УДК: 575.162
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.480

КАНДИДАТНЫЕ ГЕНЫ СВЯЗАННЫЕ С КАЧЕСТВОМ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ

Щербаков Ю.С. – канд. биол. наук, лаборатория молекулярной генетики (ORCID 0000-0001-6434-6287); **Никиткина Е.В.**[*] – канд. биол. наук, лаборатория биологии развития (ORCID 0000-0002-8496-5277); **Дементьева Н.В.** – канд. биол. наук, лаборатория молекулярной генетики (ORCID 0000-0003-0210-9344)

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»

[*]nikitkinae@mail.ru

***Ключевые слова**: Equuscaballus, жеребцы, SNP, секвенирование, сперма*
***Keywords:** Equus caballus, stallions, SNP, sequencing, sperm*
***Финансирование:** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки, проект № 124020200114-7*

Поступила:11.11.2024 **Принята к публикации: 02.12.2024**
Опубликована онлайн:16.12.2024

РЕФЕРАТ

Определение генетических замен, влияющих на плодовитость мужских особей привлекает внимание многих исследователей. Однако, в настоящее время в России недостаточно внимания уделяется изучению и использованию полученных генетических данных, связанных с качеством спермы животных. В результате GWAS анализа в 2022 год были определены маркерные однонуклеотидные полиморфизмы и предложены кандидатные гены *GRM8, FSHR, INHA, IMMP1L*. Была поставлена задача секвенировать кандидатные локусы, для выявления полиморфизмов, определяющих формирование признаков, связанных с качеством спермы для разработки программ маркерной селекции и геномного редактирования. В результате проведенного исследования был обнаружен ряд однонуклеотидных полиморфизмов в генах *GRM8, FSHR, INHA, IMMP1L*. После проведенного анализа было обнаружено влияние обнаруженных SNP в гене GRM8 на качество спермы у жеребцов различных пород.Также на основании полученных SNP расположенных в гене *GRM8* была построена дендрограмма. В результате анализа полученной дендрограммы выборка жеребцов разделилась на 2 основные ветви. Сперма жеребцов левой ветви превосходила (была лучше) жеребцов правой по таким показателям как объем, концентрация, общая подвижность, стимуляции дыхательной активности 2,4 ДНФ при оценке после получения и криоконсервации (на 3,28 мл, на 9,62 млн/мл, на 3,6%, на 0,16 и 0,46 соответственно). Однако особи правой ветви превосходят образцы особей другой ветви по показателям прогрессивная подвижность свежей спермы, прогрессивная подвижность после оттаивания (на 18,44% и на 1,54% соответственно). Получены новые знания о генетическом полиморфизме экзонных областей генов *GRM8, FSHR, INHA, IMMP1L* у жеребцов различных пород (арабская, ганноверская, тракененская, французская рысистая, советская тяжеловозная и ахалтекинская).

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

В ходе процесса формирования промышленных популяций сельскохозяйственных животных, генетическое разнообразие определяет наилучшую приспособленность к используемой технологии разведения. У некоторых видов животных долгое время применялась естественная случка. Искусственное осеменение охлажденной спермой у жеребцов важно для повышения эффективности воспроизводства. Фенотипическая изменчивость свежей и охлажденной спермы важна для отбора производителей. Важно отметить, что качество спермы и криоустойчивость спермы жеребцов имеют высокую индивидуальную изменчивость, которая зависит как от экологических, так и от генетических факторов. На сегодняшний день в коневодстве широко используется искусственное осеменение, а процедура замораживания не всегда экономически обоснована, поэтому высокое качество охлажденной спермы имеет важное значение [1-4].

Определение генетических замен, влияющих на плодовитость мужских особей привлекает внимание многих исследователей. Обнаружено много локусов, играющих важную роль у лошадей [5-6], крупного рогатого скота [7-8], птицы [9]. Однако, в настоящее время в России недостаточно внимания уделяется изучению и использованию полученных генетических данных, связанных с качеством спермы животных.

В результате GWAS анализа, проведенного нами в 2022 году, были определены маркерные однонуклеотидные полиморфизмы и предложены кандидатные гены *GRM8, FSHR, INHA, IMMP1L*. Была поставлена задача секвенировать кандидатные локусы, для выявления полиморфизмов, определяющих формирование признаков, связанных с качеством спермы для разработки программ маркерной селекции и геномного редактирования.

Цель исследования – проведение поиска полиморфизмов в регуляторных и кодирующих регионах кандидатных генов, связанных с показателями качества спермы у жеребцов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Материалом для исследования явились образцы ДНК, выделенные из спермы жеребцов (n= 28).

Оценка подвижности спермы была проведена глазомерно и с помощью специализированной компьютерной программы CASA, морфология набором Diff-Quick и CASA, целостность мембран – флуоресцентным методом с красителями этидиум бромид или пропидиумиодит и CASA, дыхательную активность – полярографическим методом, с помощью тестирующего вещества – 2,4 динитрофенол (2,4 ДНФ). Собранный биологический материал (сперма) был оценен по качеству до и после замораживания каждого эякулята.

Определенные в результате GWAS-анализа локусы были прогенотипированы с использованием метода таргетного секвенирования по Сэнгеру. Подбор праймеров для анализа с помощью ПЦР и для дальнейшего секвенирования проводился с помощью онлайн-инструмента BLAST в рабочем пространстве международной базы генетических данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). ПЦР проводили на ThermalCycler T100 (Bio-Rad, США). Протокол проведения ПЦР включал в себя: амплификацию методом ПЦР на амплификаторе ThermalCycler T100 (Bio-Rad, США) в следующем режиме: 95°C– 3 мин., 40 циклов 95°C – 30 сек., 60°C – 20 сек., 72°C - 20 сек и финальная элонгация 72°C – 4 минуты. ПЦР-продукт проверяли в камере горизонтального электрофореза в 1,8% агарозном геле в буфере 0,5xTBE.

Пробоподготовка амплифицированных фрагментов включала в себя ферментативную очистку с помощью коммерческого набора реагентов ExoSAP-IT (TermoFisher, USA), который обеспечивает простой способ ферментативной очистки реакции ПЦР в один этап. Затем проводили пресеквенирующую ПЦР с меченными нуклеотидами и коммерческим набором KitBigDye® Terminator v3.1 Se-

quencingStandardKit (AppliedBiosystems) либо Российскими аналогами фирмы Синтол согласно протоколу производителя. Секвенирование по Сенгеру было проведено на генетическом анализаторе AppliedBiosystems 3500 GeneticAnalyzer (ThermoFisher, USA), количество покрытий составило по 2 в каждую сторону. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовался программный пакет MEGA X (https://www megasoftware.net). Построение дендрограммы также осуществлялось в программе мега X, методом «Сети-Соседей». Выравнивание проводилось на референсный геном EquCab3.0. Биометрическая обработка данных будет выполнена с помощью программы MicrosoftExcel. Анализ PCA (анализ главных компонент) был проведен с использованием программы Plink 1.9, визуализация полученных результатов была проведена с использованием библиотеки R ggplot2. Статистический анализ проводили в программе IBM SPSS Statistics 19.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В результате проведенного поиска insilico были подобранны специфичные три пары праймеров к кодирующим участкам генов обнаруженные ранее в результате GWAS анализа (Таблица 1).

В результате секвенирования было обнаружено 29 SNP в кодирующих областях исследуемых генов (GRM8 – 4 SNP, FSHR – 23 SNP, INHA 2 SNP, IMMP1L).

На основании полученных SNP было сделан PCA анализ (рисунок 1 и 2).

В результате анализа PCA, два жеребца по первой компоненте отделились от основного кластера, одна особь советской тяжеловозной и один жеребец породы французской рысистой. Однако по качеству спермы данные жеребцы не выделялись.

Также на основании полученных SNP расположенных в гене GRM8 была построена дендрограмма (Рисунок 3).

Фенотипические показатели спермы жеребцов представлены в таблице 2.

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для гена

Название	Праймеры	Длина фрагмента п.н.	Температура отжига ºС
GRM8	F: GGTCGATCGCATAAAGCATGG R: TTCTGCTACAGGGCTGACTTC	504	60
FSHR	F: ACGTGACTACAGTTAAGCCCC R: GTGTGCATCAGCCTCTGGTAT	510	60
INHA	F: ATCGGTGAAGCCACTTCAGG R: CAGCTTCCCGCCAGATACAT	540	60
IMMP1L	F: ATTAACAGGGCTTTTTGTGCCC R: TAACCACGTAGTGAAAGGAGACA	686	60

Таблица 2 – Распределение фенотипических показателей спермы жеребцов по двум ветвям дендрограммы

Показатель	Левая Ветвь	Правая ветвь
Объём, мл	48±15,13	44,72±6,03
Концентрация, млн/мл	213,67±50,53	204,05±18,34
Прогрессивная подвижность, %	32,67±9,06	51,11±4,24
Прогрессивная подвижность после оттаивания, %	24,86±10,06	26,40±4,75
Общая подвижность после оттаивания, %	43,78±19,10	40,18±6,76
Стимуляция 2,4 ДНФ	2,3±0,21	2,14±0,12
Стимуляция 2,4 ДНФ после оттаивания	1,88±0,30	1,42±0,13

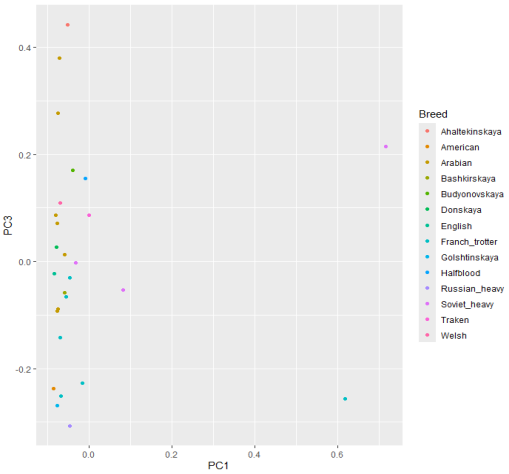

Рисунок 1 – График анализа главных компонент исследуемых жеребцов (Первая и третья компоненты).

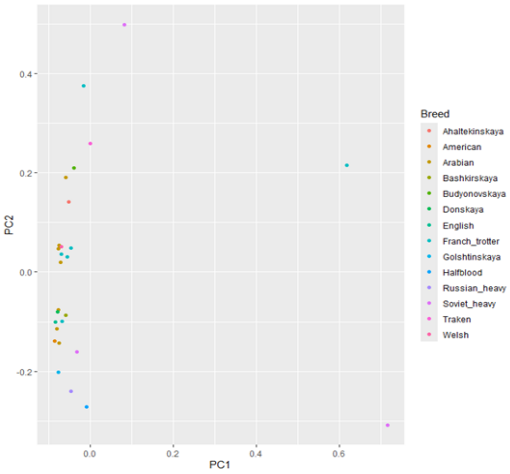

Рисунок 2 – График анализа главных компонент исследуемых жеребцов (Первая и вторая компоненты).

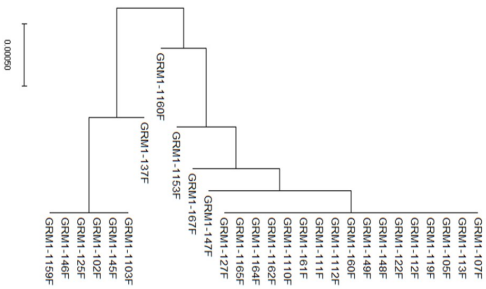

Рисунок 3 – Дендрограмма «Сети-Соседей» построенная на основании SNP обнаруженных в гене GRM8.

В результате анализа полученной дендрограммы выборка жеребцов разделилась на 2 основные ветви. Сперма жеребцов левой ветви имела лучшие показатели по таким показателям как объем, концентрация сперматозоидов в эякуляте, общая подвижность, стимуляции дыхательной активности 2,4 ДНФ свежей спермы и после криоконсервации (на 3,28 мл, на 9,62 млн/мл, на 3,6%, на 0,16 и 0,46 соответственно). Однако особи правой ветви превосходят особей другой ветви по показателям прогрессивная подвижность свежей спермы, прогрессивная подвижность после оттаивания (на 18,44% и на 1,54% соответственно). По остальным SNP в других генах дендрограмму не удалось построить т.к. различия по тем SNP жеребцы были минимальными.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В результате проведенного исследования было выявлено, что 4 выявленных SNP в гене *GRM8* оказывают влияние на качество спермы у жеребцов. Кроме того, были исследованы гены *FSHR, INHA, IMMP1L* о которых были получены новые знания о однонуклеотидных полиморфизмах. Полученные данные могут быть использованы в селекции при отборе производителей с хорошим сперматогенезом или криорезистентностью спермы. При выборе производителя и способа случки или искусственного осеменения охлажденной или криоконсервированной спермой может учитываться генотип.

CANDIDATE GENES ASSOCIATED WITH STALLION SPERM QUALITY

Shcherbakov Yu.S. – Ph.D. biological sciences,laboratory of molecular genetics (ORCHID 0000-0001-6434-6287)**; Nikitkina E.V**.* – Ph.D. biological sciences, laboratory of developmental biology (ORCHID 0000-0002-8496-5277); **Dementieva N.V.** – Ph.D. biological sciences, laboratory of molecular genetics (ORCHID 0000-0003-0210-9344)

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

*nikitkinae@mail.ru

Funding: *The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science, project No. 124020200114-7*

ABSTRACT

The identification of genetic substitutions affecting the malefertility attracts the attention of many researchers. However, in Russia, insufficient attention is currently paid to the study and use of the obtained genetic data related to the quality of animal sperm. As a result of GWAS analysis in 2022, marker single nucleotide polymorphisms were identified and candidate genes *GRM8, FSHR, INHA, IMMP1L* were proposed. The task was to sequence candidate loci to identify polymorphisms that determine the formation of traits associated with sperm quality for the development of marker selection and genome editing programs. As a result of the study, a number of single nucleotide polymorphisms were found in the *GRM8, FSHR, INHA, IMMP1L* genes. After the analysis, the effect of the detected SNPs in the *GRM8* gene on sperm quality in stallions of various breeds was discovered. Also, based on the obtained SNPs located in the *GRM8* gene, a dendrogram was constructed. As a result of the analysis of the obtained dendrogram, the stallion sample was divided into 2 main branches. Stallions of the left branch are superior to stallions of the right in terms of volume, sperm concentration, total motility, stimulation of respiratory activity 2.4 DNF of fresh sperm and after cryopreservation (by 3.28 ml, by 9.62 million/ml, by 3.6%, by 0.16 and 0.46, respectively). However, individuals of the right branch are superior to individuals of the other branch in terms of progressive motility of fresh sperm, progressive motility after thawing (by 18.44% and by 1.54%, respectively). New knowledge was obtained about the genetic polymorphism of exonic regions of the *GRM8, FSHR, INHA, IMMP1L* genes in stallions of different breeds.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1.Loomis P.R. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols /P.R. Loomis, J.K Graham //AnimReprod Sci. - 2008. - №105. - C. 119–128. doi: 10.1016/ j.anireprosci.2007.11.010.

2.Hoffmann N.Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified ‘good’ or ‘poor’ for freezing / N. Hoffmann, H. Oldenhof, C. Morandini, K. Rohn, H. Sieme // AnimReprod Sci. - 2011. - №125 - C. 112–118. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.03.001

3.Gottschalk M.Genome-wide association study for semen quality traits in German Warmblood stallions / M. Gottschalk, J. Metzger, G. Martinsson, H. Sieme, O. Distl //AnimReprod Sci. - 2016.- №171. - C. 81–86. doi: 10.1016/ j.anireprosci.2016.06.002.

4.Atroshchenko M.M.Reproductive Characteristics of Thawed Stallion Sperm / M.M. Atroshchenko, E. Arkhangelskaya, D.A. Isaev, S.B. Stavitsky, A.M. Zaitsev, V.V. Kalaschnikov, S. Leonov, A.N. Osipov// Animals (Basel). - 2019. -№ 9(12). – C.1099. doi: 10.3390/ani9121099.

5.Schrimpf R.Screening of whole genome sequences identified high-impact variants for stallion fertility./ R.Schrimpf, M. Gottschalk, J. Metzger, G. Martinsson, H. Sieme, O.Distl //BMC Genomics. - 2016. - №.1. - C. 288. doi: 10.1186/s12864-016-2608-3.

6.Schrimpf R.Implication of FKBP6 for male fertility in horses / R. Schrimpf, J. Metzger, G. Martinsson, H. Sieme, O.Distl//

ReprodDomest Anim. - 2015. - № 50(2). - С.195-199. doi: 10.1111/rda.12467.
7.Gao Q.Association of TNP2 gene polymorphisms of the bta-miR-154 target site with the semen quality traits of Chinese Holstein bulls/ Q. Gao, Z. Ju, Y. Zhang, J. Huang, X. Zhang, C. Qi, J. Li J, J. Zhong, G. Li, C. Wang // PLoS One. - 2014. - №. 9(1) – С. e84355. doi: 10.1371/ journal.pone.0084355.
8. Zhang S.The g.-165 T>C Rather than Methylation Is Associated with Semen Motility in Chinese Holstein Bulls by Regulating the Transcriptional Activity of the HIBADH Gene/S. Zhang, Y. Zhang Y, C. Yang, Z. Ju, X. Wang, Q. Jiang, Y. Sun, J. Huang, J. Zhong, C. Wang // PLoS One. - 2015. - С. 10(7). – С. e0127670. doi: 10.1371/journal.pone.0127670.
9.Sarabia Fragoso J. Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels) / J. Sarabia Fragoso J, M. Pizarro Díaz, J.C. Abad Moreno, P. Casanovas Infesta, A. Rodriguez-Bertos, K. Barger //ReprodDomest Anim. - 2013. - №. 48(2). - С. 345-52. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02161.x.

REFERENSES

1.Loomis P.R.Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols /P.R. Loomis ,J.K Graham //AnimReprod Sci.2008:105:119–128. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.010.
2.Hoffmann N.Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified ‘good’ or ‘poor’ for freezing / N. Hoffmann, H. Oldenhof, C. Morandini, K. Rohn, H. Sieme // AnimReprod Sci.2011:125:112–118. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.03.001.
3.Gottschalk M.Genome-wide association study for semen quality traits in German Warmblood stallions / M. Gottschalk, J. Metzger, G. Martinsson, H. Sieme, O. Distl //AnimReprod Sci.2016: 171:81–86. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.06.002.
4.Atroshchenko M.M.Reproductive Characteristics of Thawed Stallion Sperm / M.M. Atroshchenko, E. Arkhangelskaya, D.A. Isaev, S.B. Stavitsky, A.M. Zaitsev, V.V. Kalaschnikov, S. Leonov, A.N. Osipov// Animals (Basel).2019:9(12):1099. doi: 10.3390/ani9121099.
5.Schrimpf R.Screening of whole genome sequences identified high-impact variants for stallion fertility./ R.Schrimpf, M. Gottschalk, J. Metzger, G. Martinsson, H. Sieme, O.Distl //BMC Genomics. - 2016. - №.1. - С. 288. doi: 10.1186/s12864-016-2608-3.
6.Schrimpf R.Implication of FKBP6 for male fertility in horses / R. Schrimpf, J. Metzger, G. Martinsson, H. Sieme, O.Distl// ReprodDomest Anim. 2015:50(2):195-199. doi: 10.1111/rda.12467.
7.Gao Q.Association of TNP2 gene polymorphisms of the bta-miR-154 target site with the semen quality traits of Chinese Holstein bulls/ Q. Gao, Z. Ju, Y. Zhang, J. Huang, X. Zhang, C. Qi, J. Li J, J. Zhong, G. Li, C. Wang // PLoS One.2014: 9(1):e84355. doi: 10.1371/journal.pone.0084355.
8. Zhang S.The g.-165 T>C Rather than Methylation Is Associated with Semen Motility in Chinese Holstein Bulls by Regulating the Transcriptional Activity of the HIBADH Gene/S. Zhang, Y. Zhang Y, C. Yang, Z. Ju, X. Wang, Q. Jiang, Y. Sun, J. Huang, J. Zhong, C. Wang // PLoS One.2015:10(7):e0127670. doi: 10.1371/ journal.pone.0127670.
9.Sarabia Fragoso J. Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels) / J. Sarabia Fragoso J, M. Pizarro Díaz, J.C. Abad Moreno, P. Casanovas Infesta, A. Rodriguez-Bertos, K. Barger //ReprodDomest Anim. 2013:48(2):345-52. doi: 10.1111/ j.1439-0531.2012.02161.x.