

Е. В. Никиткина, К. В. Племяшов, А. А. Мусидрай, А. А. Кудинов, А. А. Крутикова, Н. В. Дементьева

Поиск геномных ассоциаций с качеством спермы быков голштинской и черно-пестрой породы

Аннотация. Одним из важных факторов, влияющих на репродуктивный процесс является генотип животного. В последнее время активно ведутся исследования с целью выявления полиморфных участков генома ассоциированных с теми или иными признаками, которые возможно будет использовать в селекции. Целью работы был поиск геномных ассоциаций с качеством спермы быков голштинской и черно-пестрой породы. В наших исследованиях проведена оценка качества спермы 129 быков голштинской и черно-пестрой породы. Были выбраны наивысшие показатели спермопродукции каждого быка по зоотехническому учету ЗАО Невское. Были проанализированы данные за период не менее 3-х летнего использования каждого быка. Максимальный дуплетный объем эякулята варьировал от 3 до 27 мл, максимальная концентрация сперматозоидов в дуплетном эякуляте от 0,7 до 2 млрд/мл, общее количество сперматозоидов в эякуляте — от 2,7 до 26,4 млрд. Дополнительно исследовали морфологию, дыхательную активность и окислительное фосфорилирование, состояние мембран сперматозоидов. Наблюдалась индивидуальная изменчивость по количеству клеток с повреждениями в области хвоста и шейки (от 0,25 до 6%). Стимуляция дыхания сукцинатом калия в сперме исследуемых быков варьировала от 1,0 до 1,3 раз, что свидетельствует о разной степени нарушений проницаемости мембран. Не характерное для свежей спермы невысокое увеличение скорости дыхания клеток после стимуляции 2,4 ДНФ в 1,5 раз у некоторых быков возможно из-за нарушений сперматогенеза. Все исследуемые показатели имели индивидуальную изменчивость, что дает возможность провести поиск генетических ассоциаций с качеством спермы быков. Для проведения поиска геномных ассоциаций с качеством спермопродукции быков была сформирована база данных объединяющая генотипы, определенные на чипах Illumina Bovine IBDv3 и фенотипические признаки качества спермы. По таким показателям как объем дуплетного эякулята, подвижность и общее количество сперматозоидов в дуплетном эякуляте были найдены потенциальные SNP. По концентрации сперматозоидов потенциальных SNP найдено не было. Отбор по генетическому полиморфизму генов, используемых в роли маркеров, позволит выделять быков с хорошим сперматогенезом и качеством спермы в раннем возрасте, до начала физиологической зрелости и получения спермы.

Ключевые слова: быки, качество спермы, полногеномный скрининг, GWAS- анализ, SNP.

Авторы:

Елена Владимировна Никиткина — ведущий научный сотрудник, отдел воспроизводства с/х животных, кандидат биологических наук; e-mail: nikitkinae@mail.ru;

Кирилл Владимирович Племяшов — главный научный сотрудник, отдел воспроизводства с/х животных, доктор ветеринарных наук;

Артем Алексеевич Мусидрай — младший научный сотрудник, отдел воспроизводства с/х животных; e-mail: 13linereg@mail.ru;

Андрей Андреевич Кудинов — младший научный сотрудник, e-mail: kudinov_aa@list.ru;

Анна Алексеевна Крутикова — старший научный сотрудник, кандидат биологических наук; e-mail: anntim2575@mail.ru;

Наталья Викторовна Дементьева — ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук; e-mail: dementevan@mail.ru.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал ФГБНУ «ФНЦ животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 196601, Россия, Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское шоссе, 55а.

Введение. Одним из основных условий улучшения молочного скота является интенсивное использование лучших быков-производителей. Однако степень интенсивности их использования зависит от биологической полноценности и качества их спермы [1]. В связи с этим особую актуальность

приобретает совершенствование методов оценки качества эякулятов, позволяющих отбирать сперму для замораживания и изучения факторов, влияющих на воспроизводительную функцию животных. Одним из важных факторов, влияющих на репродуктивный процесс является генотип животного. В последнее время активно ведутся исследования с целью выявления полиморфных участков генома ассоциированных с теми или иными признаками, которые возможно будет использовать в селекции [2]. Интенсификация геномной технологии в мировой селекции животных и растений внесла огромные изменения в процесс отбора и успешно применяется в селекционных программах большинства стран [3]. Система полиморфных маркеров предоставляет уникальную возможность управлять генетической изменчивостью и ускорять генетический прогресс [4, 5]. Однако большинство исследований направлено на поиски генетических маркеров продуктивности. Поиск геномных ассоциаций GWAS (Genome-Wide Association Studies) с признаками фертильности позволит в дальнейшем вести отбор животных по этим показателям на геномном уровне. Геномная селекция позволит отбирать быков с хорошим сперматогенезом и качеством спермы в раннем возрасте, до начала использования для получения спермы.

Цель исследования — поиск геномных ассоциаций с качеством спермы быков.

Методы исследования. Проведена оценка качества спермы 129 быков от в возрасте от 15 мес. до 5 лет ОАО Невское. Были проанализированы данные зоотехнического учета и выбраны наивысшие значения за все время использования у каждого быка по таким показателям, как объем дуплетного эякулята, концентрация сперматозоидов, общее количество сперматозоидов, подвижность сперматозоидов. Морфология сперматозоидов оценивалась фазово-контрастной микроскопией после окраски Дифф-Квик. Дыхательную активность спермы оценивали на электроде Кларка с помощью тестирующих веществ — сукцинат калия и 2,4 динитрофенол (2,4 ДНФ). Для проведения поиска геномных ассоциаций с качеством спермопродукции быков была сформирована база данных объединяющая генотипы, определенные на чипах Illumina Bovine IBDv3 и фенотипические признаки качества спермы. Полногеномное генотипирование проводили с использованием чипов Illumina Bovine IBDv3. Далее проводился контроль качества генотипирования с помощью программы Plink 1.9. Удалялись SNP, если они не соответствовали следующим критериям: генотип определен у менее 95% особей, частота минорных аллелей ниже 0,01, а вероятность равновесия Харди-Вайнберга была менее $1e-4$, SNPs на половой хромосоме также

исключались из анализа. Проводилась импутация недостающих SNP с использованием программного обеспечения Beagle 4.1. Сканирование всего генома с учетом родословной выполнялось с использованием смешанного модельного подхода, реализованного в программном обеспечении EM-MAX. Эффект SNP рассчитывается с использованием следующей модели:

$Y = Xb + u + e$, где Y — вектор фенотипов, b — эффект SNP, X — матрица дизайна генотипов SNP, u — вектор аддитивных генетических эффектов, а e является вектором случайных остаточных эффектов.

Общегеномную значимость оценивали с использованием метода simpleM в R. Графики Манхэттена были получены из результатов GWAS с использованием пакета qqman в программном обеспечении R.

Результаты и обсуждение. Основными параметрами, характеризующими сперматогенез, являются — объем эякулята, концентрация сперматозоидов, общее количество сперматозоидов, подвижность. Также учитываются морфология клеток и функциональное состояние митохондрий. При оценке качества спермы по объему дуплетного эякулята, концентрации сперматозоидов, общему количеству и подвижности сперматозоидов проанализированы данные за период не менее 3-х летнего использования быков, а также быков, выбранных по низким показателям спермопродукции (табл. 1). Были выбраны наивысшие показатели спермопродукции каждого быка. Наивысшие показатели спермопродукции могут характеризовать потенциал сперматогенеза быков.

Из данных таблицы видно, что все показатели качества спермопродукции, кроме подвижности, характеризуются высокой индивидуальной изменчивостью. Максимальный дуплетный объем эякулята варьировал от 3 до 27 мл, максимальная концентрация сперматозоидов в дуплетном эякуляте от 0,7 до 2 млрд/мл, общее количество сперматозоидов в эякуляте — от 2,7 до 26,4 млрд. Такая вариабильность изучаемых признаков дает возможность предположить, что их формирование в процессе онтогенеза происходит под влиянием генетических факторов.

Дополнительно была проведена оценка спермы по морфологии и оценка дыхательной цепи сперматозоидов.

Наблюдались высокая индивидуальная изменчивость по количеству клеток с повреждениями в области хвоста и шейки (от 0,25 до 6%). Учитываемые повреждения были связаны с нарушением сперматогенеза — утолщенная шейка, отсутствие хвоста, укороченный хвост и др. Аналогичные из-

менения наблюдали в сперме жеребцов и других млекопитающих.

Центральное место в жизнедеятельности клеток занимают биохимические процессы, обеспечивающие получение аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) — окислительное фосфорилирование и гликолиз [6]. Одной из причин гибели клеток является нарушение переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий. Оценку дыхательной цепи митохондрий в сперматозоидах производили по реакции дыхания на добавление субстрата дыхания сукцината калия и 2,4-динитрофенала (2,4 ДНФ). Увеличение стимуляции дыхания сукцинатом калия происходит при повреждениях плазматической и митохондриальной мембран сперматозоидов и нарушениях их проницаемости. Уменьшение величины стимуляции дыхания 2,4 ДНФ является показателем возрастания свободного окисления, не связанного с окислительным фосфорилированием. Стимуляция дыхания сукцинатом калия в сперме исследуемых быков варьировала от 1,0 до 1,3 раз, что свидетельствует о разной степени нарушений проницаемости мембран. При стимуляции дыхания сукцинатом калия равной 1 повреждение мембран в клетках минимальны. Стимуляция дыхания 2,4 ДНФ варьировала от 1,5 до 3 раз. Не характерное для свежей спермы невысокое увеличение скорости дыхания клеток 2,4 ДНФ в 1,5 раз у некоторых быков возможно из-за наруше-

ний сперматогенеза. При этом в клетках разобщено дыхание и фосфорилирование.

Таким образом, все исследуемые показатели имели индивидуальную изменчивость, что дает возможность провести поиск генетических ассоциаций с качеством спермы быков.

Для GWAS анализа были выбраны быки с контрастными значениями показателей качества спермопродукции. По таким показателям как объем дуплетного эякулята, подвижность и общее количество сперматозоидов в дуплетном эякуляте были найдены потенциальные SNP.

По концентрации сперматозоидов не было найдено потенциальных SNP (рис. 1).

Закключение. Большинство найденных потенциальных SNP ассоциированных с качеством спермопродукции было локализовано на 4 хромосоме. По показателю объем эякулята было найдено 3 потенциальных SNP на 4, 5 и 6 хромосоме, по общему количеству сперматозоидов в дуплетном эякуляте — 2 потенциальных SNP на 1 и 4 хромосоме, по подвижности сперматозоидов 1 потенциальный SNP на 4 хромосоме. По концентрации сперматозоидов потенциальных SNP найдено не было. Отбор по генетическому полиморфизму генов, используемых в роли маркеров, позволит выделять быков с хорошим сперматогенезом и качеством спермы в раннем возрасте, до начала физиологической зрелости и получения спермы.

Таблица 1. Наивысшие показатели спермопродукции исследуемых быков

Показатель	n	$\bar{X} \pm m$	Min–Max	CV, %
Объем дуплетного эякулята, мл	129	16,6 $\pm$ 0,43	3–27	29,7
Концентрация сперматозоидов, млрд/мл	129	1,46 $\pm$ 0,02	0,7–2,0	15,3
Общее количество сперматозоидов, млрд	129	14,3 $\pm$ 0,68	2,7–26,4	35,0
Подвижность, %	129	86,0 $\pm$ 0,43	80–90	5,6

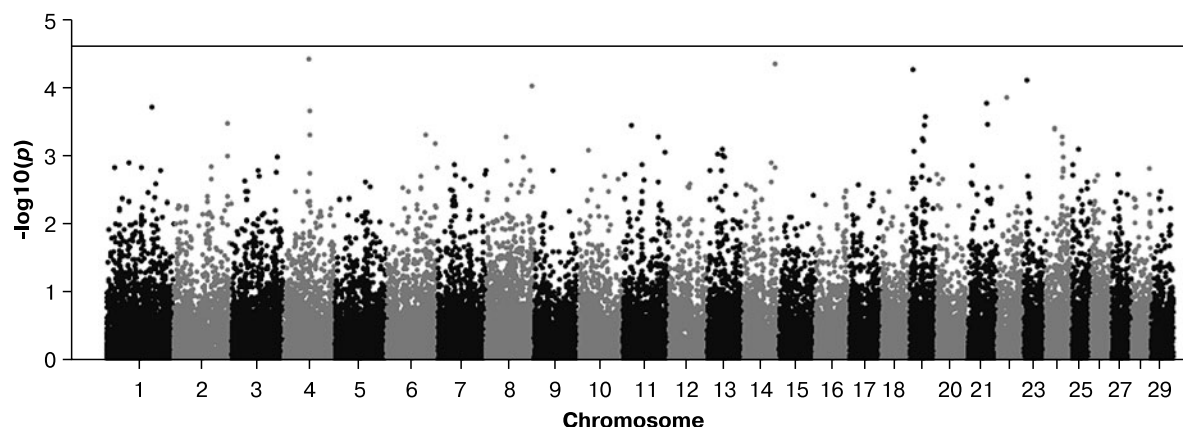


Рис. 1. График Манхеттена по показателю концентрация сперматозоидов

Работа подготовлена в рамках выполнения государственного задания,
номер учета НИОКТР: № АААА-А18-118021990006-9

Литература

1. Никиткина Е. В. Использование спермы быков с низкой концентрацией и активностью сперматозоидов для криоконсервации / Е. В. Никиткина, И. Ш. Шапиев // Достижения науки и техники АПК. — 2010. — № 7. — С. 49–51.
2. Яковлев А. Ф. Использование геномных данных в селекции птицы / А. Ф. Яковлев, Н. В. Дементьева // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2017. — Т. 21. — № 7. — С. 770–777.
3. Кудинов А. А. Выявление QTLs у молочного скота полногеномным ассоциативным анализом / А. А. Кудинов, М. Г. Смарагдов // Генетика и разведение животных. — 2018. — № 1. — С. 22–27.
4. Яковлев А. Ф. Значительное повышение точности оценки племенной ценности животных в молочном скотоводстве / А. Ф. Яковлев, М. Г. Смарагдов // Зоотехния. — 2011. — № 5. — С. 24.
5. Meuwissen T. H. Prediction of total genetic value using genomewide dense marker maps / T. H. Meuwissen, B. J. Hayes, M. E. Goddard // Genetics. — 2001. — № 157(4). — С. 1819–1829.
6. Moraes. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions / Moraes, Meyers. // Animal Reproduction Science. — 2018. — Т. 194. — С. 71–80.

Nikitkina E., Plemyashov K., Musidray A., Kudinov A., Krutikova A., Demetieva N.

Search for genomic associations with sperm quality of Holstein and Black and White bulls

Abstract. *One of the important factors affecting the reproductive process is the genotype of the animal. Recently, studies have been actively conducted to identify polymorphic parts of the genome associated with certain traits that may be used in breeding. The aim of the work was to search for genomic associations with sperm quality in bulls. In our studies, sperm quality assessment of 129 Holstein and black-and-white bulls was carried out. The highest sperm production rates of each bull according to the records of Nevskoye CJSC were selected. Data for a period at least 3 years of use of each bull were analyzed. The maximum doublet volume of the ejaculate varied from 3 to 27 ml, the maximum sperm concentration in the doublet ejaculate was from 0.7 to 2 billion/ml, the total number of spermatozoa was from 2.7 to 26.4 billion. Additionally, morphology, membranes, respiratory activity and oxidative phosphorylation of sperm were evaluated. Individual variability was observed in the number of cells with damage of tail and neck (from 0.25 to 6%). Stimulation of respiration by potassium succinate in the semen ranged from 1.0 to 1.3 times, which indicates a different degree of disturbance of membrane permeability. A non-characteristic for fresh sperm, a slight increase in the respiration rate by 2.4 DNP by 1.5 times in some bulls is possible due to impaired spermatogenesis. All the studied parameters were individual variability, which gives an opportunity to search for genetic associations with quality of bull semen. To search for genomic associations a database was formed combining genotypes identified on Illumina Bovine IBDv3 chips and phenotypic traits of sperm quality. Potential SNPs were found for the volume of the doublet ejaculate, motility and the total number of spermatozoa in the doublet ejaculate. No potential SNPs were found for sperm concentration. Selection by genetic polymorphism of genes used as markers will allow selection of bulls with good spermatogenesis and sperm quality at an early age, before physiological maturity and sperm production.*

Key words: bulls, sperm quality, genome-wide screening, GWAS analysis, SNP.

Authors:

Nikitkina E. — PhD (Biol. Sci.), senior researcher; e-mail: nikitkinae@mail.ru;

Plemyashov K. — Dr. Habil. (Vet. Sci.), leading research scientist;

Musidray A. — researcher; e-mail: 13linereg@mail.ru;

Kudinov A. — researcher; e-mail: kudinov_aa@list.ru;

Krutikova A. — PhD (Biol. Sci.), senior researcher; e-mail: anntim2575@mail.ru;

Dementieva N. — PhD (Biol. Sci.), senior researcher; e-mail: dementevan@mail.ru.

Russian research institute of farm animal genetics and breeding — branch of the L. K. Ernst Federal science center for animal husbandry; Russia, St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601.

References

1. Nikitkina E. V. The use of sperm of bulls with low concentration and sperm activity for cryopreservation / E. V. Nikitkina, I. Sh. Shapiev // Achievements of science and technology of the agro-industrial complex. — 2010. — № 7. — P. 49–51.
2. Yakovlev A. F. The use of genomic data in poultry breeding / A. F. Yakovlev, N. V. Dementieva // Vavilovsky Journal of Genetics and Breeding. — 2017. — V. 21. — №7. — P. 770–777.
3. Kudinov A. A. Detection of QTLs in dairy cattle by genome-wide associative analysis / A. Kudinov, M. Smaragdov // Genetics and animal breeding. — 2018. — №. 1. — P. 22–27.
4. Yakovlev A. F. A significant increase in the accuracy of assessing the breeding value of animals in dairy cattle breeding / A. F. Yakovlev, M. G. Smaragdov // Zootechnics. — 2011. — № 5. — P. 24.
5. Meuwissen T. H. Prediction of total genetic value using genome wide dense marker maps / T. H. Meuwissen, B. J. Hayes, M. E. Goddard // Genetics. — 2001. — № 157(4). — P. 1819–1829.
6. Moraes. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions / Moraes, Meyers // Animal Reproduction Science. — 2018. — V. 194. — P. 71–80.