

Животноводство и кормопроизводство. 2024. Т. 107, № 4. С. 94-105.  
Animal Husbandry and Fodder Production. 2024. Vol. 107, no 4. P. 94-105.

Научная статья  
УДК 636.5:575.113  
doi:10.33284/2658-3135-107-4-94

**Полногеномные ассоциативные исследования показателей цвета мяса  
у кур f2 ресурсной популяции**

**Анастасия Николаевна Ветох<sup>1</sup>, Наталья Александровна Волкова<sup>2</sup>, Полина Валентиновна Ларионова<sup>3</sup>,  
Алан Юрьевич Джагаев<sup>4</sup>, Александра Сергеевна Абдельманова<sup>5</sup>, Наталия Анатольевна Зиновьева<sup>6</sup>**  
<sup>1,2,3,4,5,6</sup>Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика

Л.К. Эрнста, Московская область, п. Дубровицы, Россия

<sup>1</sup>anastezuya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2865-5960>,

<sup>2</sup>natavolkova@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7191-3550>,

<sup>3</sup>volpolina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5047-1888>,

<sup>4</sup>alan\_dz@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7818-0142>

<sup>5</sup>preevetic@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4752-0727>,

<sup>6</sup>n\_zinovieva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4017-6863>

**Аннотация.** Целью исследований являлся поиск SNP и идентификация генов-кандидатов, ассоциированных с цветовыми характеристиками мяса кур. Объектом исследований служили куры F2 ресурсной популяции, полученной посредством межпородного скрещивания двух пород, контрастных по показателям мясной продуктивности – русская белая и корниш. Полученная ресурсная популяция кур была фенотипирована в возрасте 42 дней по цвету мяса грудного отдела и бедренной части по цветовой шкале a\*, b\* и L\* с помощью спектрофотометра, а также генотипирована с использованием ДНК-чипа Illumina Chicken iSelect BeadChip 60k. В ходе проведённого GWAS было установлено 30 достоверно значимых SNP ( $P \leq 0,0001$ ), ассоциированных с цветом мяса у кур F2 ресурсной популяции, в том числе связанных с цветовыми характеристиками грудной мышцы – 12 SNP, с показателями цвета бедренной части – 18 SNP. В области данных SNP было идентифицировано 214 генов, в том числе 10 генов в позициях данных SNP-BRAF, ENO2, UBE3D, RGS6, ATP13A3, RHBDD1, MB21D2, BHLHE23, PIAS4, MLLT1, локализованных на хромосомах GGA1, GGA3, GGA5, GGA9, GGA20 и GGA28. Полученные результаты имеют практическое значение для понимания молекулярно-генетических механизмов формирования и проявления признаков, определяющих цветовые характеристики мяса кур, и могут быть исследованы в дальнейшем для использования в геномной селекции кур, направленной на улучшение качественных показателей мяса.

**Ключевые слова:** куры, цвет мяса, SNP, гены-кандидаты, полногеномные ассоциативные исследования

**Благодарности:** работа выполнена в соответствии с планом НИР на 2023-2025 гг. ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста (№ FGNN-2023-0002).

**Для цитирования:** Полногеномные ассоциативные исследования показателей цвета мяса у кур F2 ресурсной популяции / А.Н. Ветох, Н.А. Волкова, П.В. Ларионова, А.Ю. Джагаев, А.С. Абдельманова, Н.А. Зиновьева // Животноводство и кормопроизводство. 2024. Т. 107, № 4. С. 94-105. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-107-4-94>

Original article

### Genome-wide association studies of meat color indicators in the F2 chickens resource population

Anastasia N Vetokh<sup>1</sup>, Natalia A Volkova<sup>2</sup>, Polina V Larionova<sup>3</sup>, Alan Yu Dzhagaev<sup>4</sup>, Alexandra S Abdelmanova<sup>5</sup>, Natalia A Zinovieva<sup>6</sup>

<sup>1,2,3,4,5,6</sup> Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Moscow region, Dubrovitsy, Russia

<sup>1</sup>anastezuya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2865-5960>,

<sup>2</sup>natavolkova@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7191-3550>,

<sup>3</sup>volpolina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5047-1888>,

<sup>4</sup>alan\_dz@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7818-0142>

<sup>5</sup>preevetic@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4752-0727>,

<sup>6</sup>n\_zinovieva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4017-6863>

**Abstract.** The aim of the study was to search for SNPs and identify candidate genes associated with color characteristics of chicken meat. The object of the research was F2 chickens of the resource population obtained through interbreeding of two breeds with contrasting meat productivity indicators - Russian White and Cornish. The obtaining resource population of chickens was phenotyped at the age of 42 days for breast and thigh meat color according to the a\*, b\* and L\* color scale using a spectrophotometer, and genotyped using the Illumina Chicken iSelect BeadChip 60k DNA chip. The GWAS identified 30 significant SNPs ( $P \leq 0.0001$ ) associated with meat color in F2 chickens of the resource population, including 12 SNPs associated with breast muscle color traits and 18 SNPs associated with thigh color parameters. The 214 genes were identified in the SNPs region, including 10 genes at the positions of these SNPs - *BRAF*, *ENO2*, *UBE3D*, *RGS6*, *ATP13A3*, *RHBDD1*, *MB21D2*, *BHLHE23*, *PIAS4*, and *MLLT1*, localized on chromosomes GGA1, GGA3, GGA5, GGA9, GGA20 and GGA28. The results have practical significance for understanding the molecular genetic mechanisms in the formation and manifestation of traits that determine the color characteristics of chicken meat and can be used in subsequent studies in genomic selection of chickens to improve the quality of meat.

**Keywords:** chickens, meat color, SNP, candidate genes, genome-wide association studies

**Acknowledgments:** the work was performed in accordance to the plan of research works for 2023-2025 L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry (No. FGNN-2023-0002).

**For citation:** Vetokh AN, Volkova NA, Larionova PV, Dzhagaev AYu, Abdelmanova AS, Zinovieva NA. Genome-wide association studies of meat color indicators in young F2 chickens resource population. *Animal Husbandry and Fodder Production.* 2024;107(4):94-105. (In Russ). <https://doi.org/10.33284/2658-3135-107-4-94>

#### Введение.

Отрасль птицеводства за последние тридцать лет уверенно развивается, а производство и потреблении продукции, являющейся основным источником белка с высокой биологической ценностью и содержанием в них микроэлементов, таких как витамин А, тиамин, железо, фосфор и никотиновая кислота, особенно по сравнению с растительными белками, занимает лидирующие позиции в мясной индустрии (Тузиков Р.А. и др., 2023; Karunananayaka DS et al., 2016).

Качественные показатели мяса, такие как вид, цвет, влагоудерживающая способность и упругость, влияющие на производственные и потребительские характеристики готовой продукции, зависят как от внешних факторов – условий содержания и кормления, так и от индивидуальных – порода, возраст и пол животного (Дорохин Н.А., 2020; Kudryashova OA and Kudryashov LS, 2022).

Цвет мяса является индикатором практических физиологических, биохимических и технологических процессов и служит критерием при оценке качества продукта (Козырев И.В. и др., 2017). По нему судят о товарном виде мяса, степени работы определённых групп мышц, а так-

же о некоторых химических превращениях, которые могут происходить в мясе (Гречкина В.В. и Лебедев С.В., 2022). Радикальное изменение цвета свидетельствует о потере мясом свежести: бактериальное заражение поверхности обуславливает её обесцвечивание вплоть до приобретения сироватой окраски (Törek Á et al., 2023). Для оценки цвета и установления его характеристик применяют органолептические и инструментальные методы. Инструментальный метод основан на измерении координат спектра, а самой популярной системой считается  $L^*a^*b^*$ , где L характеризует светлоту по спектру от тёмного к светлому, a – спектр от зелёного до пурпурного; b – спектр от голубого до жёлтого (Ветох А.Н. и др., 2023). Цвет мяса в том числе может зависеть от pH, характеризующий продукт как PSE (бледный, мягкий, эксудативный) или DFD (тёмное, твёрдое, сухое мясо) (Mashhood Q et al., 2023). Птица – единственный вид животных, где мясо разделяют на тёмное и светлое, в зависимости от типа мускулатуры. Сыре мясо грудки кур имеет бледно-розовый цвет, а сырое мясо бёдер и ножек — тёмно-красное (Mir NA et al., 2017; Bowker B, 2017). При этом мясо птицы часто относят к категории PSE на основании высоких показателей цвета L\* и низкого уровня pH, что является проблемой для перерабатывающей промышленности (Che S et al., 2023). Формирование качественного мяса у цыплят-бройлеров определяется не только предубойными факторами, влияющими на кислотность, но и генетическими особенностями птицы (Alnahhas N et al., 2016; Волкова Н.А. и др., 2024). Это указывает на необходимость проведения генетического отбора для оценки степени изменчивости качественных показателей мяса кур. Одним из эффективных методов исследования наследственных факторов, влияющих на эти показатели, является использование локусов количественных признаков (QTL) (Allais S et al., 2019).

### Цель исследования.

Поиск SNP и идентификация генов-кандидатов, ассоциированных с цветовыми характеристиками мяса кур.

### Материалы и методы исследования.

#### Объект исследования.

Куры F2 модельной ресурсной популяции. Обслуживание животных и экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с инструкциями и рекомендациями российских нормативных актов, протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009). При проведении исследований были предприняты меры для обеспечения минимума страданий животных и уменьшения количества исследуемых опытных образцов.

**Схема эксперимента.** Исследование проводилось на базе ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста. Для получения F2 ресурсной популяции кур (n=112) использовали две породы, контрастные по показателям скорости роста и мясным качествам – русская белая (медленный рост, яичная порода) и корниш (быстрый рост, мясная порода). Содержание и кормление опытной птицы соответствовало возрастным нормам. Цыплята до 3-недельного возраста выращивались в брудерах с постепенным понижением температуры с +34 ° (в первые часы после выхода из яйца) до +23 °, затем переводились на напольное содержание. Во все периоды выращивания птица имела постоянный доступ к полнорационному промышленному комбикорму и свежей воде.

Куры F2 ресурсной популяции были фенотипированы по показателям, характеризующим цветовые характеристики мяса грудной и бедренной мышцы в возрасте 42 дней. Подготовку к убою и убой птицы проводили в соответствии с национальным стандартом Российской Федерации «Птица сельскохозяйственная для убоя. Технические условия» (ГОСТ Р 52837-2007). Голодная выдержка составляла не более 10 часов для сохранения показателей качества мяса в тушке. После убоя птицы проводили снятие оперения с предварительным ошпариванием тушек с последующей обвалкой для качественной оценки мяса.

**Оборудование и технические средства.** Исследования выполнены с использованием приборной базы лаборатории клеточной инженерии и отдела популяционной генетики и генетических основ разведения животных ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Цветовые характеристики грудки и филе бедра измеряли с помощью портативного спектрофотометра CM-700d («Konica Minolta», Япония) по системе  $L^*a^*b^*$  через 24 ч после убоя в пяти точках образца, определяя для каждого среднее значение по шкалам спектра.

Для выделения ДНК использовали пульпу пера. Экстракцию ДНК проводили с использованием набора Syntol для выделения ДНК из ткани животных (Syntol, Moscow, Россия). Концентрацию растворов ДНК определяли с использованием флуориметра Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, США). Для проверки чистоты извлеченной ДНК соотношение OD260/280 было протестировано с использованием инструмента NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific).

Полногеномное генотипирование кур было выполнено с использованием ДНК-чипа Illumina Chicken iSelect BeadChip 60k. Контроль качества и фильтрацию данных генотипирования для каждого образца и каждого SNP выполняли в программной среде R с использованием программного пакета PLINK 1.9. Для выявления ассоциаций SNP с показателями роста и развития грудных мышц у кур F2 ресурсной популяции применяли регрессионный анализ в PLINK 1.9. Данные визуализировали в пакете qqman (<https://github.com/qqman>) с помощью языка программирования R (Turner SD, 2018).

Поиск генов-кандидатов, локализованных в области идентифицированных SNP ( $\pm 0,2\text{Mb}$ ), проводили через средство просмотра геномных данных (Genome Data Viewer) в базе данных NCBI Gallus gallus (chicken) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/>).

**Статистическая обработка.** Статистические показатели рассчитывали с использованием пакета анализа данных в Microsoft Office 365 по следующим параметрам: значение средних, стандартная ошибка, минимум (min), максимум (max), коэффициент вариации (CV).

#### **Результаты исследования.**

Результаты оценки цветовых характеристик мяса кур F2 ресурсной популяции в возрасте 42 дней представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Характеристика кур F2 ресурсной популяции по цветовым характеристикам мяса  
(n=112, возраст 42 дня)**

**Table 1. Assessments of F2 chickens of the resource population by meat color characteristics  
(n=112, age 42 days)**

Признак / <i>Indicator</i>	Спектр / <i>Spectrum</i>	Среднее / <i>Average</i>	Ошибка / <i>Standard error</i>	Min	Max	Cv, %
Цвет грудной мышцы / <i>The breast muscle color</i>	a	1,93	0,15	-0,31	6,79	73,9
	b	10,06	0,21	5,73	16,81	19,4
	L	52,6	0,41	42,41	62,28	7,4
Цвет бедренной мышцы / <i>The thigh muscle color</i>	a	5,57	0,29	0,37	11,77	49,2
	b	11,19	0,31	5,64	16,35	26,1
	L	53,27	0,54	28,10	65,60	9,6

Исследованная модельная ресурсная популяция кур характеризовалась значительной вариабельностью значений по отдельным спектрам цвета грудной и бедренной мышц. Высокий коэффициент изменчивости отмечался по показателям спектров цвета мяса a\* и b\* – до 73,9 %. Значения по спектру цвета мяса L\* не превышали 9,6 %.

Полученные данные фенотипической оценки ресурсной популяции кур были использованы для полногеномного ассоциативного анализа. Были выявлены участки генома, связанные с цветовыми характеристиками грудных и бедренных мышц у исследованной популяции кур.

Проведённый GWAS-анализ на уровне установленного порога достоверности  $P \leq 0,0001$  выявил 12 значимых SNP, ассоциированных с цветом мяса грудного отдела и 18 SNP – с цветовыми характеристиками мяса бедренной части у кур исследованной F2 ресурсной популяции (табл. 2). Данные SNP были локализованы на 12 из 28 учтённых хромосом (рис. 1).

Таблица 2. Перечень достоверно значимых SNP ( $P \leq 0,0001$ ), ассоциированных с цветовыми характеристиками мяса у кур F2 ресурсной популяции  
 Table 2. List of significant SNPs ( $P \leq 0.0001$ ) associated with meat color characteristics from F2 chickens of the resource population

Признак / Indicator	Спектр / Spectrum	SNP	Хромосома / Chromosome	P
Цвет мяса грудного отдела / The breast muscle color	a*	GGaluGA280269	5	4,93E-05
		Gga_rs13756508	5	8,57E-05
	b*	Gga_rs10729083	1	2,89E-05
		Gga_rs13887556	1	4,58E-05
	L*	Gga_rs13834498	1	7,15E-06
		Gga_rs13834451	1	7,55E-05
	L*	GGaluGA086201	12	7,81E-05
		Gga_rs15321542	1	7,62E-05
		Gga_rs15279200	1	1,46E-05
		Gga_rs14141917	2	1,96E-05
		Gga_rs14142291	2	2,73E-05
		GGaluGA219476	3	3,15E-05
Цвет мяса бедренной части / The thigh muscle color	a*	Gga_rs16142729	2	8,94E-06
		Gga_rs15894255	8	2,51E-05
		Gga_rs16741792	14	4,77E-10
		Gga_rs14276515	20	4,96E-05
		Gga_rs15175708	20	5,29E-05
		GGaluGA179133	20	5,45E-05
		Gga_rs15249589	28	2,66E-08
		GGaluGA000771	28	3,32E-05
	b*	Gga_rs16636092	8	5,93E-05
		Gga_rs14673106	9	2,32E-05
		Gga_rs14663418	9	2,63E-05
		GGaluGA339603	9	3,97E-06
		Gga_rs10731045	19	3,29E-05
	L*	Gga_rs14381780	3	3,88E-05
		Gga_rs14381814	3	3,88E-05
		Gga_rs15519416	4	2,69E-06
		GGaluGA266380	4	4,84E-05
		GGaluGA201366	28	3,06E-05

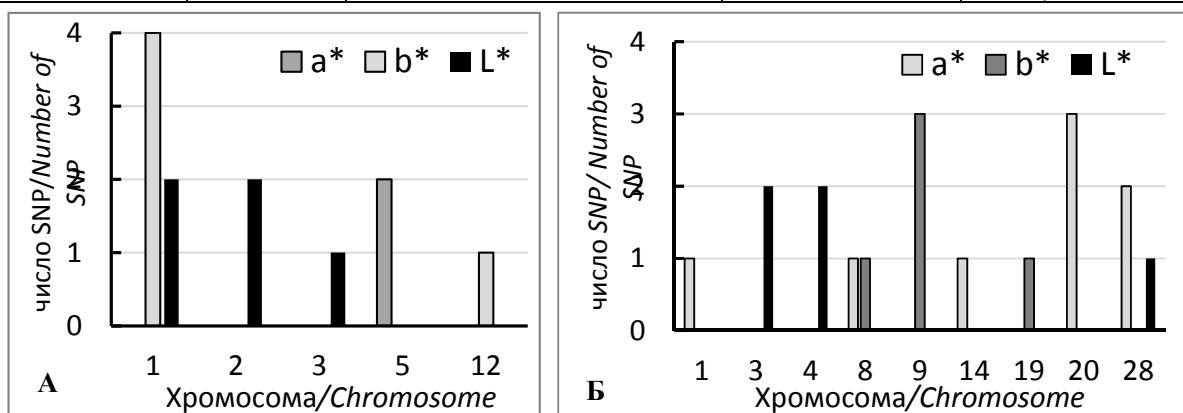


Рисунок 1. Распределение на хромосомах значимых SNP ( $P \leq 0,0001$ ), ассоциированных с цветовыми характеристиками грудной (А) и бедренной (Б) мышц у кур F2 ресурсной популяции

Figure 1. Distribution of significant SNPs ( $P \leq 0.0001$ ) on chromosomes associated with color characteristics of the breasts muscles (A) and thigh muscles (B) from F2 chickens of the resource population

Выявленные достоверно значимые SNP, связанные с цветовыми характеристиками мяса кур F2 ресурсной популяции, были использованы для аннотирования генов-кандидатов, ассоциированных с данными признаками (табл. 3). В области выявленных SNP было установлено 214 генов, в том числе в позициях данных SNP – 10 генов (*BRAF*, *ENO2*, *UBE3D*, *RGS6*, *ATP13A3*, *RHBDD1*, *MB21D2*, *BHLHE23*, *PIAS4*, *MLLT1*). Выявленные гены были локализованы на хромосомах GGA1, GGA3, GGA5, GGA9, GGA20 и GGA28.

Таблица 3. Перечень достоверно значимых генов-кандидатов ( $P \leq 0,0001$ ), ассоциированных с показателями цвета мяса у кур F2 ресурсной популяции

Table 3. List of significant candidate genes ( $P \leq 0.0001$ ) associated with meat color indicators in F2 chickens of the resource population

CHR	SNP	Позиция / Position	Ген ( $\pm 0,2\text{Mb}$ ) / Gene ( $\pm 0,2\text{Mb}$ )
			4
1	Gga_rs15321542	81524498	<i>TMEM39A</i> , <i>B4GALT4</i> , <i>B3GAT1L</i> , <i>gga-mir-3539</i> , <i>UPK1B</i> , <i>IGSF11</i>
1	Gga_rs15279200	56942229	<i>SLC37A3</i> , <i>RAB19</i> , <i>MKRN4P</i> , <i>DENND2A</i> , <i>ADCK2</i> , <i>NDUFB2</i> , <b><i>BRAF</i>*</b> , <i>MRPS33</i> , <i>TMEM178B</i> , <i>PIANP</i> , <i>COPS7A</i> , <i>MLF2</i> , <i>LAG3</i> , <i>CD4</i> , <i>GPR162</i> , <i>P3H3</i> , <i>GNB3</i> , <i>CDCA3</i> , <i>USP5</i> , <i>TPII</i> , <i>LRRC23</i> , <b><i>ENO2</i>*</b> , <i>CIH12ORF57</i> , <i>PTPN6</i> , <i>PHB2</i> , <i>EMG1</i> , <i>LPCAT3</i> , <i>C1S</i> , <i>C1R</i> , <i>RBP5</i> , <i>CLSTN3</i> , <i>PEX5</i> , <i>PHB2</i> , <i>EMG1</i> , <i>LPCAT3</i> , <i>C1S</i> , <i>C1R</i> , <i>RBP5</i> , <i>CLSTN3</i> , <i>PEX5</i> , <i>EPHA1</i> , <i>ZYX</i> , <i>FAM131B</i> , <i>CLCN1</i> , <i>CASP2</i> , <i>RAP1GAP1</i>
1	Gga_rs10729083	77961991	-
1	Gga_rs13887556	78214849	<i>MRPS35</i> , <i>MANSC4</i> , <i>KLHL42</i>
1	Gga_rs13834498	72389106	<i>LY6E</i> , <i>TOP1MT</i> , <i>RHPN1</i> , <i>MAFA</i> , <i>ZC3H3</i>
2	Gga_rs16142729	148496819	<i>ZNF438</i> , <i>SVIL</i> , <i>LY6E</i>
2	Gga_rs14141917	14639769	<i>LY6E</i> , <i>TOP1MT</i> , <i>RHPN1</i> , <i>MAFA</i> , <i>ZC3H3</i> , <i>JCAD</i> , <i>MTPAP</i> , <i>MAP3K8</i>
3	GGaluGA219476	43926780	-
3	Gga_rs14381780	78062830	<i>RWDD2A</i> , <i>PGM3</i> , <i>DOP1A</i> , <b><i>UBE3D</i>*</b> , <i>TPBG</i> , <i>IBTK</i>
3	Gga_rs14381814	78078352	<i>RWDD2A</i> , <i>PGM3</i> , <i>DOP1A</i> , <i>UBE3D</i> , <i>TPBG</i> , <i>IBTK</i>
4	Gga_rs15519416	26013340	-
4	GGaluGA266380	76899770	<i>C1QTNF7</i> , <i>CPEB2</i>
5	GGaluGA280269	25928651	<i>PLA2G4F</i> , <i>VPS39</i> , <i>TMEM87A</i> , <i>GANC</i> , <i>CAPN3</i> , <i>ZNF106</i> , <i>SNAP23</i> , <i>LRRC57</i> , <i>HAUS2</i>
5	Gga_rs13756508	27013919	<b><i>RGS6</i>*</b> , <i>SIPA1L1</i>
8	Gga_rs15894255	1624673	<i>SLC25A24</i> , <i>HENMT1</i> , <i>STXBP3</i> , <i>GPSM2</i> , <i>CLCC1</i> , <i>WDR47</i> , <i>CAMSAP2</i>
8	Gga_rs16636092	19372206	<i>GIPC2</i> , <i>DNAJB4</i> , <i>FUBP1</i> , <i>NEXN</i> , <i>MIGA1</i> , <i>USP33</i> , <i>ZZZ3</i> , <i>AK5</i> , <i>PIGK</i>
9	Gga_rs14673106	13020745	<i>APOD</i> , <i>PPP1R2</i> , <i>ACAP2</i> , <i>XXYL1</i> , <i>FAM43A</i> , <i>LSG1</i> , <b><i>ATP13A3</i>*</b> , <i>GP5</i> , <i>LRRC15</i> , <i>CPN2</i> , <i>HES1</i> , <i>OPA1</i>
9	Gga_rs14663418	9447587	<i>IRS1</i> , <b><i>RHBDD1</i>*</b> , <i>MFF</i> , <i>MRPL44</i> , <i>AGFG1</i>

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
9	GGaluGA339603	13432903	<i>ATP13A4, MB21D2*, FGF12</i>
12	GGaluGA086201	12399550	<i>PDHB, KCTD6, ACOX2, FAM107A, FAM3D, CFAP20DC, FHIT</i>
14	Gga_rs16741792	11533591	-
19	Gga_rs10731045	6203277	<i>ERAL1, gga-mir-451, gga-mir-144, FLOT2, PHF12, SEZ6, PIPOX, MYO18A, CRYBA1, NUFIP2, TAOK1, GIT1, ANKRD13B, CORO6, SSH2, EFCAB5, NSRP1, SLC6A4, BLMH, TMIGD1, CPD</i>
20	Gga_rs14276515	8463752	<i>MRGBP, OGFR, COL9A3, TCFL5, DIDO1, gga-mir-6681, GID8, SLC17A9, gga-mir-6567, BHLHE23, gga-mir-1746</i>
20	Gga_rs15175708	8433471	<i>MRGBP, OGFR, COL9A3, TCFL5, DIDO1, gga-mir-6681, GID8, SLC17A9, gga-mir-6567, BHLHE23</i>
20	GGaluGA179133	8487502	<i>MRGBP, OGFR, COL9A3, TCFL5, DIDO1, gga-mir-6681, GID8, SLC17A9, gga-mir-6567, BHLHE23*, gga-mir-1746</i>
28	Gga_rs15249589	1540725	<i>GNA11, SIPR4, NCLN, CELF5, HSD11B1L, MICOS13, gga-mir-1774, FSD1, YJU2, gga-mir-6593, ZBTB7A, PIAS4*, EEF2, gga-mir-1434, NMRK2, ATCAY, NRTN, DUS3L, LARP6L, RFX2</i>
28	GGaluGA000771	3530918	<i>ADAMTS5, THOP1, SGTA, SLC39A3, DIRAS1, GADD45B, MAP1S, FCHO1, B3GNT3, JAK3, SLC5A5, KCNN1, OCLN, NR2F6, ANKLE1, ABHD8, MRPL34, DDA1, ANO8, GTPBP3, CILP2, NDUFA13, GATAD2A, MAU2, SUGP1, TM6SF2, HAPLN4, NCAN, NR2C2AP, RFXANK, BORCS8, gga-mir-1621, gga-mir-9-1</i>
28	GGaluGA201366	1779855	<i>ATCAY, NRTN, DUS3L, LARP6L, RFX2, ACSBG2, MLLT1*, ACER1, ANP32B, ZNF414, MYO1F, ADAMTS10, gga-mir-6615, ZAP70</i>

Примечание: CHR – номер хромосомы; ±0,2Mb – гены, локализованные на расстоянии 200 000 пар оснований (п.о.) от позиции выявленных SNP; \* – гены, локализованные в позиции выявленных SNP

Note: CHR – chromosome number; ±0.2Mb – genes localized at a distance of 200,000 base pairs (bp) from the position of the identified SNPs; \* – genes that are localized in the positions of the identified SNPs

### Обсуждение полученных результатов.

Идентификация и картирование генов, детерминирующих проявление селекционно-значимых признаков у сельскохозяйственных птицы, является одной из ключевых задач геномной селекции, направленной на повышение эффективности птицеводства. В нашем исследовании изучены показатели цветовых характеристик мяса грудки и бедренной части у кур F2 ресурсной популяции. С учётом того, что в промышленном птицеводстве выращивание бройлеров на мясо проводят до возраста 42-63 дней, оценку показателей цвета мяса у кур исследуемой ресурсной популяции осуществляли в возрасте 42 дней.

Цвет мяса – важный показатель, определяющий товарные качества и потребительский спрос на мясо птицы. Данный показатель в определённой мере зависит от условий кормления и содержания птицы и является генетически детерминированным множеством QTL. Проведённые полногеномные ассоциативные исследования выявили достоверно значимые SNP и гены-кандидаты ( $P \leq 0,0001$ ), ассоциированные с показателями цвета мяса у кур F2 ресурсной популяции,

в частности, с цветовыми характеристиками грудной мышцы – 12 SNP и 3 гена-кандидата (*BRAF*, *ENO2*, *RGS6*), с цветом мяса бедренной части – 18 SNP и 7 генов-кандидатов (*UBE3D*, *ATP13A3*, *RHBDD1*, *MB21D2*, *BHLHE23*, *PIAS4*, *MLLT1*).

Идентифицированные гены-кандидаты отвечают за биологический функционал организма, среди которых есть гомеостаз жирных кислот, биохимических процессов, врождённый иммунный ответ, развитие многоклеточных организмов и их органов, включая развитие ЦНС. Как известно, влияние на ЦНС, а именно – стресс сильно влияет на органолептические показатели мяса, поэтому развитие нервной системы играет немаловажную роль в формирование цветовых спектров мяса.

Поиск и анализ информационных источников показал, что из 10 выявленных в нашем исследовании генов-кандидатов для 1 гена – *ENO2* – была установлена его связь с цветом грудной мышцы (спектр L\*) у бычков породы нелор (Marín-Garzón NA et al., 2021). Для трёх установленных в нашем исследовании генов – *MB21D2*, *PIAS4* и *MLLT1* – была представлена их связь с показателями роста сельскохозяйственных животных и птицы. В частности, выявлены ассоциации гена *MB21D2* со среднесуточным приростом (Niu Q et al., 2021) и массой внутренних органов (An B et al., 2018) у крупного рогатого скота, гена *PIAS4* – с метаболизмом кур (Tian J et al., 2023), генов *PIAS4* и *MLLT1* – с живой массой кур в возрасте 42 и 63 дней (Volkova NA et al., 2024). Были установлены ассоциации гена *MB21D2* с иммунным ответом при вакцинации у кур (Walugembe M et al., 2019).

Таким образом, анализ открытых информационных источников подтвердил полученные нами данные о влиянии на цветовые характеристики мяса гена *ENO2*. Для других выявленных в нашей работе генов в ряде исследований показана их связь с селекционно-значимыми признаками у сельскохозяйственных животных и птицы. Для подтверждения влияния данных генов-кандидатов на цветовые характеристики мяса кур требуется проведение дальнейших исследований.

### **Заключение.**

Выявлены достоверно значимые SNP ( $P \leq 0,0001$ ), ассоциированные с цветом мяса у кур F2 ресурсной популяции в возрасте 42 недель. Установлено 12 значимых SNP, связанных с цветовыми характеристиками грудной мышцы и 18 SNP, ассоциированные с показателями цвета бедренной части. В области данных SNP идентифицировано 214 генов-кандидатов, в том числе 10 генов в позициях данных SNP - *BRAF*, *ENO2*, *UBE3D*, *RGS6*, *ATP13A3*, *RHBDD1*, *MB21D2*, *BHLHE23*, *PIAS4*, *MLLT1*, локализованные на хромосомах GGA1, GGA3, GGA5, GGA9, GGA20 и GGA28.

Полученные результаты имеют практическое значение для понимания молекулярно-генетических механизмов формирования и проявления признаков, определяющих цветовые характеристики мяса кур и могут быть использованы для дальнейшего изучения генетических маркеров, связанных с качественными характеристиками мяса кур, что позволит повысить и улучшить показатели качества мяса.

### **Список источников**

1. ГОСТ Р 52837-2007. Птица сельскохозяйственная для убоя. Технические условия. Введ. 01.01.2009. М.: Стандартинформ, 2008. 5 с. [GOST R 52837-2007. Ptica sel'skohozyajstvennaya dlya uboya. Tekhnicheskie usloviya. Vved. 01.01.2009. Moscow: Standartinform; 2008:5 p. (In Russ.)].
2. Гречкина В.В., Лебедев С.В. Влияние Цамакса и Ветома на биохимические показатели крови и содержание минеральных веществ в организме цыплят-бройлеров // Животноводство и кормопроизводство. 2022. Т. 105. № 2. С. 118-129. [Grechkina VV, Lebedev SV. The effect of Tsamax and Vetom on the biochemical parameters of blood and the mineral content in the body of broiler chickens. Animal Husbandry and Fodder Production. 2022;105(2):118-129. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-105-2-118>
3. Дорохин Н.А. Качественные характеристики мяса цыплят-бройлеров и факторы, влияющие на них: обзор // Сельскохозяйственный журнал. 2020. № 5(13). С. 59-64. [Dorokhin NA. Quality

characteristics of broiler chicken meat and their influencing factors: an overview. Agricultural Journal. 2020;5(13):59-64. (*In Russ.*).

4. Влияние биоминерального комплекса на рост, продуктивные качества цыплят-бройлеров / Р.А. Тузиков, С.В. Лебедев, М.С. Аринжанова, Е.В. Шейда // Животноводство и кормопроизводство. 2023. Т. 106. № 3. С. 138-147. [Tuzikov RA, Lebedev SV, Arinzhanova MS, Sheida EV. The influence of biominerals complex on the growth, productive traits in broiler chickens. Animal Husbandry and Fodder Production. 2023;106(3):138-147. (*In Russ.*)]. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-106-3-138>

5. Полногеномные ассоциативные исследования качества мяса по показателям цвета грудки у кур (*Gallus gallus* L.) / А.Н. Ветох, А.Ю. Джагаев, А.А. Белоус, Н.А. Волкова, Н.А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология. 2023. Т. 58. № 6. С. 1068-1078. [Vetokh AN, Dzhagaev AYu, Belous AA, Volkova NA, Zinovieva NA. Genome-wide association studies of chicken (*Gallus gallus* L.) breast meat color characteristics. Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]. 2023;58(6):1068-1078. (*In Russ.*)]. doi: 10.15389/agrobiology.2023.6.1068rus doi: 10.15389/agrobiology.2023.6.1068eng

6. Полногеномные ассоциативные исследования цветовых характеристик мяса кур / Н.А. Волкова, А.Н. Ветох, А.А. Белоус, Н.А. Зиновьева // Ветеринария и кормление. 2024. № 5. С. 22-26. [Volkova NA, Vetokh AN, Belous AA, Zinovieva NA. Genome-wide association studies of color characteristics of chicken meat. Veterinaria i kormlenie. 2024;5:22-26. (*In Russ.*)]. doi: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2024-5-5

7. Технологические свойства охлаждённой говядины различных цветовых классов / И.В. Козырев, Т.М. Миттельштайн, В.А. Пчелкина, А.Б. Лисицын // Теория и практика переработки мяса. 2017. Т. 2. № 2. С. 60-68. [Kozyrev IV, Mittelstein TM, Pchelkina VA, Lisitsyn AB. Technological properties of chilled beef of various color classes. Theory and practice of meat processing. 2017;2(2):60-68. (*In Russ.*)]. doi: 10.21323/2414-438X-2017-2-2-60-68

8. Allais S, Hennequet-Antier C, Berri C, Salles L, Demeure O, Le Bihan-Duval E. Mapping of QTL for chicken body weight, carcass composition, and meat quality traits in a slow-growing line. *Poultry Science*. 2019;98(5):1960-1967. doi: 10.3382/ps/pey549

9. Alnahhas N, Berr C, Chabault M, et al. Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. *BMC Genet*. 2016;17:61. doi: 10.1186/s12863-016-0369-2

10. An B, Xia J, Chang T, Wang X, Miao J, Xu L, Zhang L, Gao X, Chen Y, Li J, et al. Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for internal organ weights in Simmental beef cattle. *Physiological Genomics*. 2018;50(7):523-531. doi: 10.1152/physiolgenomics.00022.2018

11. Bowker B. Chapter 4 - Developments in our understanding of water-holding capacity. In: Petracci M, Berri C, editors. *Poultry Quality Evaluation*. Woodhead Publishing; 2017:77-113. doi: 10.1016/B978-0-08-100763-1.00004-0

12. Che S, Susta L, Barbut S. Effects of broiler chilling methods on the occurrence of pale, soft, exudative (PSE) meat and comparison of detection methods for PSE meat using traditional and Nix colorimeters. *Poultry Science*. 2023;102(10):102907. doi: 10.1016/j.psj.2023.102907

13. Karunananayaka DS, Jayasena DD, Jo C. Prevalence of pale, soft, and exudative (PSE) condition in chicken meat used for commercial meat processing and its effect on roasted chicken breast. *Journal of Animal Science Technology*. 2016;58:27. doi: 10.1186/s40781-016-0110-8

14. Kudryashova OA, Kudryashov LS. Influence of preslaughter stress on poultry meat. *Theory and Practice of Meat Processing*. 2022;7(1):30-34. doi: 10.21323/2414-438X-2022-7-1-30-34

15. Marín-Garzón NA, Magalhães AFB, Mota LFM, Fonseca LFS, Chardulo LAL, Albuquerque LG. Genome-wide association study identified genomic regions and putative candidate genes affecting meat color traits in Nellore cattle. *Meat Science*. 2021;171:108288. doi: 10.1016/j.meatsci.2020.108288

16. Mashhood Q, Karlsson A H, Wallenbeck A, Eriksson S, Johansson AM, Segervist KA. A review on pale, soft, and exudative (PSE)-like zones in pork: current knowledge on underlying factors and identification of knowledge gaps for further research. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*. 2023:1-10. doi: 10.1080/09064702.2023.2279079

17. Mir NA, Rafiq A, Kumar F, et al. Determinants of broiler chicken meat quality and factors affecting them: a review. *Journal of Food Science Technology*. 2017;54:2997-3009. doi: 10.1007/s13197-017-2789-z
18. Niu Q, Zhang T, Xu L, Wang T, Wang Z, Zhu B, Zhang L, Gao H, Song J, Li J, Xu L. Integration of selection signatures and multi-trait GWAS reveals polygenic genetic architecture of carcass traits in beef cattle. *Genomics*. 2021; 113(5):3325-3336. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.07.025
19. Tian J, Zhu X, Wu H, Wang Y, Hu X. Serum metabolic profile and metabolome genome-wide association study in chicken. *Journal of Animal Science Biotechnology*. 2023;14(1):69. doi: 10.1186/s40104-023-00868-7
20. Török Á, Yeh CH, Menozzi D, et al. Consumers' preferences for processed meat: a best-worst scaling approach in three European countries. *Agricultural and Food Economics* 2023;11:33 doi: 10.1186/s40100-023-00277-4
21. Turner SD. QQman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and Manhattan plots. *The Journal of Open Source Software*. 2018;3(25):731. doi: 10.21105/joss.00731
22. Volkova NA, Romanov MN, Vetokh AN, Larionova PV, Volkova LA, Abdelmanova AS, Sermyagin AA, Griffin DK, Zinovieva NA. Genome-wide association study reveals the genetic architecture of growth and meat production traits in a chicken F<sub>2</sub> resource population. *Genes*. 2024;15(10):1246. doi: 10.3390/genes15101246
23. Walugembe M, Mushi JR, Amuzu-Aweh EN, Chiwanga GH, Msoffe PL, Wang Y, Saelao P, Kelly T, Gallardo RA, Zhou H, Lamont SJ, Muhairwa AP, Dekkers JCM. Genetic analyses of tanzanian local chicken ecotypes challenged with newcastle disease virus. *Genes (Basel)*. 2019;10(7):546. doi: 10.3390/genes10070546

## References

1. State Standard R 52837-2007. Slaughter poultry. Specifications approved. Implementation date 01.01.2009. Moscow: Standartinform; 2008:5 p.
2. Grechkina VV, Lebedev SV. The effect of Tsamax and Vetom on the biochemical parameters of blood and the mineral content in the body of broiler chickens. *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2022;105(2):118-129. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-105-2-118>
3. Dorokhin NA. Quality characteristics of broiler chicken meat and their influencing factors: an overview. *Agricultural Journal*. 2020;5(13):59-64.
4. Tuzikov RA, Lebedev SV, Arinzhanova MS, Sheida EV. The influence of biominerals complex on the growth, productive traits in broiler chickens. *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2023;106(3):138-147. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-106-3-138>
5. Vetokh AN, Dzhagaev AYu, Belous AA, Volkova NA, Zinovieva NA. Genome-wide association studies of chicken (*Gallus gallus* L.) breast meat color characteristics. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*. 2023;58(6):1068-1078. doi: 10.15389/agrobiology.2023.6.1068eng
6. Volkova NA, Vetokh AN, Belous AA, Zinovieva NA. Genome-wide association studies of color characteristics of chicken meat. *Veterinary Medicine and Feeding*. 2024;5:22-26. doi: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2024-5-5
7. Kozyrev IV, Mittelstein TM, Pchelkina VA, Lisitsyn AB. Technological properties of chilled beef of various color classes. *Theory and Practice of Meat Processing*. 2017;2(2):60-68. doi: 10.21323/2414-438X-2017-2-2-60-68
8. Allais S, Hennequet-Antier C, Berri C, Salles L, Demeure O, Le Bihan-Duval E. Mapping of QTL for chicken body weight, carcass composition, and meat quality traits in a slow-growing line. *Poultry Science*. 2019;98(5):1960-1967. doi: 10.3382/ps/pey549
9. Alnahhas N, Berr C, Chabault M, et al. Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. *BMC Genet*. 2016;17:61. doi: 10.1186/s12863-016-0369-2

10. An B, Xia J, Chang T, Wang X, Miao J, Xu L, Zhang L, Gao X, Chen Y, Li J, et al. Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for internal organ weights in Simmental beef cattle. *Physiological Genomics*. 2018;50(7):523-531. doi: 10.1152/physiolgenomics.00022.2018
11. Bowker B. Chapter 4 - Developments in our understanding of water-holding capacity. In: Petracci M, Berri C, editors. *Poultry Quality Evaluation*. Woodhead Publishing; 2017:77-113. doi: 10.1016/B978-0-08-100763-1.00004-0
12. Che S, Susta L, Barbut S. Effects of broiler chilling methods on the occurrence of pale, soft, exudative (PSE) meat and comparison of detection methods for PSE meat using traditional and Nix colorimeters. *Poultry Science*. 2023;102(10):102907. doi: 10.1016/j.psj.2023.102907
13. Karunananayaka DS, Jayasena DD, Jo C. Prevalence of pale, soft, and exudative (PSE) condition in chicken meat used for commercial meat processing and its effect on roasted chicken breast. *Journal of Animal Science Technology*. 2016;58:27. doi: 10.1186/s40781-016-0110-8
14. Kudryashova OA, Kudryashov LS. Influence of preslaughter stress on poultry meat. *Theory and Practice of Meat Processing*. 2022;7(1):30-34. doi: 10.21323/2414-438X-2022-7-1-30-34
15. Marín-Garzón NA, Magalhães AFB, Mota LFM, Fonseca LFS, Chardulo LAL, Albuquerque LG. Genome-wide association study identified genomic regions and putative candidate genes affecting meat color traits in Nellore cattle. *Meat Science*. 2021;171:108288. doi: 10.1016/j.meatsci.2020.108288
16. Mashhood Q, Karlsson A H, Wallenbeck A, Eriksson S, Johansson AM, Segerkvist KA. A review on pale, soft, and exudative (PSE)-like zones in pork: current knowledge on underlying factors and identification of knowledge gaps for further research. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*. 2023:1-10. doi: 10.1080/09064702.2023.2279079
17. Mir NA, Rafiq A, Kumar F, et al. Determinants of broiler chicken meat quality and factors affecting them: a review. *Journal of Food Science Technology*. 2017;54:2997-3009. doi: 10.1007/s13197-017-2789-z
18. Niu Q, Zhang T, Xu L, Wang T, Wang Z, Zhu B, Zhang L, Gao H, Song J, Li J, Xu L. Integration of selection signatures and multi-trait GWAS reveals polygenic genetic architecture of carcass traits in beef cattle. *Genomics*. 2021; 113(5):3325-3336. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.07.025
19. Tian J, Zhu X, Wu H, Wang Y, Hu X. Serum metabolic profile and metabolome genome-wide association study in chicken. *Journal of Animal Science Biotechnology*. 2023;14(1):69. doi: 10.1086/s40104-023-00868-7
20. Török Á, Yeh CH, Menozzi D, et al. Consumers' preferences for processed meat: a best-worst scaling approach in three European countries. *Agricultural and Food Economics* 2023;11:33 doi: 10.1186/s40100-023-00277-4
21. Turner SD. QQman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and Manhattan plots. *The Journal of Open Source Software*. 2018;3(25):731. doi: 10.21105/joss.00731
22. Volkova NA, Romanov MN, Vetokh AN, Larionova PV, Volkova LA, Abdelmanova AS, Sermyagin AA, Griffin DK, Zinovieva NA. Genome-wide association study reveals the genetic architecture of growth and meat production traits in a chicken F<sub>2</sub> resource population. *Genes*. 2024;15(10):1246. doi: 10.3390/genes15101246
23. Walugembe M, Mushi JR, Amuzu-Aweh EN, Chiwanga GH, Msoffe PL, Wang Y, Saelao P, Kelly T, Gallardo RA, Zhou H, Lamont SJ, Muhairwa AP, Dekkers JCM. Genetic analyses of tanzanian local chicken ecotypes challenged with newcastle disease virus. *Genes (Basel)*. 2019;10(7):546. doi: 10.3390/genes10070546

**Информация об авторах:**

**Анастасия Николаевна Ветох**, научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 142132, г.о. Подольск, п. Дубровицы д. 60, тел.: +7 (4967) 65-11-63.

**Наталья Александровна Волкова**, доктор биологических наук, профессор РАН, руководитель лаборатории клеточной инженерии, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 142132, г.о. Подольск, п. Дубровицы д. 60, тел.: +7 (4967) 65-11-63.

**Полина Валентиновна Ларионова**, кандидат биологических наук, главный специалист лаборатории клеточной инженерии, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 142132, г.о. Подольск, п. Дубровицы, д. 60, тел.: +7 (4967) 65-11-63.

**Алан Юрьевич Джагаев**, младший научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 142132, г.о. Подольск, п. Дубровицы, д. 60, тел.: +7 (4967) 65-11-63.

**Александра Сергеевна Абдельманова**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной и эволюционной геномики животных, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 142132, г.о. Подольск, п. Дубровицы, д. 60, тел.: +7 (4967) 65-11-63.

**Наталья Анатольевна Зиновьева**, доктор биологических наук, академик РАН, директор, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 142132, г.о. Подольск, п. Дубровицы, д. 60, тел.: +7 (4967) 65-11-63.

**Information about the authors:**

**Anastasia N Vetokh**, Researcher Of The Cell Engineering Laboratory, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Podolsk, Dubrovitsy, 60, 142132, tel.: +7 (4967) 65-11-63.

**Natalia A Volkova**, Dr. Sci (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the cell engineering laboratory, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Podolsk, Dubrovitsy, 60, 142132, tel.: +7 (4967) 65-11-63.

**Polina V Lariionova**, Cand. Sci (Biology), Main Expert Of The Cell Engineering Laboratory, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Podolsk, Dubrovitsy, 60, 142132, tel.: +7 (4967) 65-11-63.

**Alan Yu Dzhagaev**, Junior Researcher Of The Cell Engineering Laboratory, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Podolsk, Dubrovitsy, 60, 142132, tel.: +7 (4967) 65-11-63.

**Alexandra S Abdelmanova**, Dr. Sci (Biology), senior researcher in the laboratory of functional and evolutionary genomics of animals, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Podolsk, Dubrovitsy, 60, 142132, tel.: +7 (4967) 65-11-63.

**Natalia A Zinovieva**, Dr. Sci (Biology), Academician of Russian Academy of Sciences, Director, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Podolsk, Dubrovitsy, 60, 142132, tel.: +7 (4967) 65-11-63.

Статья поступила в редакцию 01.10.2024; одобрена после рецензирования 26.11.2024; принятая к публикации 16.12.2024.

The article was submitted 01.10.2024; approved after reviewing 26.11.2024; accepted for publication 16.12.2024.