

- developmental capacity of bovine oocytes in vitro / J. L. Leroy, T. Vanholder, B. Mateusen, A. Christophe, G. Opsomer, A. de Kruif, G. Genicot, A. Van Soom // *Reproduction*. - 2005. - Vol. 130, № 4. - P. 485-495.
10. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential / S. Matoba, K. Bender, A. G. Fahey, S. Mamo, L. Brennan, P. Lonergan, T. Fair // *Reproduction, Fertility and Development*. - 2014. - Vol. 26, № 2. - P. 37-45.
11. Molecular methods for selection of the ideal oocyte / P. Patrizio, E. Fragouli, V. Bianchi, A. Borini, D. Wells // *Reproductive Biomedicine Online*. - 2007. - Vol. 15. - P. 346-353.
12. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics / A. Revelli, L. Delle Piane, S. Casano, E. Molinari, M. Massobrio, P. Rinaudo // *Reproductive Biology and Endocrinology*. - 2009. - № 7(1). - P. 340-344.
13. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization / J. S. Richards, D. L. Russell, R. L. Robker, M. Dajee, T. N. Alliston // *Molecular Cellular Endocrinology*. - 1998. - Vol. 145, № 1. - P. 47-54.
14. Lipid and protein metabolism along with oxidative status of follicular fluid throughout the estrous cycle in Anatolian water buffalo / O. Yilmaz, J. J. Jaroszewski, A. Bblbl, M. Uzar // *Turkish J. of Veterinary and Animal Sciences*. - 2016. - Vol. 40. - P. 181-188.

УДК 636.03.033.636.2.034.575.162

ОЦЕНКА КОРОВ ГОЛШТИНИЗИРОВАННОЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ ПО ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНА FSHR

Позовникова М. В. (ВНИИГРЖ филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, лаборатория молекулярной генетики), Ротарь Л.Н. (ФГБНУ ВО СПбГАУ, кафедра генетики, разведения и биотехнологии животных)

Ключевые слова: Молочный скот, молочная продуктивности, ген FSHR, ооцит-кумулюсный комплекс, морфология ооцитов

Keywords: Dairy cattle, milk yield, FSHR gene, cumulus-oocyte complex, oocytes morphology.



РЕФЕРАТ

Фертильность коров – это полигенный признак, развитие которого определяется сложным взаимодействием различных генов и факторов внешней среды. Целью нашей работы было изучить у коров полиморфизм гена FSHR в 10-м экзоне и проанализировать связь его аллельных вариантов с продуктивными и репродуктивными показателями, а также с качеством и количеством ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), полученных postmortem. В данном исследовании было проанализировано 69 коров черно-пестрой голштинизированной породы и 138 яичников полученных postmortem от данных животных. Биологический материал был собран в период 2017-2018 гг.

Показатель плодовитости коров является одним из важнейших, определяющих уровень селекционно-племенной и хозяйственной деятельности сельхозпредприятий. Так как признаки молочной продуктивности и фертильность коров находятся в отрицательной корреляции, в нашей работе мы проанализи-

ровали не только ряд хозяйственно ценных признаков, но и изучили репродуктивный потенциал высокопродуктивных коров черно-пестрой голштинизированной породы. В анализируемой выборке (n=69 голов или 138 яичников) определено 3 генотипа гена рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR) CC (52 головы), CG (13 голов) и GG (4 головы). Отмечена тенденция по снижению племенной ценности (ПЦ) по удою, молочному жиру и белку от генотипа CC к генотипу GG. Выявлена слабая положительная корреляция по признакам ПЦ удою и молочному жиру с общим выходом ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) (коэффициент корреляции 0,164 и 0,108 соответственно). По результатам исследования можно сделать вывод о том, что ген FSHR у крупного рогатого скота не достаточно отражает количественные и качественные характеристики ОКК полученных из яичников *postmortem*.

ВВЕДЕНИЕ

Фертильность коров – это полигенный признак, развитие которого определяется сложным взаимодействием различных генов и факторов внешней среды. В настоящее время в высокопродуктивных стадах коров наблюдается стойкая отрицательная корреляция между признаками воспроизводства и молочной продуктивности, что как правило связывают с односторонней селекцией по удою, без учета репродуктивного здоровья животных. Метаболические нарушения в раннем послеродовом периоде у высокопродуктивных коров могут вызывать нарушение функции яичников, что проявляется в снижении качества ооцитов. Плохое качество ооцита может стать причиной снижения оплодотворяемости животных, и/или неправильного развития эмбриона и как следствие – эмбриональные потери [6,7]. Известно, что признаки молочной продуктивности и фертильность коров находятся в отрицательной корреляции. Поэтому целесообразно использование в селекционных программах ДНК-маркеров молочной продуктивности и репродуктивных качеств [1]. Одним из потенциальных генов-кандидатов репродуктивного здоровья коров может являться ген рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR) [9]. Рецепторы FSHR расположенные в половых железах, играют важную роль в репродуктивной физиологии [3]. В гене FSHR было обнаружено несколько полиморфных сайтов, и у молочного скота были описаны значительные ассоциации между вариантами FSHR, молочной продуктивностью и фертильно-

стью [10,11]. В работе Caixeta E. S. et al., [3] рекомендовано рассматривать ген FSHR как маркер компетентности ооцит-кумулюсных комплексов коров. Ген FSHR расположен в 11 хромосоме крупного рогатого скота, и его структура определяется 10 экзонами и 11 интронами; первые 9 экзонов включают внеклеточный домен, тогда как экзон 10 включает трансмембранный домен [4].

Целью нашей работы было изучить у коров полиморфизм гена FSHR в 10-м экзоне и проанализировать связь его аллельных вариантов с продуктивными и репродуктивными показателями, а также с качеством и количеством ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), полученных *postmortem*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данном исследовании было проанализировано 69 коров черно-пестрой голштинизированной породы и 138 яичников полученных *postmortem* от данных животных. Биологический материал был собран в период 2017-2018 гг. Яичники извлекали из туши сразу после убоя методом оварэктомии. В течение часа материал доставлялись в лабораторию при температуре 37°C в 0,9% растворе NaCl. Из исследования исключались яичники с патологией (полное отсутствие видимых фолликулов, кисты). После удаления остатков яйцеводов и трехкратного промывания яичников в 0,9% NaCl, проводили их резекцию с целью выделения ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) и подготовки препарата овариальной ткани для выделения образцов ДНК. Морфологиче-

скую оценку ОКК проводили с использованием стереоскопического микроскопа при увеличении $\times 28$. Ооцит-кумулясные комплексы, окруженные 1 и более слоев кумулюса, равномерную по ширине зону пеллюцида (ZP), гомогенную серую ооплазму, размер 110-120 мкм – оценивались как жизнеспособные или морфологически полноценные. Ооциты без кумулюса или имеющие кумулюс с признаками дегенерации, с неравномерной или расширенной ZP, черной или бесцветной ооплазмой, деформированные были определены как нежизнеспособные. Показатели характеризующие популяцию ооцит-кумулясных комплексов: общее количество ОКК, ОКК среднее на один яичник, количество жизнеспособных ОКК, среднее количество жизнеспособных ОКК на один яичник.

Генотипирование животных проводили методом полимеразной цепной реакции и полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). ПЦР-анализ проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1,5 мМ MgCl₂, 50 мкМ dNTP смесь, 0,2 мкМ каждого праймера, 1 × буфер для ПЦР, 2 U Taq-полимеразы и 50 нг матрицы геномной ДНК. Для выявления генотипов FSHR использовались праймеры (ООО «Синтол», Россия): прямой: 5'-CTG CCT CCC TCA AGG TGC CCC TC3' и обратный 5'AGT TCT TGG CTA AAT GTC TTA GG GGG3' [4]. Размер полученного ампликона составлял 306 п.н. Далее образцы обрабатывали эндонуклеазой рестрикции AluI в течение 2-х часов при 37° (ООО «Сибэнзим», Россия). Генотипу CC соответствовали фрагменты 243 и 63 п.н., генотипу CG – 243, 193, 63 и 50 п.н., генотипу GG – 193, 63 и 50 п.н.

Племенная ценность (ПЦ) коров по признакам молочной продуктивности, была рассчитана с помощью BLUPAnimalModel [5]. Данные о репродуктивных качествах коров (возраст первого плодотворного осеменения и продолжительность сервис-периода) получены из племенных карточек формы 2МОЛ. Статистическая обработка данных проводилась в программах AtteStat, MiX99 и RStudio.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По результатам генотипирования в анализируемой выборке животных преобладал генотип CC гена FSHR и его частота была определена на уровне 0,724. Только 13 голов являлись носителями гетерозиготного генотипа CG (0,218) и 4 головы – гомозиготного генотипа GG (0,058). Частота встречаемости аллеля С и G гена FSHR составила 0,833 и 0,167 соответственно. Анализ эмпирического и теоретического распределения генотипов по методу Харди-Вайнберга не выявил нарушения генного равновесия ($\chi^2=3,47$; $Ne_{cr}=0,278$).

Анализ связи различных генотипов гена FSHR с рядом хозяйственно-ценных признаков показан в таблице 1. Хотя не было выявлено достоверных различий по анализируемым показателям, но можно отметить значительную тенденцию по снижению ПЦ по удою, молочному жиру и белку от генотипа CC к генотипу GG. При этом наиболее короткий сервис-период имели коровы с генотипом GG.

Был проведен анализ качественных и количественных показателей ОКК в зависимости от генотипа по гену FSHR (таблица 2). Менее благоприятным оказался генотип GG гена FSHR. У особой данной группы наблюдался наименьший выход и жизнеспособных ОКК и общее количество ОКК. Но достоверных различий между генотипами определено не было.

Далее нами была изучена корреляционная связь между показателями ПЦ по молочной продуктивности и качественными и количественными характеристиками ОКК. В результате анализа данных нами выявлена слабая положительная корреляция по признакам ПЦ удою и молочному жиру с общим выходом ОКК (коэффициент корреляции 0,164 и 0,108 соответственно). В исследованиях Satara, R. A. et al. [8] также не определено значимого влияния гена FSHR на компетентность ооцитов. Вероятно, что ген FSHR может являться прогностическим признаком результатов стимуляции суперовуляции у самок крупного рогатого

Таблица 1

Показатели молочной продуктивности и репродуктивных качеств коров с различными генотипами гена *FSHR*

Показатель	Генотип		
	CC (n=43)	CG (n=13)	GG (n=4)
ПЦ удой, кг	100,4±40,6	54,9±62,6	41,5±113,0
ПЦ жир, кг	-14,7±1,3	-15,1±3,1	-20,4±3,0
ПЦ белок, кг	-22,4±0,8	-22,0±1,3	-25,3±2,1
Возраст 1-го осеменения, мес.	15,1±0,2	15,2±0,4	15,0±0,4
1-ая лактация сервис-период, дн.	138,4±15,1	126,4±30,0	97,6±17,8

Таблица 2

Количество ОКК у коров с различными генотипами гена *FSHR*

Показатель	Генотип			Всего (n=69)
	CC (n=50)	CG(n=15)	GG (n=4)	
Всего ОКК	795	239	46	1080
Всего жизнеспособных ОКК (% от всего ОКК)	360 (45,2)	89 (37,2)	15 (32,6)	464 (49,2)
Всего ОКК в среднем на 1 голову	15,9±1,5	15,9±2,5	11,5±3,9	15,6±1,2
Жизнеспособные ОКК в среднем на 1 голову	7,2±1,1	5,9±1,9	3,75±2,0	6,72±0,9

скота в технологии получения эмбрионов *in vivo*. Схожее предположение высказано Yang, W. С. о том, что аллельная структура гена, кодирующего *FSHR*, может коррелировать с суперовуляцией и скоростью зачатия у крупного рогатого скота [11].

ВЫВОДЫ

По итогам проведенного исследования можно сделать вывод о том, что ген *FSHR* крупного рогатого скота слабо отражает количественные и качественные характеристики ооцит-кумулюсных комплексов полученных из яичников *post-mortem*, и следовательно не может рассматриваться как маркер этих параметров.

Работа выполнена в рамках ГЗ №АААА-А18-118021590138-1.

ANALYSIS OF COWS OF HOLSTEINIZED BLACK AND WHITE BREED ON THE *FSHR* GENE POLYMORPHISM

M.V. Pozovnikova - laboratory of molecular genetics, "VNIIGRZH branch FGBU FNTS in honore L. K. Ernst ; **Rotar L.N.** - Department of animal genetics, breeding and biotechnology, FSBI VO "ShBGAV".

ABSTRACT

The fertility of cows is a polygenic trait, the development of which is determined by the complex interaction of various genes and environmental factors. The aim of our work was to study the polymorphism of the *FSHR* gene in exon 10 in cows and analyze the connection of its allelic variants with productive and reproductive parameters, as well as with the quality and quantity of oo-

cyte-cumulus complexes (CCM) (obtained from post mortem ovaries). The indicator of fertility of cows is one of the most important parameters, determining the level of breeding and economic wellness of agricultural enterprises. Since the signs of milk production and fertility of cows very often are in a negative correlation, in our work we analyzed not only a number of economically valuable features, but also studied the reproductive potential of highly productive cows of black-and-white Holstein breed. In the analyzed samples (n=69 cows or 138 ovaries) 3 genotypes were determined: FSHR gene: CC (52 cows), CG (13 cows) and GG (4 cows). There was a tendency of reduction of the breeding value (BV) for milk yield, milk fat and protein from the CC genotype to the GG genotype. A weak positive correlation was found on the signs of BV milk and milk fat with the total yield of oocyte-cumulus complexes (OCC) (correlation coefficient 0,164 and 0,108, respectively). According to the results of the study, we can conclude that the FSHR gene in cattle does not sufficiently reflect the quantitative and qualitative characteristics of OCC obtained from post mortem ovaries.

ЛИТЕРАТУРА

1. Племяшов, К. В. Молекулярные маркеры в повышении воспроизводства молочного скота / К. В. Племяшов, А. Ф. Яковлев // Генетика и разведение животных.- 2017.- № 4.- С. 3-11.
2. Chan, W. Molecular genetics, biochemical and clinical implications of gonadotropin receptor mutations / W. Chan // Molecular Genetics and Metabolism. - 1998. - Vol. 63. - P. 75-84.
3. Developing a genetic evaluation system for milk traits in Russian black and white dairy cattle / A. Kudinov, J. Juga, E. A. Mäntysaari, I. Strandén, E. I. Saksa, M. G. Smaragdov, P. Uimari // Agricultural and Food Science. - 2018. - Vol. 27. - P. 85-95.
4. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence / E. S. Caixeta, P. Ripamonte, M. M. Franco, J. B. Junior, M. A. N. Dode // Reproduction, Fertility and Development. - 2009. - V. 21, № 5. - P. 655-664.
5. Genotyping of follicle stimulating hormone receptor gene in fertile and infertile buffalo / A. S. A. Sosa, K. M. Mahmoud, M. M. M. Kandiel, M. F. Abouel-Roosand Nawito // Global Veterinaria. - 2015. - Vol. 15, № 2. - P. 163-168.
6. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility / J. L. M. R. Leroy, D. Rizos, R. Sturmey, P. Bossaert, A. Gutierrez-Adan, V. Van Hoeck, P. E. J. Bols // Reproduction, Fertility and Development. - 2011. - Vol. 24, N.1. - P.1-12.
7. Moussa, M. Maternal control of oocyte quality in cattle / M. Moussa., J. Shu, X. H. Zhang, F. Zeng // Animal reproduction science. - 2015. - Vol. 155. - P. 11-27.
8. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: Identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms / M. J. Simoni, W. Gromoll, A. Hoppner, T. Kamischke, D. Krafft, E. Sthle // Clinical Endocrinology and Metabolism. - 1999. - Vol. 84. - P. 750-755.
9. Polymorphisms in the 5' upstream region of the FSH receptor gene, and their association with superovulation traits in Chinese Holstein cows / W. C. Yang., S. J. Li, K. Q. Tang, G. H. Hua, C. Y. Zhang, J. N. Yu, L. G. Yang // Animal reproduction science. - 2010. - Vol.119, № 3. - 4. - P.172-177.
10. Satrapa, R. A. Effect of ovarian superstimulation on expression of genes associated with the oocyte developmental competence of nelore cows / R. A. Satrapa, E. Razza, A. G. Pupulim, C. Moraes Barros // Reproduction Fertility and Development. - 2012.-Vol. 25, N.1. - P. 255-261.
11. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues / A. Houde, A. Lambert, J. Saumande, D. W. Silversides, J. G. Lussier // Molecular Reproduction and Development. - 1994. - Vol. 39. - P. 127-135.