

МИХАЙЛОВА М.Е.✉, КИРЕЕВА А.И., РОМАНИШКО Е.Л.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

✉ M.Mikhailova@igc.by, (+375) 17-399-32-05

БРАХИСПИНА – НАСЛЕДСТВЕННАЯ АНОМАЛИЯ, СНИЖАЮЩАЯ ПЛОДОВИТОСТЬ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Цель. Жесткая селекция по ограниченному числу признаков продуктивности и использование искусственного осеменения коров относительно небольшим количеством лучших быков-производителей привело к снижению генетической изменчивости. Изучение генетической структуры популяции крупного рогатого скота голштинизированной породы по гену *FANCI*, детерминирующему развитие брахиспинального синдрома (BY), актуальны для развития племенного животноводства Республики Беларусь. Негативное влияние данного рецессивного генетического дефекта в гомозиготном состоянии приводят к эмбриональной смертности или гибели теленка в ранний постэмбриональный период. Поэтому наследственная брахиспинальная аномалия относится к гаплотипу фертильности ННО. **Методы.** ДНК, выделенная из биологических образцов животных (кровь, ушной отщип). Исследования проводили молекулярно-генетическими методами: ПЦР, секвенирование. **Результаты.** Выявлены носители гаплотипа фертильности ННО (BY). Частота животных-носителей мутаций гена *FANCI* (ННО (BYC)) составляет 3,38 %. **Выводы.** Животных-носителей мутации необходимо исключать из селекционного процесса. В будущем необходимо строго контролировать качество ввозимой племенной продукции (материала) в Республику Беларусь.

Ключевые слова: гаплотипы, фертильность, носители мутации, брахиспина.

Селекция в животноводстве направлена на повышение продуктивных качеств животного. За последние шестьдесят лет интенсивной селекции молочного скота достигнуты высокие показатели молочной продуктивности. Конечно же, этот результат получен не только за счет генетического прогресса. Однако генетический вклад в продуктивность весьма значителен. Например, в Швеции, согласно данным исследователей, ежегодный генетический прирост молоч-

ной продуктивности составляет 1,5 % [1].

Очевидно, что односторонний отбор по продуктивным признакам привел к снижению репродуктивных качеств молочного скота. Животные, имеющие самый высокий генетический потенциал продуктивности, обладают пониженными воспроизводительными способностями.

Резкий рост показателей продуктивности связывают с внедрением в практику скотоводства искусственного осеменения. Генетическое совершенствование пород сельскохозяйственных животных предусматривает международный обмен генофондом с целью использования лучших мировых селекционных достижений. Однако завоз племенного материала из-за рубежа сопряжен с неконтролируемым появлением и распространением наследственных аномалий, способных нанести существенный вред развитию животноводства и поставить под угрозу биологическую безопасность страны. Моногенные наследственные заболевания идентифицированы практически во всех породах молочного крупного рогатого скота и постоянно регистрируются случаи появления новых.

Следует отметить, что селекционное значение имеют те мутации, носителями которых являются интенсивно используемые быки-производители.

Репродуктивные способности коров, как и продуктивные качества, очень важны для молочного скотоводства. Снижение репродуктивной способности коров приводит к убыткам в молочном животноводстве, так как уменьшается производство молока из-за отсутствия лактационного периода у коров. В настоящее время считается, что, по крайней мере, половина такого снижения обусловлена генетическими факторами [2, 3].

В базе данных «Online Mendelian Inheritance in Animals» (OMIA) описано более 3300 наследственных аномалий у 231 вида животных (2017 год). В этой базе данных о наследственных дефектах животных содержится фенотипи-

© МИХАЙЛОВА М.Е., КИРЕЕВА А.И., РОМАНИШКО Е.Л.

ческое описание около 400 наследственных аномалий крупного рогатого скота (*Bos Taurus* L.) и свыше 200 генетических дефектов свиньи домашней (*Sus scrofa* L.) [4]. Практикуемая в течение последних десятилетий стратегия селекции на быков-лидеров привела к существенному росту уровня гомозиготности в большинстве культурных пород крупного рогатого скота (КРС). Высокая скорость распространения вредных мутаций определяется рецессивным характером их наследования. Продукты таких генов, как правило, участвуют в регуляции тканеспецифичных функций, и неблагоприятные эффекты мутантного аллельного варианта компенсируются в гетерозиготе нормальной функцией аллеля дикого типа. Рецессивные мутации, снижающие жизнеспособность организмов или приводящие в гомозиготном состоянии к гибели, в гетерозиготном состоянии могут длительное время сохраняться в популяциях. При определенных системах скрещивания эти мутации будут выщепляться в виде гомозигот. Гибель гомозиготных особей может наносить существенный экономический урон животноводству. Поэтому разработка методов выявления и отбора животных, являющихся носителями вредных мутаций, представляет собой серьезную теоретическую и практическую задачу [4, 5].

Известны LoF-мутации наследственных заболеваний (LoF, loss-of-function), связанные с пониженной плодовитостью КРС: дефицит уридин-монофосфатсинтазы (DUMPS), дефицит лейкоцитарной адгезии (BLAD), комплексный порок позвоночника (CVM), брахиспинальный синдром (BY) или, наряду с традиционной аббревиатурой, это гаплотипы фертильности (ННД, ННВ, ННС, НН0). В настоящее время использование метода полногеномного секвенирования (NGS) позволило выявить новые мутации, ассоциированные с гаплотипами фертильности голштинского скота: НН1 (*APAF1*, C→T, Q579X), НН3 (*SMC2*, T→C, F1135S), НН4 (*GART*, A→C, N290T), НН5 (*TFB1M*, 138kb Del), НСД (*APOB*, 1,3 kb Ins), являющиеся причиной эмбриональной смертности [5].

Нами проводится скрининг животных на выявление мутаций в генах *FANCI*, *SLC35A3*, *ITGB2*, *UMPS* (гаплотипы фертильности НН0, ННС, ННВ, ННД), а также для выявления животных-носителей LoF-мутаций в генах *APAF1*, *SMC2*, *GART*, *TFB1M*, *APOB* (гаплотипы фертильности НН1, НН3, НН4, НН5, НСД). Все эмбрионы, являющиеся гомозиготными по како-

му-либо гаплотипу из вышеперечисленных, оказываются нежизнеспособными.

В данной статье представлены результаты работы по ДНК-типированию животных на носительство мутантного аллеля гена *FANCI*, детерминирующего брахиспинальный синдром (BY) – гаплотип фертильности НН0 КРС.

Материалы и методы

Материалом для исследования является ДНК, выделенная из биологических образцов тканей животных (кровь, отщип ушной раковины). При выполнении НИР были использованы следующие молекулярно-генетические методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР), электрофорез с детекцией результатов в агарозном геле, секвенирование (по Сэнгеру и NGS).

Для получения специфичных ПЦР-продуктов в исследуемом локусе гена *FANCI* использовали праймеры согласно Fang, L., 2013 [6]. ПЦР проводили в объеме 50 мкл реакционной смеси, содержащей: 5×ПЦР буфер (+MgCl₂), по 0,3 мкМ каждого праймера, 0,2 мМ dNTP (смесь dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1U ДНК-полимеразы для длинных фрагментов и 10–15 нг геномной ДНК в качестве матрицы. До конечного объема реакционную смесь доводили MQ-H₂O. Программа амплификации: 98°C – 30 сек.; 98°C – 5 сек., 66°C – 20 сек., 72°C – 1 мин. (35 циклов); 72°C – 5 мин.; 12°C – 5 мин.

Для анализа локуса гена *FANCI* смесь после ПЦР наносили на 1,8 % агарозный гель, оценивали размер полученных ПЦР-фрагментов относительно маркеров молекулярной длины High Range DNA Ladder SM 1123 и Middle Range DNA Ladder SM 1113 («Thermo scientific», Литва).

Секвенирование исследуемого локуса гена *FANCI* (аллель дикого типа и мутантный аллель) осуществляли на полногеномном секвенаторе MiSeq (Illumina). Анализ результатов проводили с использованием программы Illumina Experiment Manager 1.9 и баз данных сети Интернет.

Результаты и обсуждение

Синдром брахиспина (*BY*) (*Brachyspina* – «короткий позвоночник») – рецессивное наследственное заболевание (OMIA 000151-9913). В последнее время в литературе приводится и второе название синдрома *BY* как гаплотип фертильности НН0 крупного рогатого скота голштинской породы, который является одним из

наиболее важных показателей плодовитости.

Мутация выявлена в гене *FANCI* (Fanconi anemia complementation-group), локализованном на 21 хромосоме в позиции 21 184 869 -21 188 198. Мутантный аллель, обуславливающий данный генетический дефект, характеризуется наличием делеции 3.3 т. п. н. (Del (V877L fs27X) в гене *FANCI* [7]. Мутация возникла у американского быка голштинской породы USA 000001682485 Sweet Haven TRADITION 1974 года рождения. Большая часть гомозиготных эмбрионов гибнет на ранних стадиях стельности, но редко (менее чем 1 на 100 000 отелов) плод донашивается до конца срока. Телята рождаются мертвыми, у них укорочен позвоночник, трубчатые кости конечностей удлинены и истончены. Кроме того, выявляются пороки развития внутренних органов, в частности сердца, почек и яичек. ДНК-диагностика на выявление носительства летального аллеля, приводящего к брахиспине, проводится только с 2012 года [8]. Поэтому сохраняется высокий процент носителей этого заболевания среди популяций голштинской породы по всему миру, достигая 4,39 %.

Выявление у особей аллелей дикого и мутантного типов гена *FANCI*, детерминирующего синдром брахиспина (BY), проводили методом ПЦР [9].

Образцы ДНК животных-носителей гаплотипов фертильности были использованы в

качестве контрольных образцов для отработки и проведения молекулярно-генетических методов диагностики.

У здорового животного (BYF) два нормальных аллеля гена (гомозигота). На электрофореграмме видна одна полоса размером 3738 п. н. У животного – носителя мутации (BYC) (гетерозигота) на электрофореграмме видны две полосы: 409 п. н. – мутантный аллель и 3738 п. н. – нормальный аллель (рис. 1).

Для подтверждения специфичности, ПЦР-продукты 409 п. н. и 3738 п. н. были секвенированы, результаты эксперимента показали, что нуклеотидная последовательность амплификоннов соответствует референсной нуклеотидной последовательности AC_000178.1(GenBank), что подтверждает специфичность метода и достоверность результатов.

Проведен скрининг 325 голов скота, разводимого в Беларуси, на выявление мутации в гене *FANCI* (гаплотипы фертильности НН0) (табл. 1). В белорусской популяции голштинизированной породы крупного рогатого скота нами выявлено 11 голов-носителей мутантного аллеля (BYC), обуславливающего развитие брахиспины, из них 9 быкопроизводящих коров и 2 быка-производителя. Частота животных-носителей мутации гена *FANCI*, связанной с фертильностью крупного рогатого скота в Беларуси (а именно НН0 (BY)), составляет – 3,38 %.

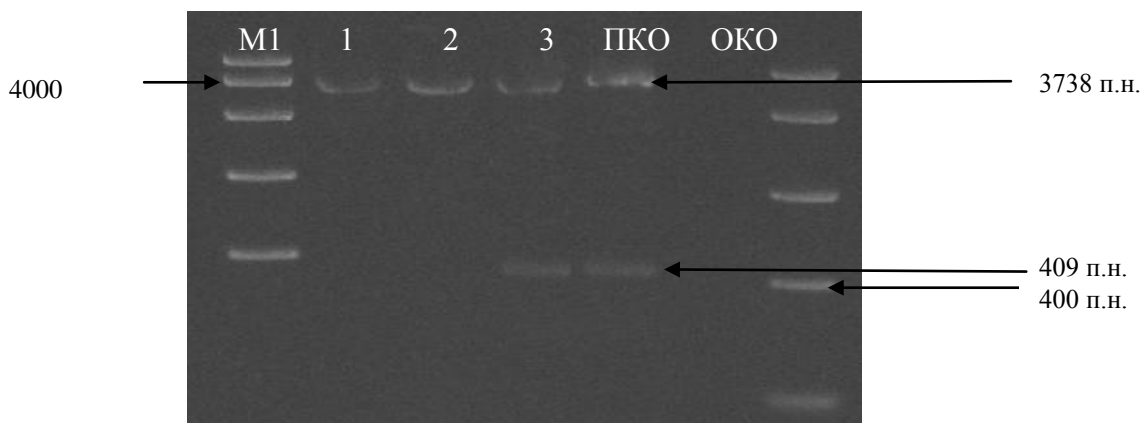


Рис. Специфичные ПЦР-продукты анализируемого локуса гена *FANCI*: M1 и M2 – маркеры молекулярной длины, DNA Ladder SM 1123, M2 и DNA Ladder SM 1113 («Thermo scientific», Литва); 1, 2 – здоровые животные (BYF), ПЦР-продукт 3738 п. н.; 3 – животное-носитель брахиспины (BYC), ПЦР-продукты 409 п. н. и 3738 п. н.; ПКО – положительный контрольный образец; ОКО – отрицательный контрольный образец.

Таблица. Распределение животных по выявленной генетической аномалии – брахиспина ВУ, ассоциированная с фертильностью

Символ гаплотипа фертильности	К-во	Выявлено носителей мутации (ВУС)			
		%	n	в том числе	
				коров, гол.	быков, гол.
ННО (ВУ), ген <i>FANCI</i>	325	3,38	11	9	2

Выводы

В результате проведенного скрининга выявлены животные-носители мутации (ВУС), ассоциированные с брахиспиной крупного рогатого скота (гаплотип фертильности ННО). Частота животных-носителей мутаций, связанных с фертильностью крупного рогатого скота в Беларуси (а именно: ННО (ВУ)), составляет 3,38 %.

Предложено исключить из селекционного процесса 2 быков-производителей – носителей мутации (ВУС) селекционно-генетических центров Республики Беларусь и строго контролировать качество ввозимой племенной продукции (материала), так как быки-производители, сперма которых была ввезена по импорту, являются носителями гаплотипов, отрицательно влияющих на фертильность.

Рекомендации по элиминации вредных рецессивных мутаций позволят внести вклад в совершенствование генофонда белорусских популяций сельскохозяйственных животных. Системное использование разработанных и апробированных методических подходов для детекции мутантных аллелей, ассоциированных с гаплотипами фертильности, и выявление животных-носителей мутаций расширяет возможности проведения мониторинга племенных животных в Республике Беларусь.

Выражаем благодарность профессору Варминско-Мазурского университета Станиславу Каминскому (г. Ольштын, Польша) за любезно предоставленный образец ДНК животного-носителя мутантного аллеля (ВУС), детерминирующего синдром брахиспины, для отработки метода.

Литература

- Rauw W.M., Kanis E., Noordhuizen-Stassen E.N., Grommers F.J. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science*. 1998. Vol. 56. P. 15–33.
- Dobson H. Smith R.F., Royal M.D. The high producing dairy cow and its reproductive performance. *Reprod. Domest. Anim.* 2007. Vol. 42 (Suppl. 2). P. 17–23.
- Oltenu P.A., Broom D.M. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare*. 2010. Vol. 19 (S). P. 39–49.
- Зиновьева Н.А. Гаплотипы фертильности голштинского скота. *Сельскохозяйственная биология*. 2016. Т. 51, № 4. С. 423–435.
- Larkin D.M., Daetwyler H.D., Hernandez A.G. Whole-genome resequencing of two elite sires for the detection of haplotypes under selection in dairy cattle. *PNAS USA*. 2012. № 109 (20). P. 7693–7698.
- Fang, L. Identification of brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. *J Vet Diagn Invest*. 2013. Vol. 25. P. 508–510.
- Charlier, C., Agerholm W., Coppieters P., Karlakov-Mortensen W., Li A. Deletion in the bovine *FANCI* gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. *PLoS ONE*. 7 (8). e43085. doi: 10.1371/journal.pone.0043085.
- Михайлова М.Е., Киреева А.И., Романишко Е.Л. ДНК-технология идентификации генетического дефекта крупного рогатого скота голштинской породы, детерминирующего синдром брахиспины (ВУ): методич. рекомендации. Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2016. 8 с.

References

- Rauw W.M., Kanis E., Noordhuizen-Stassen E.N., Grommers F.J. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science*. 1998. Vol. 56. P. 15–33.
- Dobson H. Smith R.F., Royal M.D. The high producing dairy cow and its reproductive performance. *Reprod. Domest. Anim.* 2007. Vol. 42 (Suppl. 2). P. 17–23.
- Oltenu P.A., Broom D.M. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare*. 2010. Vol. 19 (S). P. 39–49.
- Zynov'eva N.A. Haplotypes of fertility of Holstein cattle. *Sel'skokhoziaïstvennaïa byolohyïa*. 2016. Т. 51, # 4. S. 423–435.
- Larkin D.M., Daetwyler H.D., Hernandez A.G. Whole-genome resequencing of two elite sires for the detection of haplotypes under selection in dairy cattle. *PNAS USA*. 2012. № 109 (20). P. 7693–7698.
- Fang, L. Identification of brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. *J Vet Diagn Invest*. 2013. Vol. 25. P. 508–510.

7. Charlier, C., Agerholm W., Coppieters P., Karlakov-Mortensen W., Li A. Deletion in the bovine *FANCI* gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. *PLoS ONE*. 7 (8). e43085. doi: 10.1371/journal.pone.0043085.
8. Mykhaïlova M.E., Kyreeva A.Y., Romanishko E.L. DNA technology for identification of the genetic defect of cattle of the Holstein breed, determining brachyspina syndrome (BY): metodych. rekomendatsyy. Mynsk: Ynstytut henetyky y tsytolohyy NAN Belarusy, 2016. 8 s.

MIKHAILOVA M.E., KIREEVA A.I., ROMANISHKO E.L.

*Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus,
Republic of Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: M.Mikhailova@igc.by*

BRACHISPINA – HEREDITARY ANOMALY REDUCING THE FERTILITY OF CATTLE

Aim. Rigid selection for a limited number of signs of productivity and the use of artificial insemination of cows relatively small number of the best bulls-producers led to a decrease in genetic variability. The study of the genetic structure of the golshtinized cattle population for the *FANCI* gene, which determines the development of Brachispinal Syndrome (BY), is relevant for the development of livestock breeding in the Republic of Belarus. The negative influence of this recessive genetic defect in the homozygous state leads to embryonic death or calf death in the early postembryonic period. Therefore, the hereditary brachispinal anomaly refers to the haplotype of HHO fertility. **Methods.** The material is DNA extracted from biological samples of animal tissues (blood, pinch of an ear). The studies were carried out using molecular genetic methods: PCR, sequencing. **Results.** 325 cattle were screened for mutation carriers (HHO (BY) fertility haplotypes). The frequency of carriers of mutations of the *FANCI* gene associated with bovine fertility in Belarus (HHO (BYC)) is 3.38 %. **Conclusions.** Animals-carriers of the mutation are excluded from the selection process. In the future, it is necessary to strictly control the quality of imported pedigree products (material) to the Republic of Belarus. **Keywords:** haplotypes, fertility, mutations carriers, Brachyspina.

МИХАЙЛОВА М.Є., КІРЕЄВА А.І., РОМАНІШКО Е.Л.

*Інститут генетики і цитології НАН Білорусі,
Республіка Білорусь, 220072, м. Мінськ, вул. Академічна, 27, e-mail: M.Mikhailova@igc.by*

БРАХІСПІНА – СПАДКОВА АНОМАЛІЯ, ЗНИЖУЄ ПЛОДЮЧОСТІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Мета. Жорстка селекція по обмеженому числу ознак продуктивності та використання штучного осіменіння корів відносно невеликою кількістю кращих бугаїв-плідників призвело до зниження генетичної мінливості. Вивчення генетичної структури популяції великої рогатої худоби голштинізованих породи по гену *FANCI*, що детермінують розвиток брахіспінального синдрому (BY), актуальні для розвитку племінного тваринництва Республіки Білорусь. Негативний вплив даного рецесивного генетичного дефекту в гомозиготному стані призводять до ембріональної смертності або загибелі теляти в ранній постембріональний період. Тому спадкова брахіспінальна аномалія відноситься до гаплотипу фертильності ННО. **Методи.** ДНК, виділена з біологічних зразків тварин (кров, вушної отщип). Дослідження проводили молекулярно-генетичними методами: ПЛР, секвенування. **Результати.** Здійснен скринінг 325 голів худоби на виявлення носіїв гаплотипу фертильності (ННО (BY)). Частота тварин-носіїв мутацій гена *FANCI* ННО (BYC) становить 3,38 %. **Висновки.** Тварини-носії мутації виключені з селекційного процесу. У майбутнє необхідно строго контролювати якість продукції, що ввозиться племінної продукції (матеріалу) в Республіку Білорусь. **Ключові слова:** гаплотипи, фертильність, носії мутації, брахіспіна.