Посад)

других пород либо может указывать на то, что в основе данной популяции первоначально находились особи, имевшие различную генетическую историю.

Для анализа положения выявленных гаплотипов D-петли представителей павловской породы в современной системе гаплогрупп мтДНК кур, а также анализа родственных связей между популяциями павловской породы была построена генетическая сеть методом медианного соединения (MJ). Всего в реконструкции было использовано 117 последовательностей D-петли, из которых 80 представляли гаплотипы, маркерные для 11 гаплогрупп мтДНК кур, а 37 — последовательности, полученные в настоящей работе. Мы проанализировали наиболее изменчивый фрагмент гиперварибельного домена D-петли протяженностью 251 нуклеотид (позиции 141–391 в последовательности AP003317). Всего было выявлено 49 переменных сайтов, из которых парсимониально информативными оказались 38.

Из анализа полученной схемы (рис. 1) следует, что генофонд павловской породы кур представлен вариантами гаплотипов, входящих в две широко распространенные гаплогруппы — E1 и A (Liu et al., 2006; Miao et al., 2013). При этом гаплотипы гаплогруппы E1 характерны для представителей всех исследованных популяций павловской породы. Согласно последним данным, именно куры — носители гаплотипов гаплогруппы E1 первыми попали в Европу (Storey et al., 2012;

Girdland et al., 2014). Это обстоятельство позволяет предположить, что предковые популяции, на основе которых формировалась павловская порода, могли иметь европейское происхождение.

Все варианты рассматриваемого фрагмента D-петли, выявленные в популяции ВНИТИП (г. Сергиев Посад), оказались связанными с единственным гаплотипом из гаплогруппы E1, что свидетельствует о генетической однородности и стабильности данной популяции (рис. 1). Аналогичная ситуация наблюдается и в популяции из Барнаула, где три выявленных гаплотипа также оказались связанными с гаплогруппой E1. Очевидно, что на протяжении долгого времени использование генетически удаленных особей других пород для восстановления и поддержания данных популяций носило ограниченный характер. Наиболее неоднородной, генетически смешанной оказалась структура популяции ФГУП «Генофонд» (г. Пушкин). Гаплотипы, характерные для этой популяции, принадлежат двум гаплогруппам E1 и A. При этом в анализируемой выборке доминировали носители гаплогруппы A. Подобная структура генофонда популяции ФГУП «Генофонд», по-видимому, отображает процесс селекционной работы по усилению породных признаков павловской породы за счет активного включения в популяцию представителей генетически удаленных пород неевропейского или смешанного происхождения.

Таким образом, основываясь на данных анализа полиморфизма последовательностей D-петли, можно утверждать, что в многолетней работе по сохранению и восстановлению кур павловской породы на сегодняшний день стали четко различимы две основные стратегии. Условно их можно обозначить «консервативной» и «реконструктивной». Консервативная стратегия заключается в опоре преимущественно на имеющийся генетический материал с низким вкладом в генофонд неевропейских представителей. На уровне митохондриального генофонда это выражается в отсутствии гаплотипов, неродственных гаплогруппе E1. Реконструктивная стратегия связана с модернизацией имеющегося генетического материала за счет активного привлечения неродственных пород и популяций с целью воссоздания, улучшения и усиления описанных в литературе признаков павловской породы. На уровне митохондриального генофонда это проявляется в значительном возрастании доли гаплотипов, удаленных от гаплогруппы E1. В результате подобной селекционной работы реконструкция фенотипических особенностей павловской породы происходит за счет перераспределения и замещения исходного генетического материала, что полностью исключает возможность изучения ранней истории формирования павловской породы по генетическим данным. Развитие описанных стратегий в обозримом будущем неминуемо привет к генетической фрагментации павловской породы и формированию нескольких филогенетически не связанных пород.

Благодарности. Авторы выражают признательность А. Ф. Яковлеву и А. Коциняну за помощь в получении образцов ДНК. Практическая часть исследования была выполнена на оборудовании ресурсных центров «ЦКП Хромас» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета. Работа поддержана РФФИ (грант № 14-04-01469) и частично СПбГУ (# 1.50.1043.2014).

ЛИТЕРАТУРА

- Моисеева И. Г. (2006) Породы кур и их генофонды. Под ред. И. А. Захарова. Генетические ресурсы животноводства России. Москва. Наука; С. 229–388.
- Серебровский А. С. (1976) Генетический очерк павловской породы кур. Избранные труды по генетике и селекции кур. Москва. Наука; С. 356–378.
- Bandelt H.-J., Forster P., Rohl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* V. 16: P. 37–48.
- Berthouly-Salazar C., Rognon X., Van T. et al. (2010) Vietnamese chickens: a gate towards Asian genetic diversity. *BMC Genet.* V. 18 (11). Cited 5.11.2015. DOI: 10.1186/1471-2156-11-53.
- Dana N., Megens H. J., Crooijmans R. P. et al. (2011) East Asian contributions to Dutch traditional and western commercial chickens inferred from mtDNA analysis. *Anim Genet.* V. 42 (2): P. 125–133.
- Froman D. P., Kirby J. D. (2005) Sperm mobility: phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. *Biol Reprod.* V. 72 (3): P. 562–567.
- Fumihito A., Miyake T., Sumi S. et al. (1994) One subspecies of the red jungle fowl (*Gallus gallus gallus*) fices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91 (26): P. 12505–12509.
- Fumihito A., Miyake T., Takada M. et al. (1996) Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93 (13): P. 6792–6795.
- Girdland Flink L., Allen R., Barnett R. et al. (2014) Establishing the validity of domestication genes using DNA from ancient chickens. *Proc Natl Acad Sci USA.* V. 111 (17): P. 6184–6189.
- Hall T. A. (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series.* V. 41: P. 95–98.
- Hoque M. R., Choi N. R., Sultana H. et al. (2013) Phylogenetic analysis of a privately-owned Korean native chicken populations using mtDNA D-loop variations. *Asian-Australas J Anim Sci.* V. 26 (2): P. 157–162.
- Kanginakudru S., Metta M., Jakati R. D., Nagaraju J. (2008) Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. *BMC Evol Biol.* V. 8 (174). Cited 5.11.2015. DOI: 10.1186/1471-2148-8-174.
- Liu Z. G., Lei C. Z., Luo J. et al. (2004) Genetic variability of mtDNA sequences in Chinese native chicken breeds. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* V. 17: P. 903–907.
- Liu Y. P., Wu G. S., Yao Y. G. et al. (2006) Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. *Mol Phylogenet Evol.* V. 38 (1): P. 12–9.
- Lynch M. (2007) *The origins of genome architecture.* Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Miao Y.-W., Peng M.-S., Wu G.-S. et al. (2013) Chicken domestication: an updated perspective based on mitochondrial genomes. *Heredity (Edinb).* V. 110 (3): P. 277–282.
- Muchadeyi F. C., Eding H., Simianer H. et al. (2008) Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. *Anim Genet.* V. 39 (6): P. 615–622.
- Mwacharo J. M., Bjørnstad G., Mobegi V. et al. (2011) Mitochondrial DNA reveals multiple introductions of domestic chicken in East Africa. *Mol Phylogenet Evol.* V. 58 (2): 374–382. Cited 5.11.2015. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.11.027.

19. Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. V. 70 (12): P. 3321–3323.
20. Niu D., Fu Y., Luo J. et al. (2002) The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. *Biochem. Genet.* V. 40 (5–6): P. 163–174.
21. Nishibori M., Tsudzuki M., Hayashi T. et al. (2002) Complete nucleotide sequence of the *Coturnix chinensis* (blue-breasted quail) mitochondrial genome and a phylogenetic analysis with related species. *J Hered.* V. 93 (6): P. 439–444.
22. Nishibori M., Shimogiri T., Hayashi T., Yasue H. (2005) Molecular evidence for hybridization of species in the genus *Gallus* except for *Gallus varius*. *Animal Genetics*. V. 36: P. 367–375.
23. Oka T., Ino Y., Nomura K. et al. (2007) Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Anim Genet.* V. 38 (3): P. 287–293.
24. Qu L., Li X., Xu G. et al. (2006) Evaluation of genetic diversity in Chinese indigenous chicken breeds using microsatellite markers. *Science in China Series C: Life Sciences*. V. 49 (4): P. 332–341.
25. Ramadan H. A. I., Galal A., Fathi M. M. et al. (2011) Characterization of two Egyptian native chicken breeds using genetic and immunological parameters. *Biotechnology in Animal Husbandry*. V. 27 (1): P. 1–16.
26. Revay T., Bodzsar N., Mobegi V.E. et al. (2010) Origin of Hungarian indigenous chicken breeds inferred from mitochondrial DNA D-loop sequences. *Animal Genetics*. V. 41: P. 548–550.
27. Rozas J., Sánchez-DelBarrio J. C., Messeguer X., Rozas R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. V. 19 (18): P. 2496–2497.
28. Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi R.G. et al. (1991) Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet.* V. 48 (2): P. 370–382.
29. Storey A. A., Athens J. S., Bryant D. et al. (2012) Investigating the global dispersal of chickens in prehistory using ancient mitochondrial DNA signatures. *PLoS ONE*. V. 7 (7): e39171. Cited 5.11.2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0039171.
30. Wu Y. P., Huo J. H., Xie J. F. et al. (2014) Phylogeography and origin of Chinese domestic chicken. *Mitochondrial DNA*. V. 25 (2): P. 126–130.

MITOCHONDRIAL DNA D-LOOP POLYMORPHISM ANALYSIS FOR ESTIMATION OF DIVERSITY IN CHICKEN FLOCKS OF PAVLOV BREED

Demin A. G., Danilova M. I., Galkina S. A.

✿ **SUMMARY:** Elucidation of the complex origin of various chicken breeds and populations is of essential importance for understanding, preserving and exploiting their genetic diversity. Here, we aim to assess different contributions to mitochondrial genetic diversity of Pavlov chicken breed. Mitochondrial DNA control region (D-loop of 1231/1232 b. p. length) in 37 chickens of Pavlov breed was sequenced. Individuals were selected from three flocks belonging to Federal State Unitary research farm “Gene Pool” (Genofond), Pushkin, Leningrad region, to the collection farm of All-Russian R&D and Technology Institute of Poultry Industry (GNU VNITIP), Sergiev Posad, Moscow region, and to fancy breeders from Barnaul (Altai region). The Pavlov chicken D-loop sequences were compared with D-loop sequences annotated in GenBank for established chicken haplogroups. We have found eleven haplotypes belonging to two haplogroups (E1 and A). Genetic uniformity and stability have been shown for the GNU VNITIP and Barnaul flocks, while D-loop high polymorphism was found in the population from the research farm “Gene Pool”. There appears a tendency for genetic fragmentation of Pavlov chicken breed.

✿ **KEYWORDS:** control region; *Gallus gallus domesticus*; haplotype; haplogroup; maternal lineage.

REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Moiseeva I. G. (2006) Porody kur i ikh genofondy [Breeds of chickens and their gene pools]. Pod red. I. A. Zakharova. *Geneticheskie resursy zhivotnovodstva Rossii*. Moskva. Nauka; S. 229–388.
2. Serebrovskiy A. S. (1976) *Geneticheskiy ocherk pavlovskoy porody kur* [Genetic Essay of the Pavlov Chicken Breed]. *Izbrannye trudy po genetike i selektsii kur*. Moskva. Nauka; C. 356–378.
3. Bandelt H.-J., Forster P., Rohl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* V. 16: P. 37–48.
4. Berthouly-Salazar C., Rognon X., Van T. et al. (2010) Vietnamese chickens: a gate towards Asian genetic diversity. *BMC Genet.* V. 18 (11). Cited 5.11.2015. DOI: 10.1186/1471-2156-11-53.
5. Dana N., Megens H. J., Crooijmans R. P. et al. (2011) East Asian contributions to Dutch traditional and western commercial chickens inferred from mtDNA analysis. *Anim Genet.* V. 42 (2): P. 125–133.
6. Froman D. P., Kirby J. D. (2005) Sperm mobility: phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. *Biol Reprod.* V. 72 (3): P. 562–567.
7. Fumihito A., Miyake T., Sumi S. et al. (1994) One subspecies of the red jungle fowl (*Gallus gallus gallus*) fices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91 (26): P. 12505–12509.
8. Fumihito A., Miyake T., Takada M. et al. (1996) Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93 (13): P. 6792–6795.
9. Girdland Flink L., Allen R., Barnett R. et al. (2014) Establishing the validity of domestication genes using DNA from ancient chickens. *Proc Natl Acad Sci USA*. V. 111 (17): P. 6184–6189.

10. Hall T.A. (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*. V. 41: P. 95–98.
11. Hoque M.R., Choi N.R., Sultana H. et al. (2013) Phylogenetic analysis of a privately-owned Korean native chicken populations using mtDNA D-loop variations. *Asian-Australas J Anim Sci*. V. 26 (2): P. 157–162.
12. Kanginakudru S., Metta M., Jakati R.D., Nagaraju J. (2008) Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. *BMC Evol Biol*. V. 8 (174). Cited 5.11.2015. DOI: 10.1186/1471-2148-8-174.
13. Liu Z.G., Lei C.Z., Luo J. et al. (2004) Genetic variability of mtDNA sequences in Chinese native chicken breeds. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. V. 17: P. 903–907.
14. Liu Y.P., Wu G.S., Yao Y.G. et al. (2006) Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. *Mol Phylogenet Evol*. V. 38 (1): P. 12–9.
15. Lynch M. (2007) *The origins of genome architecture*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
16. Miao Y.-W., Peng M.-S., Wu G.-S. et al. (2013) Chicken domestication: an updated perspective based on mitochondrial genomes. *Heredity (Edinb)*. V. 110 (3): P. 277–282.
17. Muchadeyi F.C., Eding H., Simianer H. et al. (2008) Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. *Anim Genet*. V. 39 (6): P. 615–622.
18. Mwacharo J.M., Bjørnstad G., Mobegi V. et al. (2011) Mitochondrial DNA reveals multiple introductions of domestic chicken in East Africa. *Mol Phylogenet Evol*. V. 58 (2): 374–382. Cited 5.11.2015. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.11.027.
19. Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. V. 70 (12): P. 3321–3323.
20. Niu D., Fu Y., Luo J. et al. (2002) The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. *Biochem. Genet*. V. 40 (5–6): P. 163–174.
21. Nishibori M., Tsudzuki M., Hayashi T. et al. (2002) Complete nucleotide sequence of the *Coturnix chinensis* (blue-breasted quail) mitochondrial genome and a phylogenetic analysis with related species. *J Hered*. V. 93 (6): P. 439–444.
22. Nishibori M., Shimogiri T., Hayashi T., Yasue H. (2005) Molecular evidence for hybridization of species in the genus *Gallus* except for *Gallus varius*. *An Gen*. V. 36: P. 367–375.
23. Oka T., Ino Y., Nomura K. et al. (2007) Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Anim Genet*. V. 38 (3): P. 287–293.
24. Qu L., Li X., Xu G. et al. (2006) Evaluation of genetic diversity in Chinese indigenous chicken breeds using microsatellite markers. *Science in China Series C: Life Sciences*. V. 49 (4): P. 332–341.
25. Ramadan H.A.I., Galal A., Fathi M.M. et al. (2011) Characterization of two Egyptian native chicken breeds using genetic and immunological parameters. *Biotechnology in Animal Husbandry*. V. 27 (1): P. 1–16.
26. Revay T., Bodzsar N., Mobegi V.E. et al. (2010) Origin of Hungarian indigenous chicken breeds inferred from mitochondrial DNA D-loop sequences. *Animal Genetics*. V. 41: P. 548–550.
27. Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. V. 19 (18): P. 2496–2497.
28. Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi R.G. et al. (1991) Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet*. V. 48 (2): P. 370–382.
29. Storey A.A., Athens J.S., Bryant D. et al. (2012) Investigating the global dispersal of chickens in prehistory using ancient mitochondrial DNA signatures. *PLoS ONE*. V. 7 (7): e39171. Cited 5.11.2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0039171.
30. Wu Y.P., Huo J.H., Xie J.F. et al. (2014) Phylogeography and origin of Chinese domestic chicken. *Mitochondrial DNA*. V. 25 (2): P. 126–130.

✪ Информация об авторах

Демин Александр Геннадьевич — к. б. н., стажер-исследователь, кафедра цитологии и гистологии. ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет». 198504, Санкт-Петербург, Ораниенбаумское шоссе, д. 2. E-mail: rustle.reed@gmail.com.

Данилова Мария Игоревна — студент, кафедра цитологии и гистологии. ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет». 198504, Санкт-Петербург, Ораниенбаумское шоссе, д. 2. E-mail: noxforest@yandex.ru.

Галкина Светлана Анатольевна — к. б. н., доцент, кафедра цитологии и гистологии. ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет». 198504, Санкт-Петербург, Ораниенбаумское шоссе, д. 2. E-mail: svetlana.galkina@spbu.ru.

Demin Alexander Gennadievich — Postdoc, PhD, Department of Histology and Cytology. Saint Petersburg State University. 198504, Saint Petersburg, Oranienbaumskoe shosse, 2, Russia. E-mail: rustle.reed@gmail.com.

Danilova Maria Igorevna — Student, BSc, Department of Histology and Cytology. Saint Petersburg State University. 198504, Saint Petersburg, Oranienbaumskoe shosse, 2, Russia. E-mail: noxforest@yandex.ru.

Galkina Svetlana Anatolievna — Assistant professor, PhD, Department of Histology and Cytology. Saint Petersburg State University. 198504, Saint Petersburg, Oranienbaumskoe shosse, 2, Russia. E-mail: svetlana.galkina@spbu.ru.