

ПОИСК НОВЫХ ЛОКУСОВ И ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СВИНЕЙ

SEARCH FOR NEW LOCI AND CANDIDATE GENES AFFECTING REPRODUCTIVE EFFICIENCY OF PIGS

E. Romanets
L. Getmantseva
A. Radyuk
T. Romanets
A. Mishina
A. Korobeinikova
Sh. Kabieva
A. Alekseyev
S. Bakoev

Summary. The identification of candidate genes, genetic variants and molecular pathways that affect the reproductive performance of pigs remains a challenge. The aim of this work was to search for new loci and candidate genes associated with the number of piglets at birth in Large White pigs. The study was conducted on Large White pigs using the Fst method to assess genetic differentiation between high and low productivity groups. As a result, 18 SNPs were identified, 10 of which were localized in genes involved in various physiological processes in the body, including those directly or indirectly related to sow fertility.

Keywords: pigs, number of piglets at birth, SNP, Fst, genomic regions, gene.

Романец Елена Андреевна

аспирант, ФГБОУ ВО Донской государственный аграрный университет (п. Персиановский)
lena9258@mail.ru

Гетманцева Любовь Владимировна

доктор биологических наук, ведущий аналитик,
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (г. Москва)
ilonaluba@mail.ru

Радюк Анастасия Владимировна

кандидат сельскохозяйственных наук,
ФГБОУ ВО Донской государственный аграрный университет (п. Персиановский)
cool.kapito2012@yandex.ru

Романец Тимофей Сергеевич

кандидат сельскохозяйственных наук, старший преподаватель, ФГБОУ ВО Донской государственный аграрный университет (п. Персиановский)
timofey_8877@mail.ru

Мишина Арина Игоревна

кандидат биологических наук, аналитик,
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (г. Москва)
amishina@cspfmba.ru

Коробейникова Анна Васильевна

аналитик, ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (г. Москва)
aaaniich@yu.ru

Кабиева Шаунат Шамильевна

кандидат биологических наук, аналитик,
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (г. Москва)
dhuannna@mail.ru

Алексеев Александр Анатольевич

ФГБОУ ВО Донской государственный аграрный университет (п. Персиановский)
sachaalekseev88@gmail.com

Бакоев Сирождин Юсуфович

кандидат биологических наук, ведущий аналитик,
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (г. Москва)
siroj1@yandex.ru

Аннотация. Идентификация генов-кандидатов, генетических вариантов и молекулярных путей, влияющих на репродуктивную эффективность свиней, остается сложной задачей. Целью работы являлся поиск новых локусов и генов-кандидатов, связанных с количеством поросят при рождении у свиней крупной белой породы. Исследование проводили на свиньях крупной белой породы, используя метод Fst для оценки генетической дифференциации между группами с высокой и низкой продуктивностью. В результате установили 18 SNP, из которых 10 локализованы в генах, задействованных в различных физиологических процессах организма, в том числе прямо или косвенно связанные с плодовитостью свиноматок.

Ключевые слова: свиньи, количество поросят при рождении, SNP, Fst, геномные области, ген.

Введение

Репродуктивные качества сельскохозяйственных животных один из основных показателей, влияющих на экономический успех производства [1]. Эффективность свиноводства во многом зависит от количества поросят при рождении. До настоящего времени селекция, основанная на программах разведения с использованием наилучшего линейного объективного прогнозирования (BLUP), успешно улучшала продуктивные признаки. Тем не менее, генетическое улучшение репродуктивных признаков является сложной задачей ввиду низкой наследуемости и ограниченности полом, также сложность состоит в том, что фенотипирование возможно только на половозрелых животных, имеющих потомство. Эти условия представляют собой проблему для селекционных программ.

Одним из подходов решения данной проблемы являются геномные технологии, такие как полногеномное генотипирование, позволяющие проводить отбор животных с определенными генетическими вариантами, связанными с селекционными признаками, в том числе воспроизводством [2, 3].

На сегодняшний день, согласно данным базы PigQTLdb на 25 апреля 2023 г., идентифицировано 48844 QTL (локусов количественных признаков) для 673 базовых признаков свиней [4]. Большинство зарегистрированных QTL/ассоциаций (30480) связаны с характеристиками мяса и туши. Для репродуктивных признаков идентифицировано только 3899 QTL.

Можно отметить, что по результатам молекулярно-генетических исследований определены гены-кандидаты для основных признаков воспроизводства свиней [5–9]. Было установлено, что такие гены, как ретинолсвязывающий белок 4 (*RBP4*), рецепторы эстрогена 1 и 2 (*ESR1*, *ESR2*), рецептор пролактина (*PRLR*), фактор, ингибирующий лейкемию (*LIF*), связаны с количеством поросят при рождении [10–12]. Однако эти гены объясняют лишь относительно небольшую часть генетической изменчивости данного признака. Кроме того, ассоциации, установленные в одной группе животных (в одном хозяйстве), могут не воспроизводиться на другой группе животных (в другом хозяйстве), что связано с особенностями генетической структуры каждой конкретной популяции и наблюдающимся неравновесием по сцеплению (неслучайной корреляцией аллелей в различных локусах).

Наши исследования направлены на поиск новых уникальных локусов и генетических вариантов, которые могут быть связаны с количеством поросят при рождении.

Методика исследований

Исследования проводили на свиньях породы крупная белая разводимых в ЗАО «Племзавод-Юбилейный». Учитывали количество поросят при рождении по трём опоросам. Обработку данных выполняли в программе R studio, при фильтрации данных были удалены выбросы больше 3-х сигм. Для оценки нормального распределения данных использовали функцию QQ-plot. После фильтрации получили выборку из 239 животных. По признаку «количество поросят при рождении» свиноматок разделили на три группы — низкое, среднее и высокое количество поросят при рождении (по квантилям 0–0,1; 0,1–0,9; 0,9–1). На основе этого сформировали 2 группы, первую (n=26) — с низкими количеством поросят (7,3–11,0 гол.), вторую (n=28) — с высокими количеством (15,7–18,5 гол.).

Генотипирование проводили с использованием GeneSeek® GGP Porcine HD Genomic Profiler v1 (Illumina Inc, США). Фильтрацию геномных данных провели в соответствии со следующими параметрами --geno 0.1, --mind 0.1, --maf 0.05, --hwe 1e-7, --indep-pairwise 50 5 0.8. Для идентификации геномных областей, связанных с количеством поросят при рождении, использовали статистику Fst, путем сравнения генетических вариантов у свиней I и II групп. Значимыми вариантами считали те, у которых значения Fst превышали уровень квантиля 0,999. Далее генетические варианты идентифицировали и перевели в геномные позиции Sus scrofa 11.1 по базе Ensembl genome browser 109 (<https://www.ensembl.org/index.html>). Для оценки значимости эффектов генотипов генов *ALG1* и *AGBL1* на количество поросят при рождении использовали критерий Стьюдента.

Результаты исследований

Проанализировав геномы свиней обеих групп, установили SNPs которые отличались между ними. На рисунке 1 представлен манхэттенский график для Fst между исследуемыми группами по признаку количества поросят при рождении.

Ось X представляет собой геном свиней, разделенный на хромосомы (18 хромосом, без X-хромосомы), каждая точка на графике соответствует определенному генетическому варианту. Ось Y отображает значение статистики Fst для каждого генетического варианта. Большие значения Fst указывают на более сильную генетическую дифференциацию между сравниваемыми группами. На графике установлено пороговое значение для определения значимых вариантов превышающее уровень квантиля 0,999 (верхняя линия). Это означает, что значения Fst, которые превышают это пороговое значение, мы считали значимыми для определения геномных областей, связанных с количеством поросят при рождении.

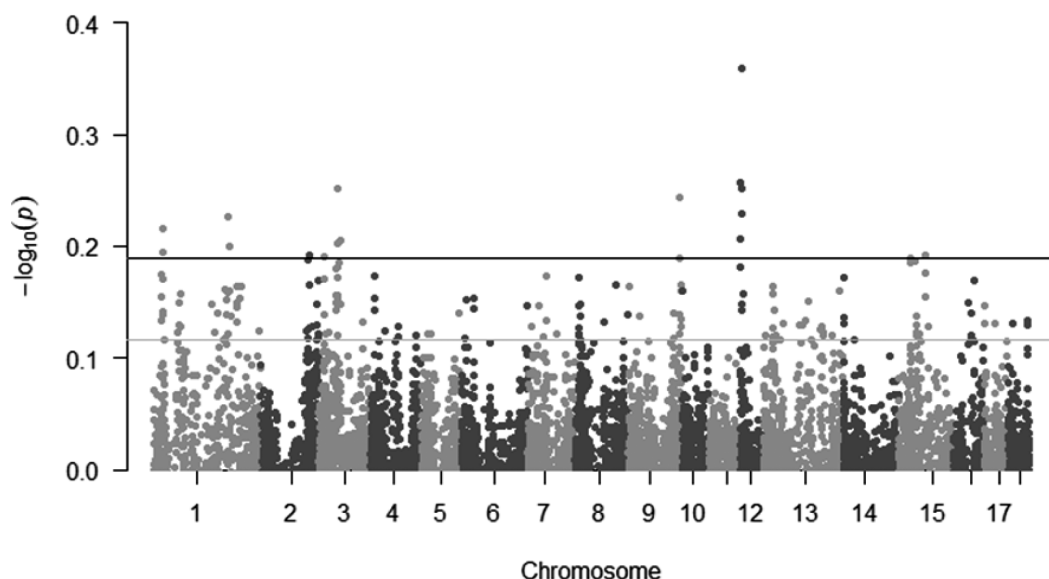


Рис. 1. Манхэттенский сюжет для Fst между двумя группами свиноматок

В результате было установлено 18 SNPs связанных с количеством поросят при рождении. Варианты локализованы в 1–3, 9, 12 и 15 хромосомах. В 1-й и 3-й хромосоме обнаружено по 4 SNP, в 12-й — 5 SNP вариантов (табл. 1).

Установленные SNPs были представлены различными вариантами нуклеотидных замен: 8 SNP — intron

variant, 8 SNP — intergenic variant, 1 SNP — non-coding exon, 1 SNP — 3 prime UTR variant. Интронные варианты (intron variant) относятся к замене нуклеотидов в частях гена, представляющих собой области, которые не кодируют белки, но играют роль в регуляции процесса транскрипции. Межгенные варианты (intergenic variant) относятся к замене нуклеотидов в областях между ге-

Таблица 1.

Идентифицированные SNP у свиней крупной белой породы

№	Хром.	Позиция	FST	SNP	Обозначение	Вариант	Ген
1	1	21980525	0.194171	G/A	rs81350212	intron variant	<i>AIG1</i>
2	1	22794656	0.215941	T/C	rs80942621	intron variant	<i>ADGRG6</i>
3	1	191160923	0.226336	—	—	non-coding exon	<i>ENSSSCG00000046397</i>
4	1	193377210	0.200101	A/C	rs80957165	intron variant	<i>AGBL1</i>
5	2	126841331	0.191298	T/G	rs81296219	3 prime UTR variant	<i>CEP120</i>
6	3	13605035	0.190482	G/A	rs81373234	intron variant	<i>AUTS2</i>
7	3	47357791	0.251499	T/C	rs81475232	intergenic variant	—
8	3	47882562	0.202041	A/G	rs344736435	intergenic variant	—
9	3	54244325	0.204539	A/G	rs80804264	intron variant	<i>AFF3</i>
10	9	131949063	0.244054	A/G	rs81418212	intergenic variant	—
11	9	132612394	0.189495	A/G	rs324075038	intron variant	<i>HHAT</i>
12	12	3245250	0.205957	C/T	rs323856019	intergenic variant	—
13	12	3455925	0.257323	T/C	rs318699665	intergenic variant	—
14	12	3957723	0.25151	G/A	rs81246169	intergenic variant	—
15	12	4006859	0.22968	T/C	rs334727649	intergenic variant	—
16	12	4023403	0.359354	A/G	rs344792319	intergenic variant	—
17	15	32036023	0.189495	G/A	rs81277814	intron variant	<i>TUBGCP5</i>
18	15	67118277	0.192131	C/T	rs81234801	intron variant	<i>ITGB6</i>

нами, чаще не содержащих генетической информации и не связанных с процессом экспрессии генов. Варианты некодирующего экзона (non-coding exon) относятся к замене нуклеотидов в экзонах, которые не кодируют функциональные участки белков, но часто содержат последовательности, влияющие на регуляцию экспрессии гена. Варианты замены нуклеотидов в 3' UTR (3 prime UTR variant), обычно являются некодирующими вариантами или вариантами, влияющими на некодирующие гены, прогнозирование которых затруднено или при отсутствии доказательств воздействия. 3' UTR включает в себя последовательности, которые могут влиять на стабильность мРНК, транспорт и трансляцию. Таким образом, обнаруженные варианты нуклеотидных замен встречаются в различных областях генома и имеют различные функциональные значения.

Для двух SNP (rs81350212 и rs80957165) локализованных в генах *AIG1* и *AGBL1*, оценены эффекты генотипов на изменчивость признака количества поросят при рождении (рис. 2, 3).

По гену *AIG1* наибольшее количество поросят при рождении (13,3 гол.) установлено у свиноматок с генотипом *AIG1_GG*, по данному показателю они достоверно ($p=0,0024$) превосходили свиноматок с генотипами *AIG1_AA* на 1,37 гол. или 11,5 %.

По гену *AGBL1* наибольшее количество поросят при рождении (13,48 гол.) установлено у свиноматок с генотипом *AIG1_AC*, по данному показателю они достоверно ($p=0,0019$) превосходили свиноматок с генотипами *AIG1_CC* — на 0,97 гол. или 7,8 %. Различия между генотипами *AIG1_AC* и *AIG1_AA*, были статистически недостоверны ($p=0,4$) и находились в пределах 0,23 гол. или 1,7 %, в то время как разница между генотипом *AIG1_AA* и *AIG1_CC* была достоверной ($p=0,044$) и составила 0,74 гол. или 5,9 %. Таким образом можно предположить связь аллеля *AIG1_A* с большим количеством поросят при рождении.

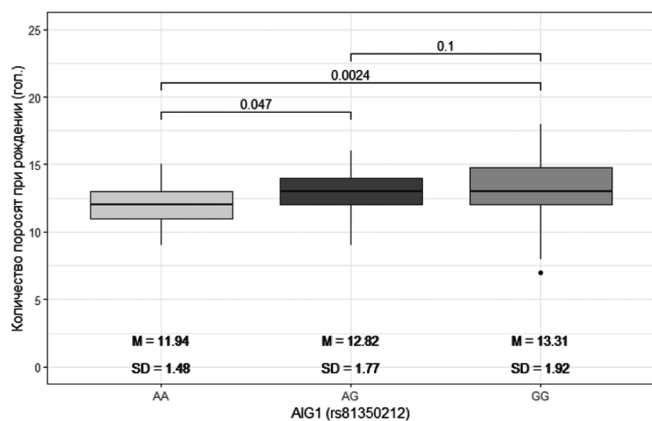


Рис. 2. Количество поросят при рождении при различных генотипах гена *AIG1*

Интересно, что некоторые идентифицированные в этом исследовании гены, обладают известными в литературе биологическими функциями, связанными с репродукцией. Описана связь гена *AIG1* с регуляцией роста и развития половых органов [13], а также влияние на гаметогенез у свиней [14, 15]. Ген *AGBL1* связан с признаками фертильности и воспроизводства у голштинского крупного рогатого скота [16], а также с внесезонным ягнением у овец [17]. Häfliger, I.M. с соавторами изучая фертильность молочного скота обнаружили миссенс-вариант в гене *TUBGCP5*, ассоциированный с многоплодием и процентом нормальных отёлов [18]. У человека ген *TUBGCP5* также влияет на фертильность и тесно связан с генезисом и развитием ооцитов [19]. Описана связь гена *CEP120* с бесплодием млекопитающих, в том числе человека [20–22]. Ген *ITGB6* оказывает ингибирующее действие на пролиферацию сателлитных клеток скелетных мышц у свиней, при этом уровни экспрессии гена *ITGB6* повышаются в скелетных мышцах свиней на 33, 65 и 90 дни эмбрионального развития [23].

Другие обнаруженные гены связаны с такими биологическими процессами как развитие нервной системы, регуляция клеточного цикла, дифференцировка и выживаемость клеток (ген *AFF3*) [24], развитие мозга (ген *AUTS2*) [25], развитие костной, мышечной и других тканей организма (*ADGRG6*) [26].

Выводы

Таким образом, по результатам исследования определены 18 SNPs, связанных с количеством поросят при рождении, 10 из которых локализованы в генах *AIG1*, *AGBL1*, *ADGRG6*, *CEP120*, *AUTS2*, *AFF3*, *HNAT*, *TUBGCP5*, *ITGB6*, *ENSSSCG00000046397*. Дополнительно протестированы эффекты генов *AIG1* и *AGBL1* на плодовитость свиноматок. Все это свидетельствует о том, что эти гены могут выступать в качестве генов-кандидатов репродуктивных признаков свиней и тестироваться в селекционных программах, направленных на повышение репродуктивной эффективности свиней.

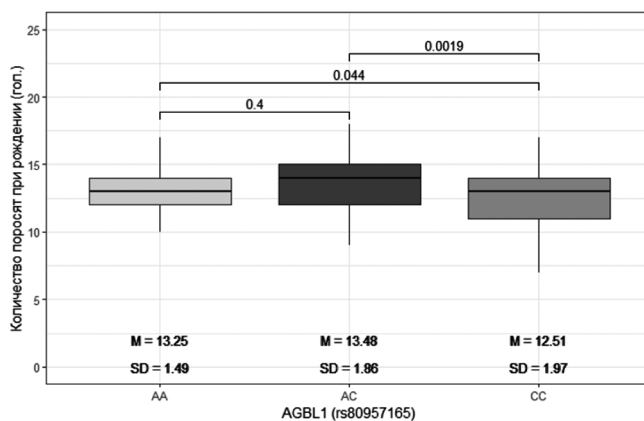


Рис. 3. Количество поросят при рождении при различных генотипах гена *AGBL1*

ЛИТЕРАТУРА

1. Vaishnav S., Chauhan A., Ajay A., Saini B. L., Kumar S., Kumar A., Bhushan B., Gaur G.K. Allelic to genome wide perspectives of swine genetic variation to litter size and its component traits // *Molecular Biology Reports*. 2023. V. 50. N 4. P. 3705–3721. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08168-5>
2. Bergfelder-Drüing S., Grosse-Brinkhaus C., Lind B., Erbe M., Schellander K., Simianer H., Tholen E. A genome-wide association study in large white and landrace pig populations for number piglets born alive // *PloS one*. 2015. V. 10. N 3. P. e0117468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117468>
3. Andersson, L., Haley, C. S., Ellegren, H., Knott, S. A., Johansson, M., Andersson, K., Andersson-Eklund L., Edfors-Lilja I., Fredholm M., Hansson I., Håkansson J., Lundström, K. Genetic-Mapping of Quantitative Trait Loci for Growth and Fatness in Pigs // *Science* 263. 1994. P. 1771–1774. DOI: 10.1126/science.8134840
4. <https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTldb/SS/summary?summ=clas&statu=>
5. Schild S.L.A., Baxter E.M., Pedersen L.J. A review of neonatal mortality in outdoor organic production and possibilities to increase piglet survival // *Applied Animal Behaviour Science*. 2020. Vol. 231. P. 105088. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.105088>
6. Sell-Kubiak E. Selection for litter size and litter birthweight in Large White pigs: Maximum, mean and variability of reproduction traits // *Animal*. 2021. Vol. 15. N 10. P. 100352. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100352>
7. Sell-Kubiak E., Knol E.F., Mulder H.A. Selecting for changes in average “parity curve” pattern of litter size in Large White pigs // *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2019. Vol. 136. N 2. P. 134–148. <https://doi.org/10.1111/jbg.12372>
8. Knol, E.F.; Nielsen, B.; Knap, P.W. Genomic selection in commercial pig breeding // *Animal Frontiers*. 2016. Vol. 6. N 1. P. 15–22.
9. Zak L.J., Gaustad A.H., Bolarin A., Broekhuijse M.L., Walling G.A., Knol E.F. Genetic control of complex traits, with a focus on reproduction in pigs // *Molecular Reproduction and Development*. 2017. Vol. 84. N 9. P. 1004–1011. <https://doi.org/10.1002/mrd.22875>
10. Vaishnav S., Chauhan A., Ajay A., Saini B. L., Kumar S., Kumar A., Bhushan D., Gaur G. K. Allelic to genome wide perspectives of swine genetic variation to litter size and its component traits // *Molecular Biology Reports*. 2023. Vol. 50. N 4. P. 3705–3721. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08168-5>
11. Mencik S., Vukovic V., Spehar M., Modric M., Ostovic M., Kabalin A. E. Association between ESR1 and RBP4 genes and litter size traits in a hyperprolific line of Landrace × Large White cross sows // *Veterinárni medicína*. 2019. Vol. 64. N 3. P. 109–117. <https://doi.org/10.17221/87/2018-VETMED>
12. Munoz M., Fernandez A.I., Ovilo C., Munoz G., Rodriguez C., Fernandez A., Alves E., Silio L. Non-additive effects of RBP4, ESR1 and IGF2 polymorphisms on litter size at different parities in a Chinese-European porcine line // *Genetics Selection Evolution*. 2010. Vol. 42. N 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-42-23>
13. da Silva Romero, Renata A., Siqueira F., Santiago G.G., de Almeida Regitano L.C., de Souza Júnior M.D., de Almeida Torres Júnior R.A., Nascimento A.V., Grisolia A.B. Prospecting genes associated with navel length, coat and scrotal circumference traits in Canchim cattle // *Livestock Science*. 2018. Vol. 210. P. 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.02.004>
14. Pan X., Gong W., He Y., Li N., Zhang H., Zhang Z., Li J., Yuan X. Ovary-derived circular RNAs profile analysis during the onset of puberty in gilts // *BMC genomics*. 2021. Vol. 22. P. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07786-w>
15. Seo J., Kim J., Kim M. Cloning of androgen-inducible gene 1 (AIG1) from human dermal papilla cells // *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*. 2001. Vol. 11. N 1.
16. Chen S.Y., Schenkel F.S., Melo A.L., Oliveira H.R., Pedrosa V.B., Araujo A.C., Melka M.G., Brito L. F. Identifying pleiotropic variants and candidate genes for fertility and reproduction traits in Holstein cattle via association studies based on imputed whole-genome sequence genotypes // *BMC genomics*. 2022. Vol. 23. N 1. P. 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08555-z>
17. Posbergh C.J., Thonney M.L., Huson H.J. Genomic approaches identify novel gene associations with out of season lambing in sheep // *Journal of Heredity*. 2019. Vol. 110. N 5. P. 577–586. <https://doi.org/10.1093/jhered/esz014>
18. Häfliger I.M., Seefried F.R., Spengeler M., Drögemüller C. Mining massive genomic data of two Swiss Braunvieh cattle populations reveals six novel candidate variants that impair reproductive success // *Genetics Selection Evolution*. 2021. Vol. 53. P. 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12711-021-00686-3>
19. Liu Y., Chen J., Chian R.C. Beyond Survival Effects of Vitrification-Warming on Epigenetic Modification and Maternal Transcripts of Oocytes // *Embryology Update*. 2022. DOI: 10.5772/intechopen.107073
20. Namgoong S., Kim N.H. Meiotic spindle formation in mammalian oocytes: implications for human infertility // *Biology of Reproduction*. 2018. Vol. 98. N 2. P. 153–161. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox145>
21. Blengini C.S., Schindler K. Acentriolar spindle assembly in mammalian female meiosis and the consequences of its perturbations on human reproduction // *Biology of Reproduction*. 2022. Vol. 106. N 2. P. 253–263. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox210>
22. So C., Seres K.B., Steyer A.M., Mönnich E., Clift D., Pejkovska A., Schuh M.A. liquid-like spindle domain promotes acentrosomal spindle assembly in mammalian oocytes // *Science*. 2019. Vol. 364. N 6447. P. eaat9557. DOI: 10.1126/science.aat9557
23. Qiao J., Wang S., Zhou J., Tan B., Li Z., Zheng E., Cai G., Wu Z., Hong L., Gu T. ITGB6 inhibits the proliferation of porcine skeletal muscle satellite cells // *Cell Biology International*. 2022. Vol. 46. N 1. P. 96–105. <https://doi.org/10.1002/cbin.11702>
24. Voisin N. Identification Of New Genetic Causes Of Syndromic Intellectual Disability: дис. — Université de Lausanne, Faculté de biologie et médecine. 2019.
25. Merdignac C., Clément A. E., Montfort J., Murat F., Bobe J. autS2 Features and Expression Are Highly Conserved during Evolution Despite Different Evolutionary Fates Following Whole Genome Duplication // *Cells*. 2022. Vol. 11. N 17. P. 2694. <https://doi.org/10.3390/cells11172694>
26. Lu Z. Y., Chen P. B., Xu Q. Y., Li B., Jiang S. D., Jiang L. S., Zheng X. F. Constitutive and conditional gene knockout mice for the study of intervertebral disc degeneration: Current status, decision considerations, and future possibilities // *JOR spine*. 2023. Vol. 6. N 1. P. e1242. <https://doi.org/10.1002/jsp2.1242>

© Романец Елена Андреевна (lena9258@mail.ru); Гетманцева Любовь Владимировна (lonaluba@mail.ru);

Радюк Анастасия Владимировна (cool.kapito2012@yandex.ru); Романец Тимофей Сергеевич (timofey_8877@mail.ru);

Мишина Арина Игоревна (amishina@csprfmba.ru); Коробейникова Анна Васильевна (aanaaiich@yu.ru); Кабиева Шаунат Шамильевна (dhuannna@mail.ru);

Алексеев Александр Анатольевич (sachaalekseev88@gmail.com); Бакоев Сирождин Юсуфович (siroj1@yandex.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»