

18. Гришкова, А. П. Химический состав и физико-химические свойства мяса и сала свиней чистогорской породы / А. П. Гришкова, Н. А. Чалова, А. А. Аришин // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. – № 12. – С. 59-61.
19. Чалова, Н. А. Откормочная и мясная продуктивность гибридного молодняка / Н. А. Чалова, А. П. Гришкова // Тенденции сельскохозяйственного производства в современной России: Материалы XII Международной научно-практической конференции, Кемерово, 12-15 ноября 2013 года. – Кемерово: Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт, 2013. – С. 71-74.
20. Влияние пробиотической кормовой добавки «PRIMALAK» на молочную продуктивность дойных коров / А. М. Тарас [и др.] // Современные тенденции сельскохозяйственного производства в мировой экономике: Материалы XXI Международной научно-практической конференции, Кемерово, 6-7 декабря 2022года. – Кемерово: Кузбасская государственная сельскохозяйственная академия, 2022. – С. 455-461.
221. Влияние кормового пробиотика на яичную продуктивность кур-несушек кросса «Делкалб белый» / А. М. Тарас [и др.] // Птицеводство. – 2022. – № 4. – С. 31-36.

УДК 636.234.1:612.6

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *ARAF1* И *SMC2*, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГАПЛОТИПАМИ ФЕРТИЛЬНОСТИ НН1 И НН3, У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

Е. И. Юрченко, О. В. Вертинская

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,
г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: elurch1986@mail.ru)

Ключевые слова: крупный рогатый скот, фертильность, полиморфизм гена *SMC2*, *ARAF1*, гаплотип, наследственные аномалии.

Аннотация. В статье приведены результаты исследования полиморфизма по генам *ARAF1* и *SMC2*, ассоциированных с гаплотипами НН1 и НН3, у крупного рогатого скота голштинской породы. С помощью ПЦР-анализа было установлено, что на долю носителей мутантного аллеля по гену *ARAF1* приходится 1,6 % голов от общего количества протестированных животных, по гену *SMC2* – 1,5 %. Носители летального генотипа ХХ и СС в исследуемой популяции не идентифицированы, т. к. погибают на ранних стадиях эмбриогенеза.

POLYMORPHISM OF THE APAF1 AND SMC2 GENES ASSOCIATED WITH HH1 AND HH3 FERTILITY HAPLOTYPES IN HOLSTANIAN CATTLE

E. I. Yurchenko, O. V. Vertinskaya

EI «Grodno state agrarian university»

Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 230008, Grodno,
28 Tereshkova st.; e-mail: elurch1986@mail.ru)

Key words: *cattle, fertility, SMC2 gene polymorphism, APAF1, haplotype, hereditary anomalies.*

Summary. *the article presents the results of a study of polymorphism in the APAF1 and SMC2 genes associated with the HH1 and HH3 haplotypes in Holstein cattle. Using PCR analysis, it was found that the share of carriers of the mutant allele for the APAF1 gene accounts for 1,6 % of the total number of animals tested, for the SMC2 gene – 1,5 %. Carriers of the lethal XX and CC genotypes in the study population were not identified, as they die at the early stages of embryogenesis.*

(Поступила в редакцию 05.06.2023 г.)

Введение. Популяция племенного поголовья крупного рогатого скота подвержена распространению рецессивных болезней. Отдельные производители производят десятки тысяч потомков путем искусственного осеменения. Частота вредных аллелей, переносимых такими производителями, может значительно увеличиться в течение нескольких поколений [9].

Плодовитость является одним из важнейших признаков, определяющих устойчивое развитие животноводства. Для поддержания рентабельности молочной отрасли имеет большое значение количество и качество произведенного молока, которое, в свою очередь, зависит от успешной стельности и отела. При снижении репродуктивной способности возникают финансовые потери из-за снижения производства молока, отсутствует возможность замены животных для поддержания размера стада. Важность плодовитости и связанных с ней показателей лактации для молочной промышленности сделала репродуктивную функцию необходимой целью программ разведения молочного скота [1].

Снижение фертильности крупного рогатого скота вследствие инбридинга становится серьезной проблемой в молочном животноводстве. Размножение – сложный процесс, зависящий от многих факторов, таких как состояние здоровья, условий окружающей среды, кормления, а также от фертильности обеих особей. Наследуемость репродуктивных функций у коров низкая (от 0,02 до 0,04) и лишь немногим выше у быков-производителей (от 0,05 до 0,22) [6]. Инбридинг как увеличивает частоту рецессивных летальных и сублетальных аллелей в популяции, так

и параллельно приводит к очищению от вредных аллелей путем естественного отбора. Летальные мутации являются наиболее вредными с экономической точки зрения. Ни одно потомство, несущее такие мутации, не выживет и не сможет размножиться [4].

На современном этапе развития отрасли животноводства внедрение и применение новых методов биотехнологии, использование маркерной селекции дает возможность выявить генетические дефекты уже после рождения животного, тем самым снизить риск их распространения в популяции [7].

Гаплотипы фертильности HH1 и HH3 являются следствием точечных мутаций в генах APAF1 и SMC2, которые приводят к эмбриональной смертности крупного рогатого скота на разных сроках стельности [8].

Нонсенс-мутация в гене APAF1 (фактора активации апоптотической протеазы 1; APAF1 p.Q579X) ассоциирована с гаплотипом фертильности голштинского скота HH1 (OMIA:ID000001-9913) и обуславливает эмбриональную смертность на разных сроках стельности. Мутация картирована на 5-й хромосоме в области 58-66 Mb в позиции 63150400 с заменой C→T в XI экзонной части гена APAF1 и приводит к усечению одной трети кодируемого геном белка APAF1 [5]. Сильно укороченный пептид APAF1 у гомозиготных носителей мутации приводит к апоптотической гибели клеток и генетическим аномалиям, что подтверждено проведенными опытами по экспрессии гена APAF1 у мышей [2]. Гаплотип фертильности HH1 является причинной мутацией эмбриональной, внутриутробной и перинатальной гибели крупного рогатого скота [3, 5]. По результатам генеалогического анализа было установлено, что источником распространения в голштинской породе гаплотипа фертильности HH1 являются бык Pawnee Farm Arlinda Chief (Chief), рожденный в США в 1962 году, и его сын Walkway Chief MARK 1978 года рождения. Pawnee Farm Arlinda Chief и Walkway Chief MARK интенсивно вовлекались в воспроизводство. От последнего получено более 60 тыс. дочерей и сыновей.

Гаплотип фертильности HH3 (OMIA: ID001824- 9913) ассоциирован с мутацией в гене CSM2 (структурного поддержания хромосом 2) и гибелью эмбрионов до 60-го дня стельности [11]. Область локализации мутации определена на BTA8 в области 94,0-96,0 Mb в позиции 95410507 с заменой T→C в 24 экзоне гена SMC2. В процессах конденсации хромосом, их сегрегации, а также в процессе клеточного деления и репарации ДНК белок SMC2 играет важную роль. Родоначальниками мутации являются американские быки-производители GayView SKYLINER и Glendell ARLINDA CHIEF (1954 и 1968 г. р.) [10, 11],

потомки которых широко использовались в системе искусственного осеменения голштинского скота.

Цель исследований – изучение полиморфизма генов ARAF1 и SMC2, ассоциированных с гаплотипами фертильности HH1 и HH3, у крупного рогатого скота голштинской породы.

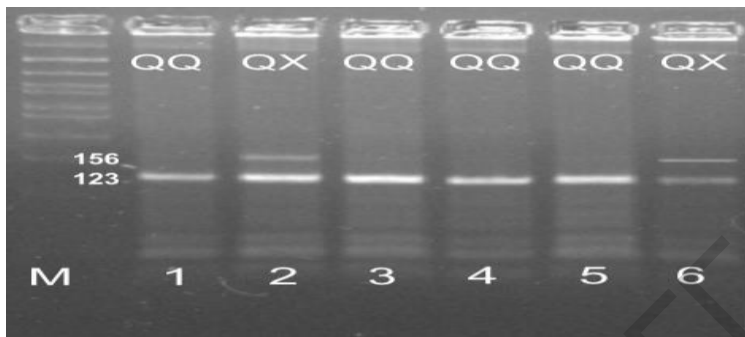
Материал и методика исследований. Генотипирование крупного рогатого скота по выявлению мутаций по генам ARAF1 и SMC2, ассоциированных с гаплотипами фертильности HH1 и HH3, проводилось на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «Гродненский государственный аграрный университет». В ходе исследования было протестировано 435 быкопроизводящих коров голштинской породы, содержащихся в СПК имени Деньщикова Гродненского района.

Для диагностики мутации в гене ARAF1 использовали следующую последовательность синтетических олигонуклеотидов:

ARAF1_f – 1:5'TATAGACTGTGAGAATTTCCAGG-3';

ARAF1_r – 2:5'TTATCGACCTCCTGCTTGTCCTGC-3'.

ПЦР проводили по следующей программе: 95 °C – 7 мин; 40 циклов: 94 °C – 30 с, 61 °C – 30 с, 72 °C – 45 с; 72 °C – 7 мин. Визуализацию продукта амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле с длиной амплифицированного фрагмента – 156 bp. Для рестрикции амплифицированного участка использовали эндонуклеазу рестрикции BstC8I. Реакцию проводили при температуре 37 °C. Продукт рестрикции гена разделяли электрофоретически в 3-4 % агарозном геле (при напряжении 130 В) в 1×TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе гель-документирования GelDoc RX+ (BIORAD) с определением следующих генотипов: QQ = 123/33bp (свободный от мутации), QX = 156/123/33 bp (носитель мутации). Летальный генотип XX = 156 bp определен не был (рисунок 1).



M – ДНК-маркер молекулярного веса 100bp; 1, 3, 4, 5 – генотип $APAF1^{QQ}$; 2, 6 – $APAF1^{QX}$

Рисунок 1 – Электрофореграмма фрагментов ПЦР участка гена APAF1

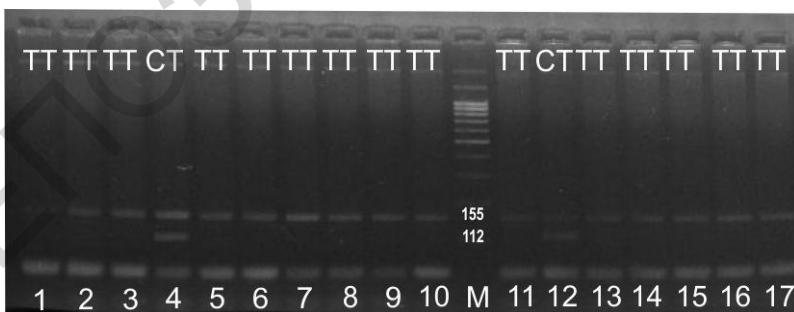
Для диагностики мутации в гене SMC2 использовали следующую последовательность синтетических олигонуклеотидов:

$SMC2_f$ – GGTCTTTAGTGGCTCTGTCA- 3',

$SMC2_r$ – TCTTACCTGAGAATGTGTGA- 3',

$SMC2_n$ – TCTTACCTGAGAATGTGTGG- 3'.

ПЦР проводили по следующей программе: 94 °C – 4 мин; 25 циклов: 94 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с; 72 °C – 3 мин. Визуализацию продукта амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле (при напряжении 120 В) с определением следующих генотипов: ТТ = 219/155 bp (свободный от мутации), СТ = 219/155/112 bp (носитель мутации). Летальный генотип СС = 219/112 bp определен не был (рисунок 2).



M – ДНК-маркер молекулярного веса 100bp; 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17 – генотип $SMC2^{TT}$; 4, 12 – $SMC2^{CT}$

Рисунок 2 – Электрофореграмма фрагментов ПЦР участка гена SMC2

Частоту встречаемости генотипов рассчитывали по формуле 1.

$$P = n / N, \quad (1)$$

где P – частота определенного генотипа;

n – количество животных, имеющих определенный генотип;

N – общее число животных.

Частота встречаемости аллелей по гену ARAF1 рассчитана по формуле 2, а по гену SMC2 – по формуле 3 по Е. К. Меркурьевой (1977).

$$pQ = 2n QQ + n QX / 2N, \quad (2)$$

$$qX = 2n XX + n QX / 2N, \quad (2)$$

$$pT = 2n TT + n TC / 2N,$$

$$qC = 2n CC + n TC / 2N, \quad (3)$$

где pQ – частота аллеля Q;

qX – аллель X;

pT – частота аллеля T;

qC – аллель C;

n – количество гомозиготных или гетерозиготных особей;

N – общая численность обследованных животных;

2N – число аллелей данного двухаллельного локуса в обследованной популяции.

Результаты исследований и их обсуждение. Для определения полиморфизма по генам ARAF1 и SMC2 было протестирована выборка племенного маточного поголовья крупного рогатого скота голштинской породы в количестве 150 голов по первой и второй лактации и 135 голов третьей лактации. Частоты встречаемости аллелей и генотипов по генам ARAF1 и SMC2 представлены в таблице 1, 2 и на рисунках 3 и 4.

Таблица 1 – Частота встречаемости аллелей и генотипов гена ARAF1

Лактация голов	Частота встречаемости				
	аллелей		генотипов, %		
	Q	X	QQ	QX	XX
1	0,987	0,013	97,3	2,7	-
2	0,997	0,003	99,3	0,7	-
3	0,993	0,007	98,5	1,5	-

Из данных таблицы 1 видно, что в процессе проведения исследования были выявлены различия по частоте встречаемости генотипов и аллелей гена ARAF1. В исследуемой группе животных самая высокая частота встречаемости в среднем по трем лактациям была выявлена у генотипа ARAF1^{QQ} – 98,4 %, тогда как частота встречаемости генотипа ARAF1^{QX} составила 1,6 %. Животные с генотипом XX в исследуемой

популяции не выявлены. Частота встречаемости аллеля Q гена APAF1 составила 0,992, а встречаемость аллеля X – 0,007.

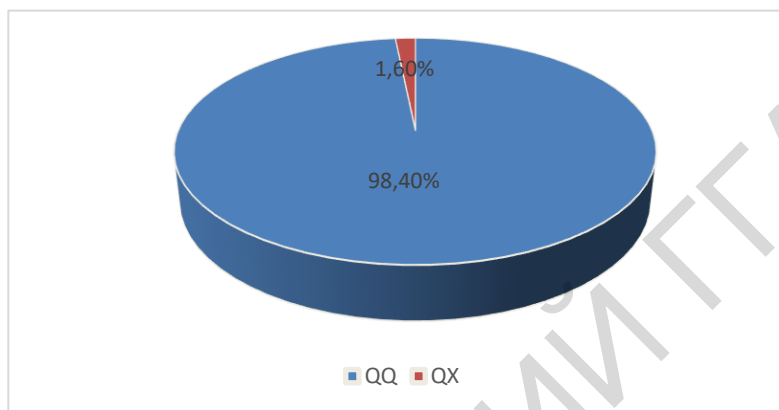


Рисунок 3 – Частота встречаемости генотипов по гену APAF1

Таблица 2 – Частота встречаемости аллелей и генотипов гена SMC2

Лактация	Частота встречаемости				
	аллелей		генотипов, %		
	T	C	TT	CT	CC
1	0,997	0,003	99,3	0,7	-
2	0,993	0,007	98,6	1,4	-
3	0,992	0,008	98,5	1,5	-

Из данных таблицы 2 видно, что в процессе проведения исследования были выявлены различия по частоте встречаемости генотипов и аллелей гена SMC2. В исследуемой популяции животных самая высокая частота встречаемости в среднем по трем лактациям была выявлена у генотипа SMC2^{TT} – 98,5 %, тогда как частота встречаемости генотипа SMC2^{CT} составила 1,5 %. Животные с генотипом CC в исследуемой популяции не выявлены. Частота встречаемости аллеля T гена SMC2 составила 0,994, а встречаемость аллеля C – 0,006.

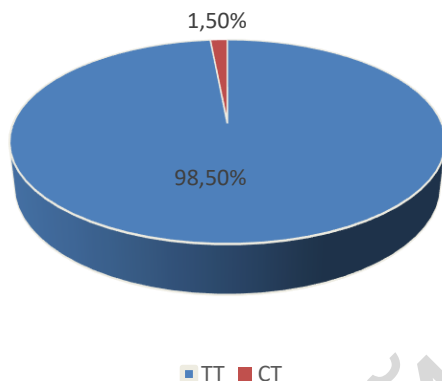


Рисунок 4 – Частота встречаемости генотипов по гену SMC2

Заключение. В результате проведенной ПЦР-диагностики были выявлены гетерозиготные носители мутации в гене APAF1 и гетерозиготные носители мутации в гене SMC2. От общего массива протестированных животных ($n = 435$) на долю носителей мутантного аллеля по гену APAF1 приходится 1,6 %, по гену SMC2 – 1,5 %. Носители летального генотипа XX и CC в исследуемой популяции не идентифицированы, т. к. погибают на ранних стадиях эмбриогенеза. Наличие носителей гаплотипов фертильности HH1 и HH3 свидетельствуют о необходимости дальнейшей селекции по генам APAF1 и SMC2. Контроль и элиминация носителей заболеваний позволят сохранить репродуктивное здоровье животных и достичь высоких показателей молочной продуктивности крупного рогатого скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cole, J. B. Haplotype tests for recessive disorders that affect fertility and other traits. AIP / J. B. Cole // Research Report Genomic 3. – Т. – 99. – 2016. – С. 7274-7288.
2. Müller, M. Localization of Apaf1 gene expression in the early development of the mouse by means of in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction / M. Müller. – 2005. – С. 215-221.
3. Ghanem, M. E. Detection of APAF1 mutation in Holstein cows and mummified fetuses in Japanese dairy herds / M. E. Ghanem // Reproduction Domestic Animals. – Т. – 53. – С.137-142.
4. Генетические аномалии крупного рогатого скота / Н. В. Ковалюк [и др.] // Сборник научных трудов краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2018. – Т. 7. – № 1. – С. 27-32.
5. Identification of a nonsense mutation in APAF1 that is likely causal for a decrease in reproductive efficiency in Holstein dairy cattle / H. A. Adams [и др.] // American Dairy Science Association. – 2016. – Т. 99, вып. 8. – С. 6693- 6701.
6. The distribution for LoF mutations in the FANCI, APAF1, SMC2, GART, and APOB genes of the Russian Holstein cattle population. / O. S. Romanenkova [и др.] // American Dairy Science Association. – 2017. – С. 95-83.

7. Ussenbekov, Y. A. Identification of monomorphic and polymorphic genes associated with recessive fertility defects in Holstein cows reared in Kazakhstan / Y. A. Ussenbekov // Veterinarnski Arhiv. – 2022. – Т. 92. – С. 27-35.
8. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes / P. M. Van Raden [и др.] // American Dairy Science Association. – 2011. – Т. 94. – С. 6153-6161.
9. Homozygous haplotype deficiency reveals deleterious mutations compromising reproductive and rearing success in cattle / H. Pausch [и др.] // J. BMC Genomics. – 2015. – Т. 16. – С. 312-318.
10. Зиновьева, Н. А. Гаплотипы фертильности голштинского скота / Н. А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – С. 423-435.
11. Bovine exome sequence analysis and targeted SNP genotyping of recessive fertility defects BH1, HH2 and HH3 reveal causative mutation in SMC2 for HH3 / M. C. Clure [и др.] // PLoS ONE. – 2014. – Т. 9. – С. 125-130.