



# Kent Academic Repository

Volkova, Natalia A., Kotova, T.O., Vetokh, Anastasia N., Larionova, Polina V., Volkova, Ludmila A., Romanov, Michael N and Zinovieva, Natalia A. (2024) *[Genome-wide association study of testes development indicators in roosters (*Gallus gallus L.*)] Полногеномные ассоциативные исследования показателей развития семенников у петухов (*Gallus gallus L.*). Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology], 59 (4). pp. 649-657. ISSN 0131-6397.*

## Downloaded from

<https://kar.kent.ac.uk/107237/> The University of Kent's Academic Repository KAR

## The version of record is available from

<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2024.4.649eng>

## This document version

Publisher pdf

## DOI for this version

## Licence for this version

UNSPECIFIED

## Additional information

In Russian; English abstract

## Versions of research works

### Versions of Record

If this version is the version of record, it is the same as the published version available on the publisher's web site. Cite as the published version.

### Author Accepted Manuscripts

If this document is identified as the Author Accepted Manuscript it is the version after peer review but before type setting, copy editing or publisher branding. Cite as Surname, Initial. (Year) 'Title of article'. To be published in **Title of Journal**, Volume and issue numbers [peer-reviewed accepted version]. Available at: DOI or URL (Accessed: date).

### Enquiries

If you have questions about this document contact [ResearchSupport@kent.ac.uk](mailto:ResearchSupport@kent.ac.uk). Please include the URL of the record in KAR. If you believe that your, or a third party's rights have been compromised through this document please see our [Take Down policy](https://www.kent.ac.uk/guides/kar-the-kent-academic-repository#policies) (available from <https://www.kent.ac.uk/guides/kar-the-kent-academic-repository#policies>).

ПОЛНОГЕНОМНЫЕ АССОЦИАТИВНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РАЗВИТИЯ СЕМЕННИКОВ У ПЕТУХОВ (*Gallus gallus* L.)\*Н.А. ВОЛКОВА , Т.О. КОТОВА, А.Н. ВЕТОХ, П.В. ЛАРИОНОВА,  
Л.А. ВОЛКОВА, М.Н. РОМАНОВ, Н.А. ЗИНОВЬЕВА

Репродуктивная способность — один из основных показателей, определяющих племенную ценность самцов. Он зависит прежде всего от функционального состояния клеток семенников. Фертильность самцов определяется сложными физиологическими процессами, затрагивающими образование зрелых половых клеток — спермиев в процессе сперматогенеза. Формирование и накопление половых клеток происходит в семенных канальцах семенников, в связи с чем оценка развития гонад может служить одним из показателей, характеризующих сперматогенез и репродуктивный потенциал самцов. В ряде исследований на сельскохозяйственных животных, включая птицу, показана генетическая обусловленность этого признака. Выявлены соответствующие однонуклеотидные полиморфизмы SNPs и гены, детерминирующие рост и развитие мужских гонад. В настоящем сообщении представлены результаты GWAS-исследований массы и морфометрических показателей семенников петухов (*Gallus gallus* L.) F<sub>2</sub> ресурсной популяции. Впервые идентифицированы новые достоверно значимые SNPs и гены-кандидаты ( $p < 1,05 \times 10^{-4}$ ), детерминирующие рост и развитие гонад у петухов. Целью работы был поиск и идентификация генов, ассоциированных с массой и морфометрическими параметрами семенников у петухов. Объектом исследований были петухи F<sub>2</sub> модельной ресурсной популяции ( $n = 115$ ), полученной посредством межпородного скрещивания двух пород — русская белая и белый корниш. Материалом для получения ДНК служила пухля пера. ДНК выделяли с использованием коммерческого набора ДНК Экстран-2 (ООО «НПФ Синтол», Россия) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Генотипирование проводили с использованием чипов средней плотности Illumina Chicken 60K SNP iSelect BeadChip («Illumina, Inc.», США). В возрасте 63 сут после экспериментального убоя птицы определяли массу и изучали морфометрические показатели развития (длина, толщина) семенников. На основании полученных генотипических и фенотипических данных у петухов F<sub>2</sub> ресурсной популяции был проведен GWAS-анализ с помощью программного обеспечения PLINK 1.9. Исследованная популяция петухов характеризовалась высоким коэффициентом изменчивости по изученным показателям. Коэффициент изменчивости по массе семенника достигал 96,1 %, по линейным параметрам — 39,1 %. Масса и линейные параметры левого семенника были на 5-14 % выше значений, полученных для правого ( $p \leq 0,05$ ). GWAS-анализ выявил 36 достоверно значимых SNPs ( $p < 1,05 \times 10^{-4}$ ), ассоциированных с показателями роста и развития семенников петухов в возрасте 63 сут, в частности с массой, длиной и толщиной семенника — соответственно 3, 26 и 7 SNPs. SNPs были локализованы на хромосомах GGA1, GGA3, GGA6, GGA7, GGA12, GGA15 и GGA18. В области выявленных SNPs идентифицировано 156 генов, в том числе 16 генов, совпадающих с позициями таких SNPs, в частности 1 ген (*WNT7A*), связанный с массой семенников, 13 генов (*LHFPL1*, *GALNT3*, *TMEM198*, *CACNA2D3*, *CCDC66*, *CACNA1D*, *DENND6A*, *CELSR3*, *WNT7A*, *IP6K2*, *ERC2*, *ABHD6*, *DEPDC5*) — с длиной семенника, 3 гена (*ESR1*, *POLE*, *RNF2*) — с толщиной семенника. Результаты исследования могут быть использованы в геномной селекции на повышение репродуктивного потенциала петухов.

Ключевые слова: *Gallus gallus*, петухи, GWAS, SNPs, гены-кандидаты, семенники, репродуктивный потенциал.

Воспроизводительная способность самцов сельскохозяйственных животных, включая птицу, — один из ключевых критериев, определяющих их племенную ценность (1, 2). Фертильность и реализация репродуктивного потенциала самцов зависят от множества генетических (3-6) и негенетических (7-10) факторов и определяются прежде всего количественными и качественными характеристиками семени (11-13).

Формирование, развитие и созревание половых клеток самцов происходят в процессе сперматогенеза, включающего несколько стадий дифференцировки половых клеток от сперматогониев до зрелых половых клеток — спермиев (14, 15). Все стадии сперматогенеза протекают в гонадах

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, тема № FGGN-2024-0015.

самцов — семенниках. В мужских гонадах происходит закладка, формирование, созревание, накопление и хранение половых клеток. В гонадах самцов также вырабатывается половой гормон тестостерон, регулирующий процесс сперматогенеза (14, 16). То есть от функционального состояния и степени развития мужских гонад зависит полноценность протекания сперматогенеза. С учетом этого оценка развития семенников может рассматриваться как один из простых и эффективных методов характеристики воспроизводительности самцов и прогнозирования их репродуктивного потенциала.

В ряде исследований установлена взаимосвязь размеров семенников с репродуктивными признаками самцов, в том числе с показателями качества семени и возрастом полового созревания (17, 18). Показана положительная корреляция размеров семенников с объемом эякулята, концентрацией спермы, подвижностью сперматозоидов, долей спермиев с нормальной морфологией (17-19).

На сегодняшний день достигнуты определенные успехи в изучении генетических механизмов формирования и проявления репродуктивных признаков у самцов сельскохозяйственных животных и птицы. Эти работы проводятся с помощью ассоциативных исследований (20, 21) и особенно полногеномных ассоциативных исследований (genome-wide association studies, GWAS) (22-24). Выявлены и идентифицированы гены-кандидаты, связанные с ростом и развитием мужских гонад у разных видов животных, в том числе у хряков (25, 26), баранов (27, 28), козлов (29), петухов (30), рыб (31). Таким образом, поиск и идентификация генов, ассоциированных с показателями развития мужских гонад, актуальны и востребованы в связи с задачами селекции и отбора самцов с высоким репродуктивным потенциалом. Удобной информативной моделью для проведения таких молекулярно-генетических исследований служат F<sub>2</sub> ресурсные популяции (32, 33).

В настоящем сообщении представлены результаты GWAS-исследований массы и морфометрических показателей семенников петухов F<sub>2</sub> ресурсной популяции. Впервые идентифицированы новые достоверно значимые SNPs и гены-кандидаты, детерминирующие рост и развитие гонад у петухов.

Целью работы был поиск и идентификация генов, ассоциированных с массой и морфометрическими параметрами семенников у петухов.

*Методика.* Объектом исследований были петухи (*Gallus gallus* L.) F<sub>2</sub> ресурсной популяции ( $n = 115$ ) (физиологический двор ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023-2024 годы). Ресурсную популяцию получали посредством межпородного скрещивания пород русская белая (34, 35) и белый корниш (35).

Птицу содержали в помещениях с приточной вентиляцией. Цыплят до 3-недельного возраста выращивали в брудерах с постепенным понижением температуры с 37 до 25 °С, а затем переводили на напольное содержание. На каждом этапе птица имела постоянный доступ к полнорационному комбикорму и свежей воде.

Экспериментальный убой самцов проводили в возрасте 63 сут. Семенники извлекали и оценивали по массе и линейным параметрам (длина, толщина). Взвешивание осуществляли на аналитических весах OHAUS Pioneer PA413C («OHAUS», США), линейные промеры семенников проводили с использованием электронного штангенциркуля.

Материалом для получения ДНК служила пульпа пера. ДНК выделяли с использованием коммерческого набора ДНК Экстран-2 (ООО «НПФ

Синтол», Россия) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Качество ДНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometer N60 («Thermo Fisher Scientific», США), отбирали пробы с соотношением OD<sub>260/280</sub> больше 1,8. Концентрацию ДНК определяли на флуориметре Qubit 2.0 («Invitrogen/Life Technologies», США) с использованием набора для количественного определения ДНК Qubit dsDNA BR Assay («Invitrogen/Life Technologies», США).

Птицу генотипировали с помощью ДНК-чипа Illumina Chicken iSelect BeadChip, содержащего 60 тыс. SNPs («Illumina, Inc.», США), на приборе iScan Reader («Illumina, Inc.», США). Полученные данные загружали в программу GenomeStudio 2.0 («Illumina, Inc.», США) для предварительного анализа. Контроль качества и фильтрацию данных генотипирования выполняли для каждого образца (программный пакет PLINK 1.9, <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>, фильтры: --mind 0.10; --geno 0.1; --maf 0.03).

Для поиска генов-кандидатов, локализованных в области идентифицированных SNPs, использовали геномный ресурс Gallus gallus (chicken) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=9030>). Функциональные аннотации генов проводили с привлечением базы данных GeneCards (<http://www.genecards.org/>) и программы DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>).

Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета для анализа данных в приложении Microsoft Excel. Вычисляли средние значения показателей ( $M$ ), стандартные ошибки средних ( $\pm SEM$ ), минимальные (min) и максимальные (max) значения, коэффициенты вариации ( $C_v$ , %).

**Результаты.** В возрасте 63 сут показатели роста и развития семенников у гибридных самцов F<sub>2</sub> ресурсной популяции характеризовались высокой вариабельностью (табл. 1). Коэффициент изменчивости по показателю массы семенника достигал 96,1 %, по линейным промерам — 39,1 %.

**1. Масса и морфометрические параметры семенников у 63-суточных петухов (*Gallus gallus* L.) F<sub>2</sub> ресурсной популяции, полученной при скрещивании пород русская белая и белый корниш ( $n = 115$ , ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023-2024 годы)**

Показатель	Правый семенник			Левый семенник		
	$M \pm SEM$	Min-max	$C_v$ , %	$M \pm SEM$	Min-max	$C_v$ , %
Масса, г	1,08±0,10	0,13-5,27	95,4	1,29±0,12	0,19-6,00	96,1
Длина, см	1,97±0,05	1,1-3,6	27,5	2,13±0,05*	1,3-3,9	26,9
Толщина, см	0,88±0,03	0,3-2,2	39,1	0,93±0,03	0,4-2,7	35,9

Примечание. Min-max минимальное и максимальное значения,  $M$  — среднее значение;  $C_v$  — коэффициент вариации.

\* Различия с правым семенником статистически значима при  $p \leq 0,05$ .

Следует отметить различия по показателям, установленным для правого и левого семенников. Масса и линейные промеры левого семенника были на 5-14 % выше ( $p \leq 0,05$ ) значений, полученных для правого.

**2. Хромосомная локализация значимых SNPs, связанных с массой и морфометрическими показателями семенников у 63-суточных петухов (*Gallus gallus* L.) F<sub>2</sub> ресурсной популяции, полученной при скрещивании пород русская белая и белый корниш ( $n = 115$ , ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023-2024 годы)**

Показатель	Число SNPs	Хромосома
Масса семенника	3	GGA3, GGA6, GGA12
Длина семенника	26	GGA1, GGA3, GGA7, GGA12, GGA15, GGA18
Толщина семенника	7	GGA3, GGA15
Всего	36	GGA1, GGA3, GGA6, GGA7, GGA12, GGA15, GGA18

GWAS-анализ выявил 36 достоверно значимых SNPs ( $p < 1,05 \times 10^{-4}$ ), ассоциированных с показателями роста и развития семенников у петушков

в возрасте 63 сут, в частности с массой, длиной и толщиной семенника — соответственно 3, 26 и 7 SNPs (табл. 2). Эти SNPs были локализованы на хромосомах GGA1, GGA3, GGA6, GGA7, GGA12, GGA15 и GGA18. Наибольшее число SNPs обнаружили на хромосомах GGA12 и GGA15 (соответственно 15 и 7 SNPs), наименьшее — на GGA6 и GGA18 (1-2 SNPs).

Выявленные SNPs были использованы для аннотирования генов-кандидатов, ассоциированных с показателями развития семенников у петушков в возрасте 63 сут. Структурная аннотация выявила 156 генов, в том числе 16 генов, локализованных в позициях идентифицированных SNPs (табл. 3). Гены локализовались на пяти хромосомах — GGA1 (1 ген), GGA3 (1 ген), GGA7 (2 гена), GGA12 (9 генов) и GGA15 (3 гена).

**3. SNPs и гены-кандидаты ( $p < 1,05 \times 10^{-4}$ ), ассоциированные с массой и линейными промерами семенников у 63-суточных петухов (*Gallus gallus* L.) F2-ресурсной популяции, полученной при скрещивании пород русская белая и белый корниш ( $n = 115$ , ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023-2024 годы)**

Хромосома	SNP	Позиция	Ген
Масса семенника			
GGA3	Gga_rs14404942	101309246	<i>TTC32, WDR35, MATN3, LAPTM4A, SDC1, PUM2, RHOB</i>
GGA6	Gga_rs14590638	30254210	<i>EMX2, RAB11FIP2, FAM204A</i>
GGA12	Gga_rs15640738	6228164	<i>WNT7A<sup>a</sup>, FBLN2, PTPDC1, BARX1</i>
Длина семенника			
GGA1	Gga_rs13653834	54177250	<i>NUAK1, C12orf75, WASHC4, APPL2</i>
GGA1	Gga_rs13962915	157037325	<i>DACH1</i>
GGA1	Gga_rs13962937	157051707	
GGA1	Gga_rs15490641	167976284	<i>SIAH3, ZC3H13, CPB2, LCP1, MIR12214, RUBCNL, LRCH1</i>
GGA1	GGaluga054930	170862713	<i>LHFPL1<sup>a</sup>, COG6</i>
GGA3	GGaluga219349	43493834	—
GGA7	Gga_rs15848642	14307279	—
GGA7	Gga_rs14613335	19324555	<i>GALNT3<sup>a</sup>, SCN1A, TTC21B, CSRNP3, SCN3A</i>
GGA7	Gga_rs15859798	21695329	<i>TMEM198<sup>a</sup>, LY75, MYO10L, SLC4A3, STK11IP, OBSL1, INHA, ASIC4, CHPF, SPEG, DNPEP, PTPRN, GMPPA, DES, STK16, DNAJB2, NHEJ1</i>
GGA12	Gga_rs13610725	7821506	<i>CACNA2D3<sup>a</sup>, LRTM1</i>
GGA12	Gga_rs13610952	8568787	<i>CCDC66<sup>a</sup>, ERC2, ARHGFEF3, IL17RD, TASOR</i>
GGA12	Gga_rs14037205	7347156	<i>CACNA1D<sup>a</sup>, ACTR8, TKTL1, SELENOK, DCPIA, CACNA2D3</i>
GGA12	Gga_rs3137394	7364465	
GGA12	Gga_rs14037340	7472639	<i>CACNA1D, ACTR8, SELENOK, CACNA2D3</i>
GGA12	Gga_rs14038792	8930429	<i>DENND6A<sup>a</sup>, APPL1, IL17RD, HESX1, APPL1, ASB14, DNAH12, ARF4, PDE12, FLNB, ABHD6, DNASE1L3</i>
GGA12	Gga_rs14039134	9211787	<i>CELSR3<sup>a</sup>, SLMAP, FLNB, PDE12, IP6K2, ABHD6, DNASE1L3, COL7A1, UQCRC1, SLC26A6, HMCES, RPN1, RAB7A, GATA2, HIFX, COG1</i>
GGA12	Gga_rs14977015	8844544	—
GGA12	Gga_rs15647547	8822719	—
GGA12	Gga_rs15648466	9150038	<i>IP6K2<sup>a</sup>, FLNB, PDE12, ABHD6, DNASE1L3, CELSR3, SLC26A6, UQCRC1, COG1, H1-10, HMCES, RAB7A</i>
GGA12	Gga_rs15640738	6228164	<i>WNT7A<sup>a</sup>, FBLN2, PTPDC1, BARX1</i>
GGA12	GGaluga084046	7971549	<i>ERC2, WNT5A, CACNA2D3</i>
GGA12	GGaluga084170	8478450	<i>ERC2<sup>a</sup>, CCDC66, FAM208A, ARHGFEF3</i>
GGA12	GGaluga084173	8483018	
GGA12	GGaluga084396	9126622	<i>ABHD6<sup>a</sup>, DENND6A, SLMAP, FLNB, ABHD6, DNASE1L3, IP6K2, NCKIPSD, CELSR3</i>
GGA15	GGaluga109767	8869173	<i>DEPDC5<sup>a</sup>, PRR14L, PISD, SFI1, EIF4ENIF1, DRG1, PATZ1, BCR, RAB36, RSPH14</i>
GGA18	Gga_rs15816563	3068916	<i>FAM18B1, TEK3, PMP22, COX10</i>
Толщина семенника			
GGA3	Gga_rs14356589	48810006	<i>ESR1<sup>a</sup></i>
GGA15	Gga_rs13528895	10684146	<i>OSBP2, IQCD, DUSP21, SLC35E4, TCN2, GAL3ST1, RNF215</i>
GGA15	Gga_rs13528978	11010736	<i>RNF215, CCDC157, SF3A1, TBC1D10A, CASTOR1, LIF, HORMAD2, MTMR3, ASCC2, UQCRC1, ZMAT5, CABP7</i>
GGA15	Gga_rs14094496	10027614	<i>POLE<sup>a</sup>, SUDS3, VSIG10, GPR25, MORC1, CFAP73, DDX54, PEBP1, MIR1640, SMTN, PLA2G3, SELENOM, AIFM3, CARD8, C14ORF166B, SCARF2, PRODH, DGCR6, SLC7A4, P2RX6</i>
GGA15	Gga_rs15024735	10235993	<i>AIFM3, P2RX6, SLC7A4, DGCR6, SCARF2, PRODH, RTN4R</i>
GGA15	Gga_rs15785015	11439162	<i>RNF2<sup>a</sup>, C12orf49, NOS1, FBX021, TESC, FBXW8, MED13L</i>
GGA15	GGaluga111642	12712479	<i>LHX5, SDSL, PLBD2, SLC8B1, CATSPER4</i>

Примечание. <sup>a</sup> — гены, локализованные в позициях идентифицированных SNPs. Прочерки означают отсутствие генов.

Наибольшее число генов было установлено для длины семенника — 91 ген, из них 13 генов (*LHFPL1*, *GALNT3*, *TMEM198*, *CACNA2D3*, *CCDC66*, *CACNA1D*, *DENND6A*, *CELSR3*, *WNT7A*, *IP6K2*, *ERC2*, *ABHD6*, *DEPDC5*) располагались в позициях выявленных SNPs на хромосомах GGA1 (1 ген), GGA7 (2 гена), GGA12 (9 генов) и GGA15 (1 ген). Для показателей масса и толщина семенника было установлено соответственно 14 и 52 гена, связанных с этими признаками, в том числе 4 гена в позициях выявленных SNPs: *WNT7A* на GGA12, *ESR1* на GGA3, *POLE* и *RNFT2* на GGA15 (см. табл. 3).

Рост и развитие семенников — важные признаки, характеризующие репродуктивный потенциал самцов. Для ряда генов-кандидатов, локализованных в позициях идентифицированных SNPs, описаны биологические функции. Так, выявленные гены отвечают за развитие нервной и репродуктивной систем, участвуют в формировании репродуктивных органов (<http://www.genecards.org/>). Для 5 генов-кандидатов, идентифицированных нами, показана связь с селекционно значимыми признаками у кур. В частности, установлены высокодостоверные ассоциации гена *ESR1* с репродуктивными признаками (36-38) и показателями яичной продуктивности (39) у кур, а также массой цыплят (38). Сообщалось о влиянии генов *CACNA1D*, *WNT7A* и *CACNA2D3* на показатели яичной продуктивности кур — прочность (40) и цвет (41) скорлупы, продолжительность периода яйцекладки (42), яйценоскость (43). Показано влияние гена *IP6K2* на эффективность конверсии корма у бройлеров (44). Для других выявленных нами генов-кандидатов установлена связь с репродуктивными и продуктивными признаками у других видов сельскохозяйственных животных и птицы. Так, обнаружены достоверные ассоциации гена *CACNA1D* с фертильностью коров (45), *LHFPL1* — с репродуктивными признаками у свиней (46). Описано влияние гена *ESR1* на показатели яйценоскости перепелов (47) и гусей (48), *ERC2* и *RNFT2* — на молочную продуктивность и качество молока буйволов (49, 50).

Итак, по результатам GWAS исследования идентифицированы одонуклеотидные полиморфизмы SNPs и гены-кандидаты, которые ассоциированы с массой, длиной и толщиной семенников у 63-суточных петухов F<sub>2</sub> ресурсной популяции, полученной при скрещивании пород русская белая и белый корниш. Выявлено 36 значимых SNPs ( $p < 1,05 \times 10^{-4}$ ), связанных с этими показателями и локализованных на хромосомах GGA1, GGA3, GGA6, GGA7, GGA12, GGA15 и GGA18. Установлено 156 генов-кандидатов, в том числе 16 генов, локализованных в пределах идентифицированных SNPs, в частности 1 ген (*WNT7A*), связанный с массой семенников, 13 генов (*LHFPL1*, *GALNT3*, *TMEM198*, *CACNA2D3*, *CCDC66*, *CACNA1D*, *DENND6A*, *CELSR3*, *WNT7A*, *IP6K2*, *ERC2*, *ABHD6*, *DEPDC5*) — с длиной семенника, 3 гена (*ESR1*, *POLE*, *RNFT2*) — с толщиной семенника. Полученные результаты могут быть полезны для выяснения генетических механизмов сперматогенеза, формирования и развития мужских гонад и разработки молекулярных маркеров, которые позволят отбирать особей с генетически высоким репродуктивным потенциалом.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр  
животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,  
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,  
e-mail: natavolkova@inbox.ru ✉, igelin@list.ru, anastezuya@mail.ru,  
volpolina@mail.ru, ludavolkova@inbox.ru, m.romanov@kent.ac.uk,  
n\_zinovieva@mail.ru

Поступила в редакцию  
14 марта 2024 года

# INDICATORS IN ROOSTERS (*Gallus gallus* L.)

N.A. Volkova<sup>✉</sup>, T.O. Kotova, A.N. Vetokh, P.V. Larionova, L.A. Volkova, M.N. Romanov,  
N.A. Zinovieva

Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail natavolkova@inbox.ru (✉ corresponding author), igelin@list.ru, anastezuya@mail.ru, volpolina@mail.ru, ludavolkova@inbox.ru, m.romanov@kent.ac.uk, n\_zinovieva@mail.ru

## ORCID:

Volkova N.A. orcid.org/0000-0001-7191-3550

Volkova L.A. orcid.org/0000-0002-9407-3686

Kotova T.O. orcid.org/0000-0003-4560-7810

Romanov M.N. orcid.org/0000-0003-3584-4644

Vetokh A.N. orcid.org/0000-0002-2865-5960

Zinovieva N.A. orcid.org/0000-0003-4017-6863

Larionova P.V. orcid.org/0000-0001-5047-1888

The authors declare no conflict of interests

## Acknowledgements:

Supported financial by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, topic No. FGGN-2024-0015

Final revision received March 14, 2024

doi: 10.15389/agrobiology.2024.4.649eng

Accepted April 22, 2024

## Abstract

Reproductive ability is one of the main indicators of the male breeding value that depends primarily on the functional state of testes cells. Male fertility is defined by complex physiological processes affecting the formation of mature germ cells, i.e., spermatozoa in the process of spermatogenesis. The forming and accumulation of germ cells occur in the seminiferous tubules of the testes, therefore the gonad development can serve as an indicator characterizing spermatogenesis and the reproductive potential of males. A number of studies on farm animals, including poultry, have shown the genetic determinacy of this trait, with identification of respective single nucleotide polymorphisms (SNPs) and genes determining the male gonad growth and development. In the present investigation, a genome-wide association study (GWAS) of the testes development parameters in roosters (*Gallus gallus* L.) of the F<sub>2</sub> resource population were conducted. For the first time, new significant SNPs and candidate genes ( $p < 1.05 \times 10^{-4}$ ) determining gonad growth and development in roosters were identified. The aim of the research was to seek SNPs and identify genes associated with testes growth parameters in roosters. The object of the study were F<sub>2</sub> roosters from a model resource population ( $n = 115$ ) that was obtained by interbreeding two breeds, Russian White and White Cornish. DNA was extracted from feather pulp using a commercial kit DNK Extran-2 (OOO NPF Sintol, Russia) in accordance with the manufacturer's protocol. Genotyping was carried out using the medium-density Illumina Chicken 60K SNP iSelect BeadChip chip. At the age of 63 days, the experimental birds were slaughtered and the mass and morphometric indices of testes (length and thickness) were examined. Based on the obtained genotypic and phenotypic data, the GWAS analysis was performed in F<sub>2</sub> resource population roosters using PLINK 1.9 software. The examined population was characterized by a high coefficient of variation in the measured indices, 96.1 % for the testes mass and 39.1 % for the linear measurements. The mass and linear measurements of the left testis were 5-14 % higher ( $p \leq 0.05$ ) compared to the right testis. The GWAS analysis revealed 36 significant SNPs ( $p < 1.05 \times 10^{-4}$ ) associated with testes growth and development parameters in 63-day-old cockerels, in particular with the mass, length and thickness of the testes, 3, 26 and 7 SNPs, respectively. SNPs were localized on chromosomes GGA1, GGA3, GGA6, GGA7, GGA12, GGA15, and GGA18. A total of 156 genes were identified in the regions of the detected SNPs, including 16 genes that coincided with the positions of these SNPs. In particular, the latter were one gene (*WNT7A*) associated with the testis mass, 13 genes (*LHFPL1*, *GALNT3*, *TMEM198*, *CACNA2D3*, *CCDC66*, *CACNAID*, *DENND6A*, *CELSR3*, *WNT7A*, *IP6K2*, *ERC2*, *ABHD6*, and *DEPDC5*) associated with the testis length, and three genes (*ESR1*, *POLE*, and *RNFT2*) associated with the testis thickness. These data can be used in genomic selection of roosters aimed at increasing their reproductive potential.

Keywords: *Gallus gallus*, roosters, GWAS, SNPs, candidate genes, testes, reproductive potential.

## REFERENCES

1. Coulter G.H., Foote R.H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. *Theriogenology*, 1979, 11(4): 297-311 (doi: 10.1016/0093-691x(79)90072-4).

2. Thundathil J.C., Dance A.L., Kastelic J.P. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology*, 2016, 86(1): 397-405 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.054).
3. Guo S., Liu Y., Xu Y., Gai K., Cong B., Xing K., Qi X., Wang X., Xiao L., Long C., Guo Y., Chen L., Sheng X. Identification of key genes affecting sperm motility in chicken based on whole-transcriptome sequencing. *Poultry Science*, 2023, 102(12): 103135 (doi: 10.1016/j.psj.2023.103135).
4. Zhang G., Liu P., Liang R., Ying F., Liu D., Su M., Chen L., Zhang Q., Liu Y., Liu S., Zhao G., Li Q. Transcriptome analysis reveals the genes involved in spermatogenesis in white feather broilers. *Poultry Science*, 2024, 103(4): 103468 (doi: 10.1016/j.psj.2024.103468).
5. Dunn I.C., Miao Y.-W., Morris A., Romanov M.N., Wilson P.W., Sharp P.J. The detection and assay of polymorphism in candidate reproductive gene loci in a commercial broiler breeder population for association studies. *Proc. of the Poultry Genetics Symposium*. Working Group 3 of WPSA, Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, Germany, 1999: 113.
6. Dunn I.C., Miao Y.-W., Morris A., Romanov M.N., Wilson P.W., Waddington D., Sharp P.J. Candidate genes and reproductive traits in a commercial broiler breeder population, an association study. *Journal of Animal Science*, 2001, 79(Suppl 1): 43.
7. Byrne C.J., Fair S., English A.M., Urh C., Sauerwein H., Crowe M.A., Lonergan P., Kenny D.A. Effect of breed, plane of nutrition and age on growth, scrotal development, metabolite concentrations and on systemic gonadotropin and testosterone concentrations following a GnRH challenge in young dairy bulls. *Theriogenology*, 2017, 96: 58-68 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.04.002).
8. Brito L.F.C., Barth A.D., Wilde R.E., Kastelic J.P. Effect of growth rate from 6 to 16 months of age on sexual development and reproductive function in beef bulls. *Theriogenology*, 2012, 77(7): 1398-1405 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.003).
9. Gaviley O.V., Tereshchenko O.V., Artemenko O.B., Ogurtsova N.S. Fertilizing capacity of spermatozoa of roosters in experimental T-2 toxicosis. *Ptakhivnytstvo*, 2009, 63: 156-160.
10. Mamontova T.V., Selionova M.I., Aybazov A.-M.M. Sexual activity and sperm production of charolais and ile-de-france rams in different seasons of the year. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2021, 56(4): 752-762 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.4.752rus) (in Engl.).
11. Abilov A.I., Kombarova N.A., Amerkhanov Kh.A., Shemetyuk S.A., Shamshidin A.S., Mymrin S.V., Pyzhova E.A., Bogolyubova N.V., Gudilina A.A., Abilova S.F., Kombarov P.G., Mityashova O.S. Metabolic profiles and sperm production in imported holstein bull sires under different climatic and geochemical conditions of Russia and Kazakhstan. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2021, 56(4): 730-751 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.4.730rus) (in Engl.).
12. Sakhatskiy N.I., Tereshchenko A.V., Artemenko A.B. Ekspress-metod otsenki oplodotvoryayushchey sposobnosti zamorozhenno-ottayannoy spermy sel'skokhozyaystvennoy ptitsy. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 1987, 12: 77-80 (in Russ.).
13. Atroshchenko M.M., Engalycheva M.G., Shitikova A.M. The level of sperm plasma protein oxidative modification assessed in stallions (*Equus ferus caballus* L.) of different ages. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2023, 58(4): 660-668 (doi: 10.15389/agrobiology.2023.4.660rus) (in Engl.).
14. Estermann M.A., Major A.T., Smith C.A. Genetic regulation of avian testis development. *Genes*, 2021, 12(9): 1459 (doi: 10.3390/genes12091459).
15. Beloglazova E.V., Kotova T.O., Volkova N.A., Volkova L.A., Zinovieva N.A., Ernst L.K. Age dynamics of spermatogenesis in cocks in connection with optimization of bioengineering manipulation time. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 6: 60-64 (in Russ.).
16. Kirby J.D., Froman D.P. Reproduction in male birds. In: *Sturkie's avian physiology (fifth edition)*. G. Causey Whittow (ed.). Academic Press, New York, 2000: 597-615 (doi: 10.1016/B978-012747605-6/50024-9).
17. Jacyno E., Kawęcka M., Pietruszka A., Sosnowska A. Phenotypic correlations of testes size with semen traits and the productive traits of young boars. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015, 50(6): 926-930 (doi: 10.1111/rda.12610).
18. Terakado A.P.N., Boligon A.A., Baldi F., Silva J.A., Albuquerque L.G. Genetic associations between scrotal circumference and female reproductive traits in Nelore cattle. *Journal of Animal Science*, 2015, 93(6): 2706-2713 (doi: 10.2527/jas.2014-8817).
19. Ugwu S.O.C., Onyimonyi A.E., Foleng H. Testicular development and relationship between body weight, testis size and sperm output in tropical boars. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8: 1165-1169.
20. Romanov M.N., Miao Y.W., Wilson P.W., Morris A., Sharp P.J., Dunn I.C. Detection and assay of polymorphism in reproductive gene loci in a commercial broiler breeder population for use in association studies. *Proc. Conf. «From Jay Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics»*. J.C.M. Dekkers, S.J. Lamont, M.F. Rothschild (eds.). Iowa State University, Department of Animal Science, Ames, IA, USA, 1999.
21. Dunn I.C., Miao Y.-W., Morris A., Romanov M.N., Waddington D., Wilson P.W., Sharp P.J. Association between candidate genes and reproductive traits in a commercial broiler breeder population. *British Poultry Science*, 2001, 42(Suppl 1): S113-S114 (doi: 10.1080/00071660152681692).
22. Dementieva N.V., Dysin A.P., Shcherbakov Y.S., Nikitkina E.V., Musidray A.A., Petrova A.V., Mitrofanova O.V., Plemiyashov K.V., Azotseva A.I., Griffin D.K., Romanov M.N. Risk of sperm



- disorders and impaired fertility in frozen-thawed bull semen: a genome-wide association study. *Animals*, 2024, 14(2): 251 (doi: 10.3390/ani14020251).
23. Nikitkina E.V., Dementieva N.V., Shcherbakov Y.S., Atroshchenko M.M., Kudinov A.A., Samoylov O.I., Pozovnikova M.V., Dysin A.P., Krutikova A.A., Musidray A.A., Mitrofanova O.V., Plemiyashov K.V., Griffin D.K., Romanov, M.N. Genome-wide association study for frozen-thawed sperm motility in stallions across various horse breeds. *Animal Bioscience*, 2022, 35(12): 1827-1838 (doi: 10.5713/ab.21.0504).
  24. Dementeva N.V., Kudinov A.A., Mitrofanova O.V., Stanishevskaya O.I., Fedorova E.S., Romanov M.N. Genome-wide association study of reproductive traits in a gene pool breed of the Russian White chickens. *Reproduction in Domestic Animals*, 2018, 53(S2): 123-124 (doi: 10.1111/rda.13272).
  25. Zhao Y., Zhang L., Wang L., Zhang J., Shen W., Ma Y., Ding C., Wu G. Identification and analysis of genes related to testicular size in 14-day-old piglets. *Animals*, 2024, 14(1): 172 (doi: 10.3390/ani14010172).
  26. Große-Brinkhaus C., Storck L.C., Frieden L., Neuhoﬀ C., Schellander K., Looft C., Tholen E. Genome-wide association analyses for boar taint components and testicular traits revealed regions having pleiotropic effects. *BMC Genetics*, 2015, 16: 36 (doi: 10.1186/s12863-015-0194-z).
  27. Bai M., Sun L., Zhao J., Xiang L., Cheng X., Li J., Jia C., Jiang H. Histological analysis and identification of spermatogenesis-related genes in 2-, 6-, and 12-month-old sheep testes. *The Science of Nature*, 2017, 104: 84 (doi: 10.1007/s00114-017-1505-1).
  28. Xu H., Sun W., Pei S., Li W., Li F., Yue X. Identification of key genes related to postnatal testicular development based on transcriptomic data of testis in Hu sheep. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 773695 (doi: 10.3389/fgene.2021.773695).
  29. Zou Y., Chen X., Tian X., Guo W., Ruan Y., Tang W., Fu K., Ji T. Transcriptomic analysis of the developing testis and spermatogenesis in Qianbei Ma goats. *Genes*, 2023, 14(7): 1334 (doi: 10.3390/genes14071334).
  30. Zhang H., Na W., Zhang H.-L., Wang N., Du Z.-Q., Wang S.-Z., Wang Z.-P., Zhang Z., Li H. *TCF21* is related to testis growth and development in broiler chickens. *Genetics Selection Evolution*, 2017, 49(1): 25 (doi: 10.1186/s12711-017-0299-0).
  31. Ding J., Tang D., Zhang Y., Gao X., Du C., Shen W., Jin S., Zhu J. Transcriptomes of testes at different developmental stages in the *Opsariichthys bidens* predict key genes for testis development and spermatogenesis. *Marine Biotechnology*, 2023, 25: 123-139 (doi: 10.1007/s10126-022-10186-0).
  32. German N.Yu., Volkova N.A., Larionova P.V., Vetokh A.N., Volkova L.A., Sermyagin A.A., Shakhin A.V., Anshakov D.V., Fisinin V.I., Zinovieva N.A. Genome-wide association studies of growth dynamics in quails *Coturnix coturnix*. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2022, 57(6): 1136-1146 (doi: 10.15389/agrobiol.2022.6.1136rus) (in Engl.).
  33. Volkova N.A., German N.Yu., Larionova P.V., Vetokh A.N., Romanov M.N., Zinovieva N.A. Identification of SNPs and candidate genes associated with abdominal fat deposition in quails (*Coturnix japonica*). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2023, 58(6): 1079-1087 (doi: 10.15389/agrobiol.2023.6.1079rus) (in Engl.).
  34. Abdelmanova A.S., Dotsev A.V., Romanov M.N., Stanishevskaya O.I., Gladyr E.A., Rodionov A.N., Vetokh A.N., Volkova N.A., Fedorova E.S., Gusev I.V., Griffin D.K., Brem G., Zinovieva N.A. Unveiling comparative genomic trajectories of selection and key candidate genes in egg-type Russian White and meat-type White Cornish chickens. *Biology*, 2021, 10(9): 876 (doi: 10.3390/biology10090876).
  35. Romanov M.N., Shakhin A.V., Abdelmanova A.S., Volkova N.A., Efimov D.N., Fisinin V.I., Korshunova L.G., Anshakov D.V., Dotsev A.V., Griffin D.K., Zinovieva N.A. Dissecting selective signatures and candidate genes in grandparent lines subject to high selection pressure for broiler production and in a local Russian chicken breed of Ushanka. *Genes*, 2024, 15(4): 524 (doi: 10.3390/genes15040524).
  36. Luo W., Huang X., Li J., Gu L. Investigating the genetic determination of duration-of-fertility trait in breeding hens. *Scientific Reports*, 2024, 14: 14819 (doi: 10.1038/s41598-024-65675-0).
  37. Rostamzadeh Mahdabi E., Esmailzadeh A., Ayatollahi Mehrgardi A., Asadi Fozzi M. A genome-wide scan to identify signatures of selection in two Iranian indigenous chicken ecotypes. *Genetics Selection Evolution*, 2021, 53: 72 (doi: 10.1186/s12711-021-00664-9).
  38. Chu J., Ma Y., Song H., Zhao Q., Wei X., Yan Y., Fan S., Zhou B., Li S., Mou C. The genomic characteristics affect phenotypic diversity from the perspective of genetic improvement of economic traits. *iScience*, 2023, 26(4): 106426 (doi: 10.1016/j.isci.2023.106426).
  39. Niu X., Tyasi T.L., Qin N., Liu D., Zhu H., Chen X., Zhang F., Yuan S., Xu R. Sequence variations in estrogen receptor 1 and 2 genes and their association with egg production traits in Chinese Daggu chickens. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79: 927-934 (doi: 10.1292/jvms.17-0014).
  40. Zhang Q., Zhu F., Liu L., Zheng C.W., De Wang H., Hou Z.C., Ning Z.H. Integrating transcriptome and genome re-sequencing data to identify key genes and mutations affecting chicken eggshell qualities. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0125890 (doi: 10.1371/journal.pone.0125890).
  41. Wang X.G., Shen M.M., Lu J., Dou T.C., Ma M., Guo J., Wang K.H., Qu L. Genome-wide association analysis of eggshell color of an F2 generation population reveals candidate genes in

- chickens. *Animal*, 2024, 18(6): 101167 (doi: 10.1016/j.animal.2024.101167).
42. Wang J., Liu Z., Cao D., Liu J., Li F., Han H., Han H., Lei Q., Liu W., Li D., Wang J., Zhou Y. Elucidation of the genetic determination of clutch traits in Chinese local chickens of the Laiwu Black breed. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 686 (doi: 10.1186/s12864-023-09798-0).
  43. Zhang T., Chen L., Han K., Zhang X., Zhang G., Dai G., Wang J., Xie K. Transcriptome analysis of ovary in relatively greater and lesser egg producing Jinghai Yellow Chicken. *Animal Reproduction Science*, 2019, 208: 106114 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.106114).
  44. Shah T.M., Patel N.V., Patel A.B., Upadhyay M.R., Mohapatra A., Singh K.M., Deshpande S.D., Joshi C.G. A genome-wide approach to screen for genetic variants in broilers (*Gallus gallus*) with divergent feed conversion ratio. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291: 1715-1725 (doi: 10.1007/s00438-016-1213-0).
  45. Tarekegn G.M., Strandberg E., Andonov S., Båge R., Ask-Gullstrand P., Rius-Vilarrasa E., Christensen J.M., Berglund B. Single-step genome-wide association study uncovers known and novel candidate genomic regions for endocrine and classical fertility traits in Swedish Red and Holstein dairy cows. *Livestock Science*, 2021, 253: 104731 (doi: 10.1016/j.livsci.2021.104731).
  46. Suwannasing R., Duangjinda M., Boonkum W., Taharnklaew R., Tuangsitthanon K. The identification of novel regions for reproduction trait in Landrace and Large White pigs using a single step genome-wide association study. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2018, 31(12): 1852-1862 (doi: 10.5713/ajas.18.0072).
  47. Wu Y., Pan A.L., Pi J.S., Pu Y.J., Du J.P., Liang Z.H., Shen J. SNP analysis reveals estrogen receptor 1 (*ESR1*) gene variants associated with laying traits in quails. *Archives Animal Breeding*, 2015, 58(2): 441-444 (doi: 10.5194/aab-58-441-2015).
  48. Ouyang Q., Xie H., Hu S., Lan C., Ran M., Hu J., He H., Li L., Liu H., Qu H., Wang J. Comparative genomics study between high and low laying goose breeds reveals the important role of *ESR1* in laying ability. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023 (doi: 10.1016/j.jia.2023.05.028).
  49. Lázaro S.F., Tonhati H., Oliveira H.R., Silva A.A., Nascimento A.V., Santos D.J.A., Stefani G., Brito L.F. Genomic studies of milk-related traits in water buffalo (*Bubalus bubalis*) based on single-step genomic best linear unbiased prediction and random regression models. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(5): 5768-5793 (doi: 10.3168/jds.2020-19534).
  50. Venturini G.C., Cardoso D.F., Baldi F., Freitas A.C., Aspilcuetaborquis R.R., Santos D.J., Carmargo G.M., Stafuzza N.B., Albuquerque L.G., Tonhati H. Association between single-nucleotide polymorphisms and milk production traits in buffalo. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13: 10256-10268 (doi: 10.4238/2014.December.4.20).