

# Детекция и идентификация ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

**Михайлова М.Е., зав.лабораторией генетики животных**

к.б.н., доцент

Долматович Т.В., к.б.н., Киреева А.И., Романишко Е.Л.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

5-ти дневный теоретический и  
практический учебный семинар  
по лабораторной идентификации видов,  
скринингу живых измененных  
организмов и обнаружению патогенов  
растений  
12-16 февраля 2024 г.  
г.Минск

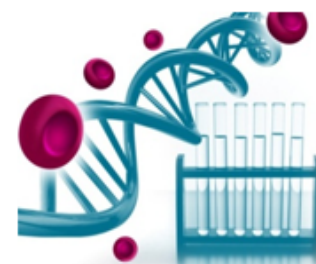


### **Цель исследования**

- ★ охарактеризовать генетическое разнообразие популяций лошадей, обитающих на территории Республики Беларусь, с помощью универсальных микросателлитных локусов и на основе полиморфизма митохондриальной ДНК;
- ★ охарактеризовать поголовье скота молочного направления по частоте встречаемости мутаций, детерминирующих снижение фертильности

### **Объект исследования**

- лошади белорусской упряжной породы и полесской популяции;
- белорусский красный скот.



## Аборигенные породы животных Беларуси

- К середине 70-х гг XX ст. в мире произошло резкое уменьшение численности локальных пород с.-х. животных, обладающих целым рядом ценных хозяйственно-полезных качеств, но не отличающихся высокой продуктивностью.
- Исчезло около 30 пород крупного рогатого скота в мире, в том числе 12 аборигенных пород стран бывшего СССР попали на грань исчезновения.
  - Являясь первоначальным и основным материалом при создании культурных пород, аборигенные и некоторые заводские породы оставались на самосохранении, что привело к резкому сокращению поголовья и нахождению на грани исчезновения
- Одной из задач Государственной программы развития аграрного бизнеса в Республике Беларусь на 2021–2025 годы является «**сохранение и дальнейшее разведение с целью увеличения численности ценных, локальных и исчезающих пород (красный белорусский скот, черно-пестрая порода свиней, полесская лошадь)**».
- Правительство Республики Беларусь ставит задачу **поддерживать породное разнообразие сельскохозяйственных животных, что позволяет расширять возможности животноводства и обеспечивать национальную безопасность.**



# Красный белорусский скот



- Породная группа красного белорусского скота (утв. в 1960 г). Красный белорусский скот по своему происхождению является одной из самых древних славянских пород, ветвью западнославянского скота.
- Красный белорусский скот является ценной отечественной популяцией, отличающейся приспособленностью животных к местным условиям, неприхотливостью, крепким здоровьем, хорошими воспроизводительными качествами, молочной продуктивностью, повышенным содержанием в молоке белка и жира.



Договор с БРФФИ № Б23РНФ-060 от 15 ноября 2022 г.

«Поиск молекулярных маркеров, детерминирующих генетические и фенотипические характеристики аборигенных красных пород крупного рогатого скота России и Беларуси»

Организации-исполнители: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; ФГБНУ ФИЦ «Всероссийский институт по животноводству им. Л. К. Эрнста»

Научные руководители: д.с/х.н., проф., чл.-корр. Р.И. Шейко; к.с/х. н. Сермягин А.А.

У выборки из популяции белорусской красной породы идентифицировано 19 полиморфных нуклеотидных сайтов гена, кодирующего цитохром b мтДНК: 14615T>C, 14732G>A, 14894A>G, 15074T>C, 15102C>T, 15134C>T, 15167C>T, 15206G>A, 15221T>C, 15275T>C, 15293T>C, 15308C>T, 15336A>G, 15492G>A, 15510C>T, 15527T>C, 15556T>C, 15627A>G, 15656G>A.

Результаты секвенирования последовательности гена, кодирующего цитохром b мтДНК показывают, что красный белорусский скот относится к Евразийскому тауриновому скоту, а именно к гаплогруппе T (SNP-замены 15134C>T и 15308C>T) и к гаплогруппе Q (SNP-замена 15627A>G). **STR-анализ показал, крайне низкую степень дифференциации внутри популяции белорусского красного скота.** Выборка из популяции голштинского скота белорусской селекции более разнообразна, т.к. значение  $F_{IS} < 0$ .

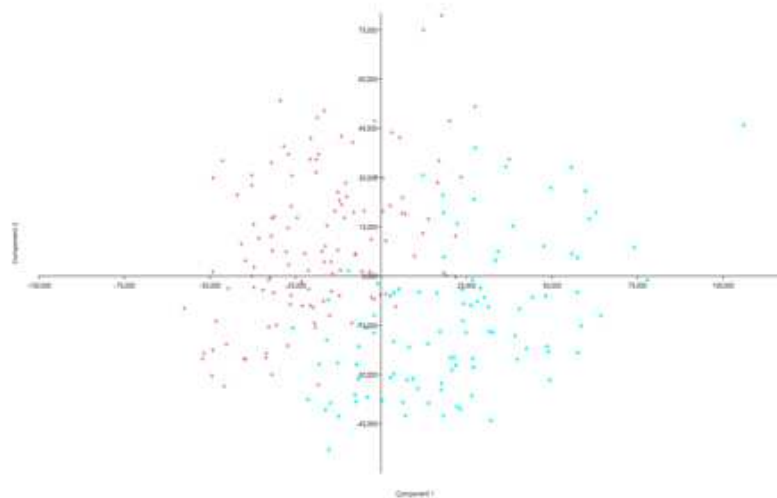


Рисунок – Кластеризация особей выборок белорусского красного скота и голштинского скота белорусской селекции на основании PCA (анализ главных компонент) Условные обозначения: **зеленая точка** – белорусский красный скот; **красная точка** – голштинский скот белорусской селекции



Проект БРФФИ № Б20Р-327 «Характеристика генофонда пород крупного рогатого скота красного корня России и Беларуси с использованием полногеномного скрининга».

Исполнители: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси и ФГБНУ ФИЦ «Всероссийский институт по животноводству *им. Л. К. Эрнста*» (2020-2022гг.)

- Впервые с помощью полногеномного анализа SNP проанализировано биоразнообразие и генетическая структура аборигенной популяции белорусского красного скота,
- установлена его связь с другими европейскими породами «красного корня»,
- что подтверждает историческое смешение между белорусской красной и другими европейскими тауриновыми породами красного скота.



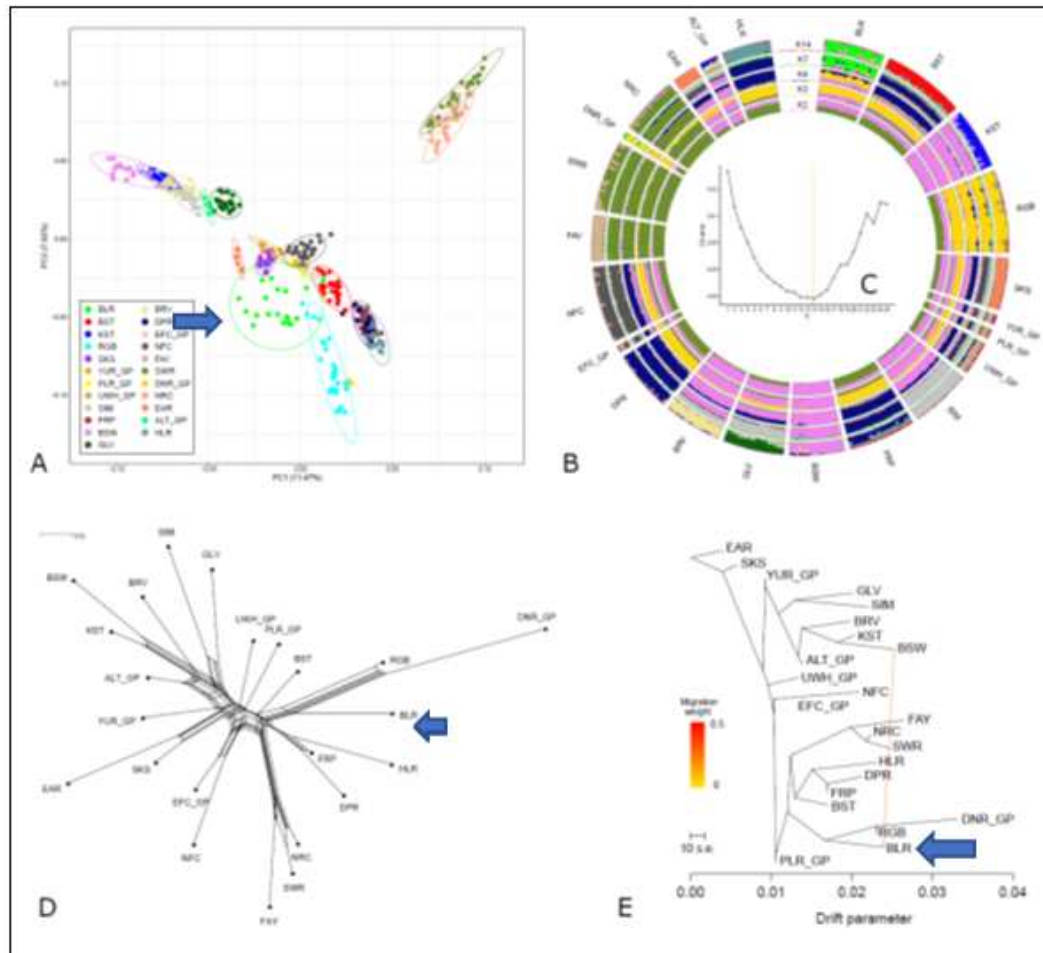


Рисунок из статьи [Zinovieva N.A., Sheiko I.P., Dotsev A.V., Sheiko R.I., Mikhailova M.E., Sermyagin A.A., Abdelmanova A.S., Kharzinova V.R., Reyer H., Wimmers K., Sölkner J., Pleshanov N. V., Brem G.](#) Genome-wide SNP analysis clearly distinguished the Belarusian Red cattle from other European cattle breeds / Animal Genetics. – 2021. - Vol.52. Issue 5. P.720-724.

Белорусский красный скот продемонстрировал умеренный уровень генетической изменчивости и самый высокий избыток гетерозигот, что отражает вклад других красных пород Северной и Центральной Европы в его формирование и показывает происхождение белорусской красной породы и его недавнюю историю, что подтверждает историческое смешение между белорусской красной и другими породами красного скота.

А именно, современная популяция белорусского красного скота является носителем 37,9, 33,3 и 16,9% генов предков буро-швицкого, датского красного и финско-айширского скота соответственно.

Установлено, что эти породы вносили свой вклад в генофонд белорусской красной породы в разные периоды ее развития.



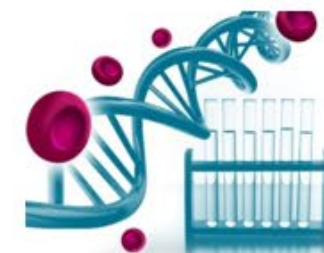
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЛОШАДЕЙ  
БЕЛОРУССКОЙ УПРЯЖНОЙ ПОРОДЫ НА  
ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА  
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК и STR ЛОКУСАМ







- В Беларуси существует **только два массива лошадей**, которые мы можем отнести к локальным популяциям:
- Это **полесская аборигенная популяция и белорусская упряжная порода.**
- Лучшим результатом «народной селекции» в белорусском Полесье является локальная популяция лошадей, сформированная под сильным влиянием естественных условий среды обитания, которая и является основой современной белорусской упряжной породы.



## ОСНОВНЫЕ ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Методом секвенирования по Сэнгеру определены нуклеотидные последовательности генов цитохром с-оксидаз: COX1, COX2, COX3, прилегающих тРНК: tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, tRNA-Tyr, tRNA-Ser, tRNA-Asp, tRNA-Lys и субъединиц АТФ-синтаз – АТФ6 и АТФ8 у лошадей **белорусской упряжной породы** и лошадей **полесской популяции**. 2. Проведено множественное выравнивание с 83 секвенированными митохондриальными геномами современных лошадей различного географического происхождения (Европы, Азии, Ближнего Востока, Америки). В результате у лошадей **белорусской упряжной породы идентифицированы гаплогруппы: В, Е, G, I, L, P, R. У лошадей полесской популяции: А, Н, N, L, P, R** (Рис.1)



Филогенетическое дерево, построенное по данным секвенированных последовательностей лошадей белорусской упряжной породы и последовательностей из GenBank

Идентифицированные гаплогруппы типичны для популяций лошадей Евразии.



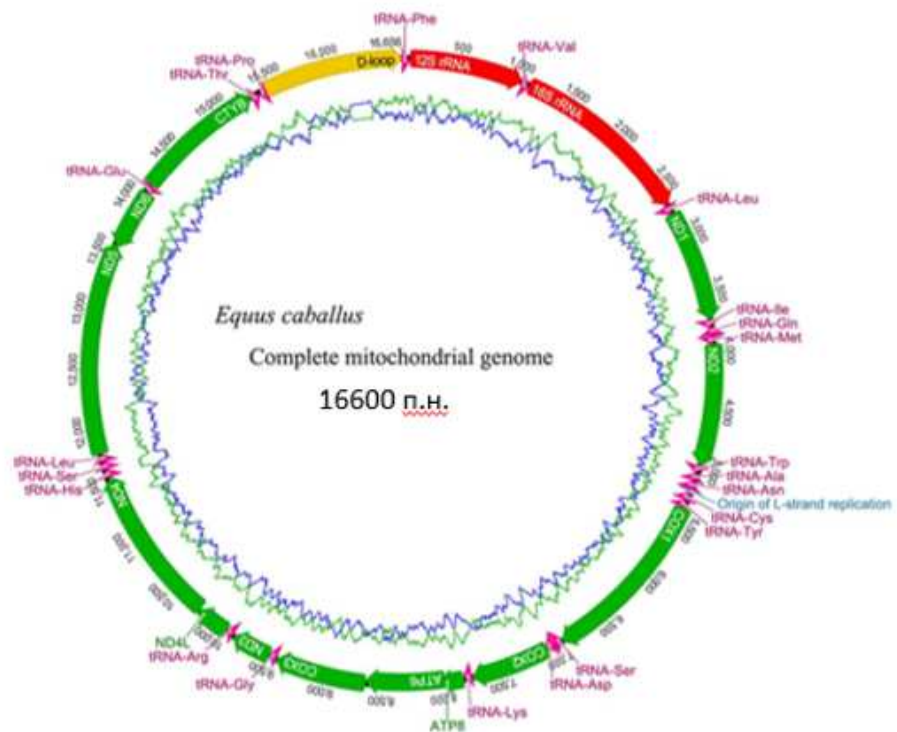
**Белорусская упряжная**



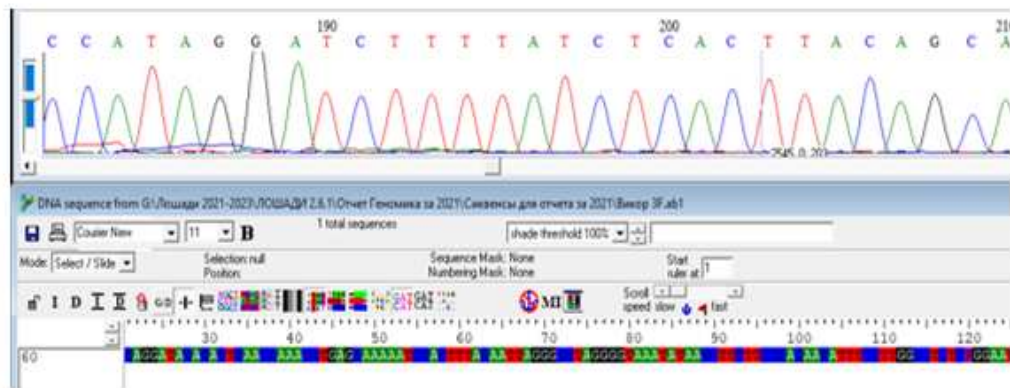
**Полесская лошадь**



# Секвенирование митохондриального генома лошади



Структурно-функциональная организация митохондриального генома лошади



Визуализация продуктов секвенирования участка митохондриального генома лошади в программе [BioEdit](#)

Проведено секвенирование фрагмента мтДНК длиной 4600 п.н., включающего гены, кодирующие субъединицы цитохром с-оксидазы I, II, III (COI, COII, COIII) у образцов лошадей белорусской упряжной породы.



## ОСНОВНЫЕ ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ AMOVA STR локусов показал, наибольшее генетическое сходство между выборками лошадей **белорусской упряжной породы**. Наибольшая удаленность показана между выборками **белорусской упряжной породы и полесской популяцией** (Рис.2).

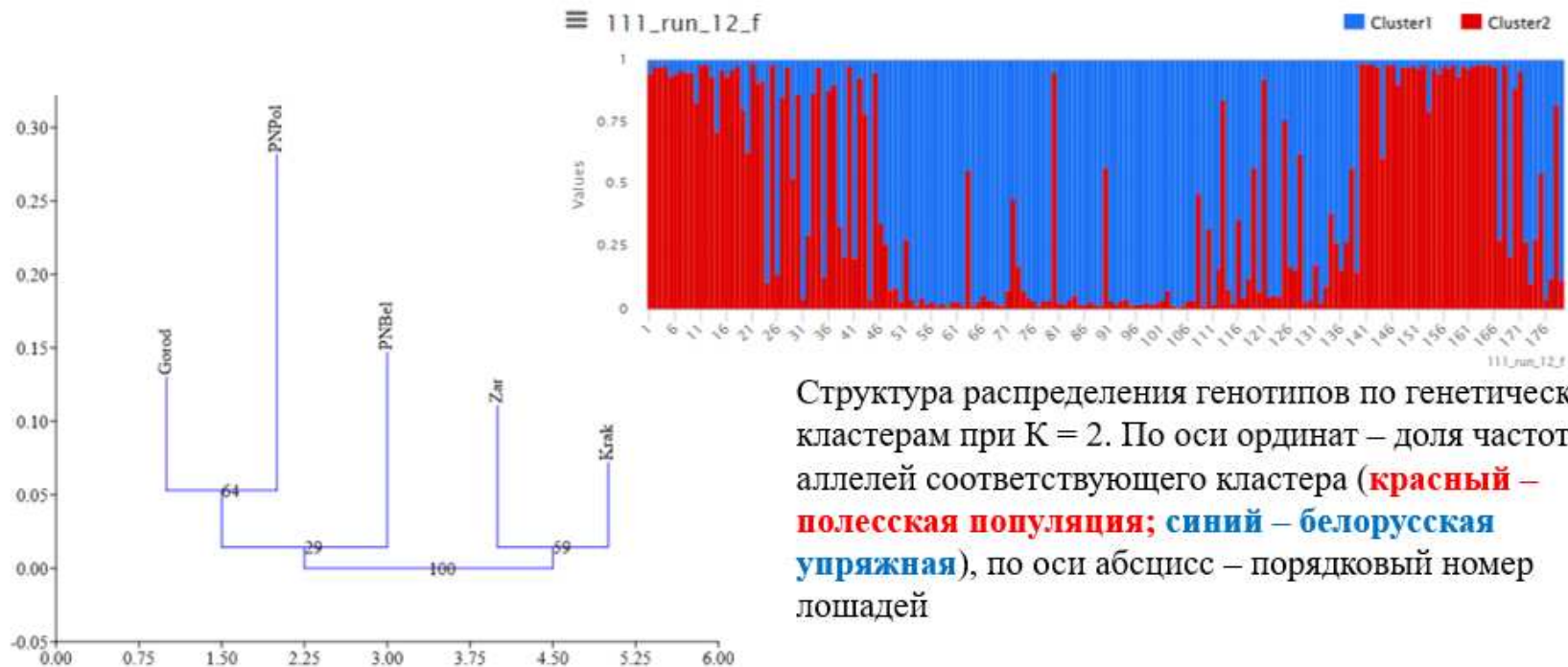
Расчет критерия Q (Эванно-анализ) показал, что статистически значимое количество кластеров в исследуемых нами выборках лошадей равно 2 при  $\Delta K = 24,999$ . Первый кластер включает лошадей полесской популяции. Второй – лошадей белорусской упряжной породы.



Белорусская упряжная



Полесская лошадь



Структура распределения генотипов по генетическим кластерам при  $K = 2$ . По оси ординат – доля частот аллелей соответствующего кластера (**красный – полесская популяция; синий – белорусская упряжная**), по оси абсцисс – порядковый номер лошадей

Кластеризация выборок лошадей с использованием алгоритма Neighbour joining



Мировая тенденция селекции КРС, направленная на увеличение удоя молока привела:

- к **увеличению молочной продуктивности** в 2 раза;
- одновременно и к **уменьшению плодовитости** в такое же количество раз.



**Возрастание негативного влияния летальных рецессивных генетических дефектов, в гомозиготном состоянии приводящих к эмбриональной смертности или гибели теленка в ранний постэмбриональный период**

Жесткая селекция по ограниченному числу признаков молочной продуктивности

Искусственное осеменение коров относительно небольшим количеством лучших (лидеров) быков-производителей

Потеря редких комбинаций генов

Популяция молочных пород КРС

Инбридинг

Снижение генетической изменчивости

Увеличение гомозиготности

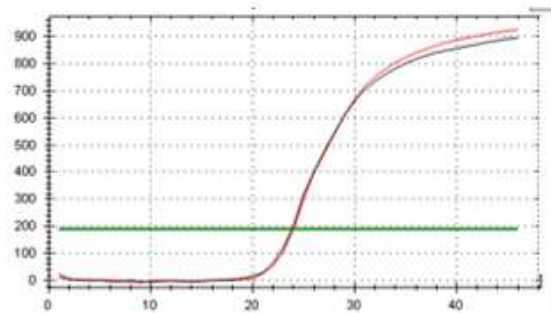


# Гаплотипы фертильности КРС

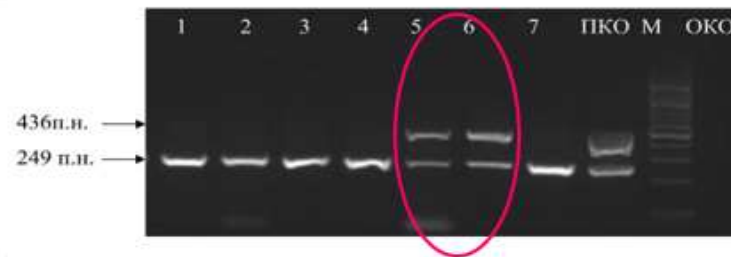


Оказывают влияние на степень стельности и / или ассоциированных с эмбриональной и ранней постэмбриональной смертностью, Встречаются с частотой от **0,01% до 2,95%** **Экономическая значимость этих дефектов обусловлена, в большей степени, их влиянием на фертильность коров.**

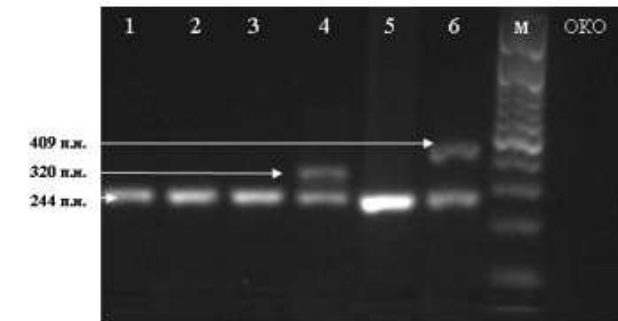
• *Эффективность и рентабельность молочного стада находится в зависимости от баланса между приростом и воспроизводством.*



Выявление мутации rs456206907 гена *SMC2* (ННЗ) методом ПЦР-РВ с аллель-специфичными праймерами



Выявление вставки 1,3т.п.н в гене *APOB* (HCD)



Выявление в мультиплексе гаплотипа фертильности **ННО** и мутации гена *FXID* – фактора свертываемости крови



Согласно постановлению Совета Министров Республики Беларусь от 23 сентября 2022г. №162-3 «об изменении Закона Республики Беларусь О племенном деле в животноводстве» от 20.05.2013 года и постановления Минсельхозпрода Республики Беларусь от 30 августа 2022г. №89 «О порядке организации молекулярной генетической экспертизы» все высокопродуктивные племенные животные должны подвергаться генетической экспертизе с целью подтверждения их происхождения и выявлению генетически обусловленных наследственных заболеваний.

**ПЕРЕЧЕНЬ  
генетически детерминированных заболеваний  
сельскохозяйственных племенных животных**

Вид (порода) сельскохозяйственных племенных животных	Наименование генетически детерминированных заболеваний (согласно ID в OMIA)
--	---

1. Крупный рогатый скот:

голландская черно-пестрая порода, голландская красно-пестрая порода и голландизированный скот других пород

HCD – голландской гаплотип, ассоциированный с дефицитом холестерина (OMIA ID 001965-9913);  
 BY – брахиспина (OMIA ID 000151-9913);  
 HH5 – голландской гаплотип 5 (OMIA ID 001941-9913);  
 HH3 – голландской гаплотип 3 (OMIA ID 001824-9913);  
 HH4 – голландской гаплотип 4 (OMIA ID 001826-9913);  
 HH2 – голландской гаплотип 2 (OMIA ID 001823-9913);  
 HH1 – голландской гаплотип 1 (OMIA ID 000001-9913);  
 HH6 – голландской гаплотип 6 (OMIA ID 002149-9913);  
 BLAD – дефицит лейкоцитарной адгезии (OMIA ID 000595-9913);  
 SVM – комплексный порок позвоночника (OMIA ID 001340-9913);  
 DUMPS – дефицит уридинмонофосфатсинтазы (OMIA ID 000262-9913);  
 BC – цитруллинемия (OMIA ID 000194-9913);  
 FXID – дефицит фактора XI (одиннадцать) крови (OMIA ID 000363-9913);  
 MF – синдактилия (OMIA ID 000963-9913).





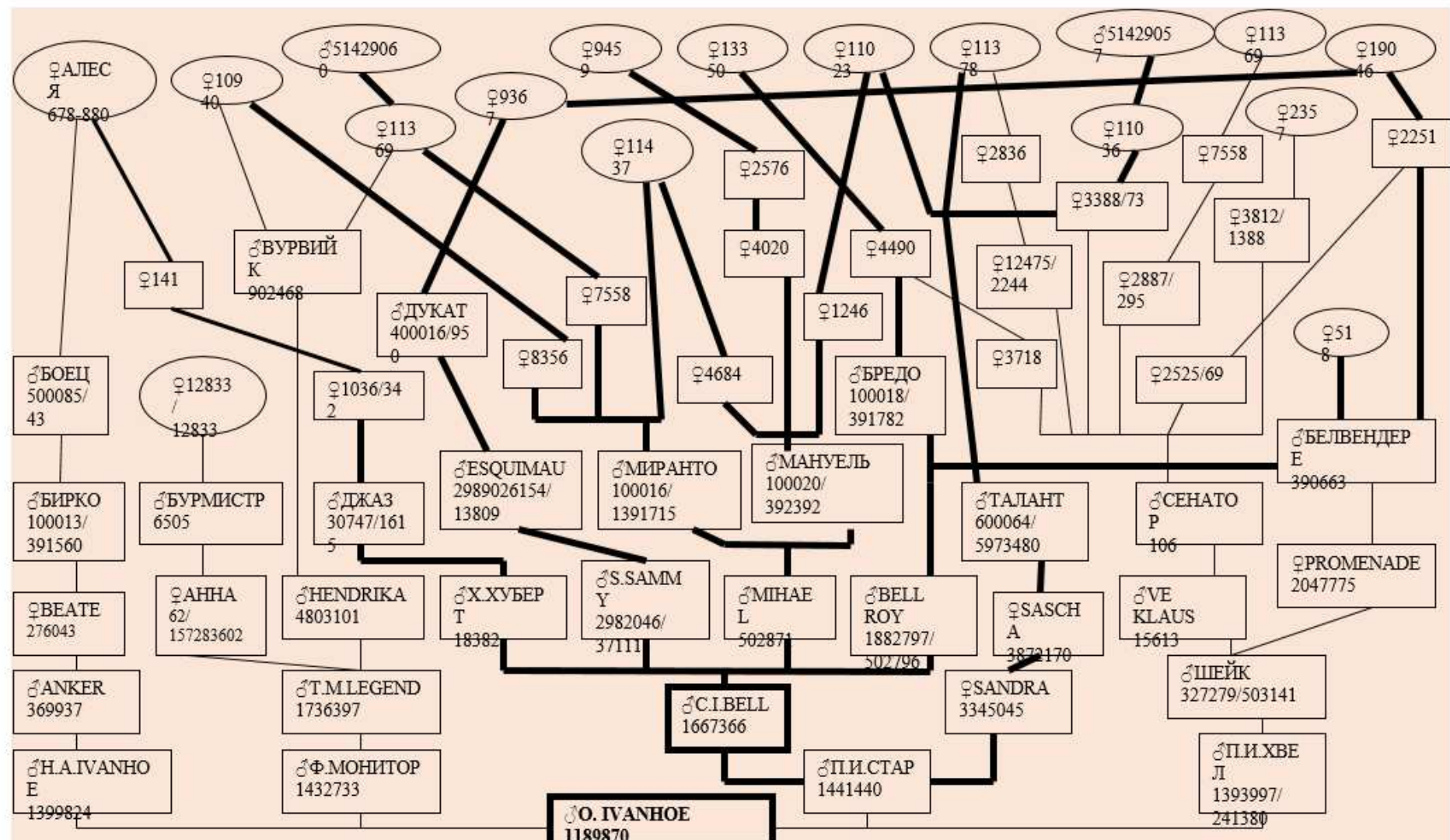


Рис. Генеалогическое дерево проанализированных животных-носителей мутации BLAD

○ - проанализируемые животные, □ - предки



ДНК-диагностики генетически обусловленных дефектов, детерминирующих развитие аутосомно-рецессивных наследственных заболеваний КРС:

*голландская порода белорусской селекции*

- синдром брахиспина (BY, HH0);
- гаплотип фертильности HH1;
- гаплотип фертильности HH3;
- гаплотип фертильности HH4;
- гаплотип фертильности HH5;
- дефицит холестерина (HCD);
- цитруллинемия (BC);
- комплексная аномалия позвоночника (CVM (HHC));
- дефицит лейкоцитарной адгезии (BLAD (HHB));
- дефицит уридинмонофосфатсинтазы (DUMPS (HHD));
- дефицит фактора XI крови (FXID).

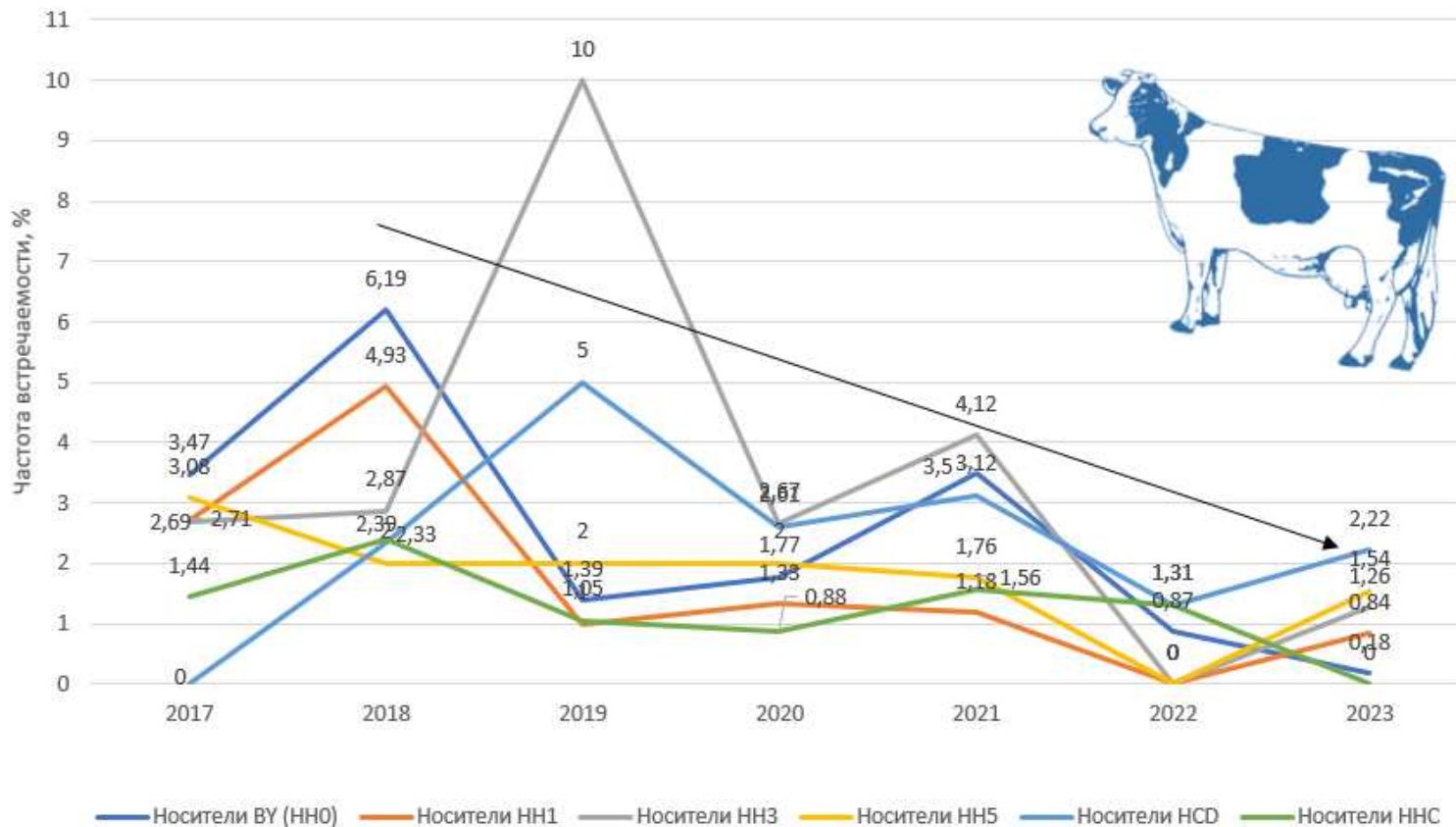


Рисунок - Частота встречаемости животных - скрытых носителей гаплотипов фертильности в исследованной голштинского скота белорусской селекции в 2015-2023гг (N=5717 голов)

1. С 2018 года до 2023 г.: не выявлено (0%) животных скрытых носителей дефицита уридинмонофосфатсинтазы (DUMPS (HHD)) а также снижено до 0% комплексного порока позвоночника (CVM; HHC);
2. Установлено снижение выявленных животных-скрытых носителей:
  - гаплотипа фертильности HH5 в 6 раз;
  - гаплотипа фертильности HH1, HH3 в 3 раза;
  - синдрома брахиспина (BY, HH0) в 2 раз;
  - дефицита холестерина (HCD) в 1,94 раз.





Использование спермы быков-производителей свободной от гаплотипов фертильности является одним из составляющих частей, влияющих на процесс воспроизводства стада.

**Выведение из селекционного процесса спермы быков – скрытых носителей гаплотипов фертильности, позволило увеличить продуктивность дойного стада, так удой на корову по Минской области за 2019 год составил 5343 кг молока, за 2020 год-5804кг. За год продуктивность на корову увеличилась на 461 кг молока.**

Не прямой (косвенный) экономический эффект складывается из повышения воспроизводительной способности дочерей быков свободных от нежелательных гаплотипов фертильности, снижения межотельного и сервис периодов и дополнительно полученного молодняка.



**Выявление полиморфизма в генах *HES4*, *ISG15*, *AGRN* методом АС-ПЦР, приводящего к развитию множественного артрогрипоза КРС, вызванная делецией**

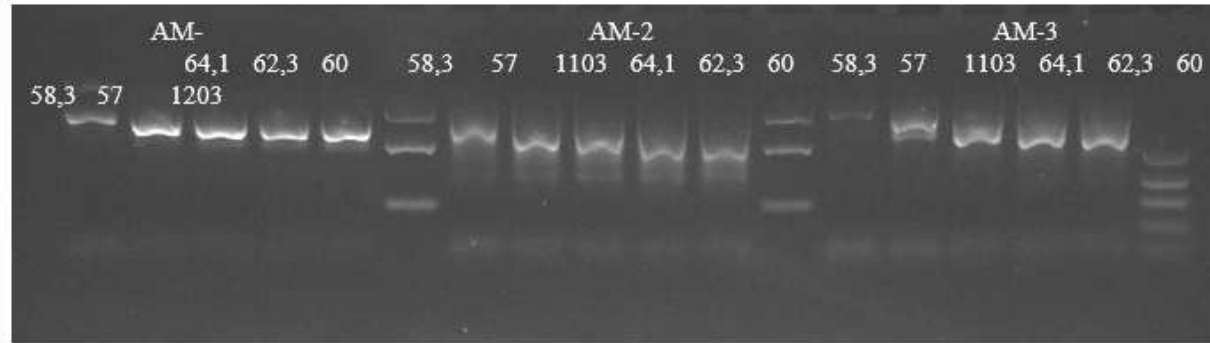


Рисунок - Результаты ПЦР фрагментов генов *HES4*, *ISG15*, *AGRN* с температурным градиентом

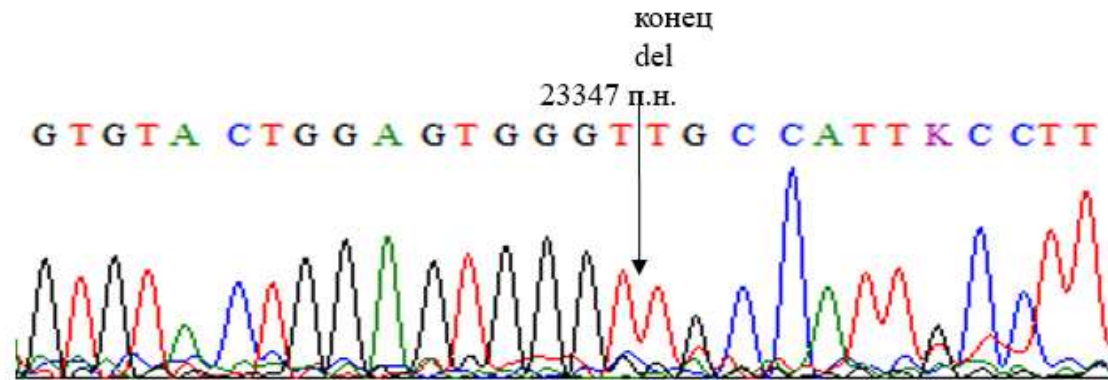


Рисунок - Результаты секвенирования дикого аллеля генов *HES4*, *ISG15*, *AGRN* без делеции 23347 п.н.

Разработанные методики раннего выявления гетерозиготных животных-носителей гаплотипа множественного артрогрипоза АМС, альфа-маннозидоза (МАС), дупликации развития (DDC), что позволит снизить риск распространения дефектных аллелей в популяциях абердин-ангусского скота, разводимого в Беларуси.



# ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЯСНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПО ПРИЗНАКУ ВЫСОКОГО КАЧЕСТВА МЯСА

Созданы ДНК-технологии, позволяющие выявлять животных с желательными генотипами генов *CAPN1* и *CAST* с целью дальнейшего их использования в селекционном процессе для повышения как мясной продуктивности так и получения мяса с хорошими вкусовыми качествами.

Анализ генетической структуры микропопуляций крупного рогатого скота мясных пород, разводимых в Беларуси по генам *CAST\_2959* и *CAPN1\_316*.

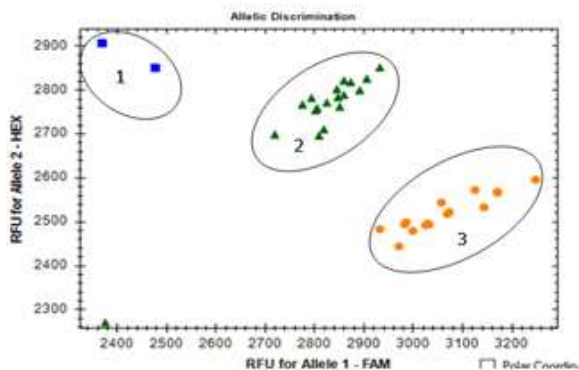


Рис. 1 - Дискриминации аллелей бинарной SNP-мутации *CAST\_2959* с использованием KASP-анализа

Кластер №3 – генотип (AA *CAST*), ассоциированный с более нежным мясом КРС

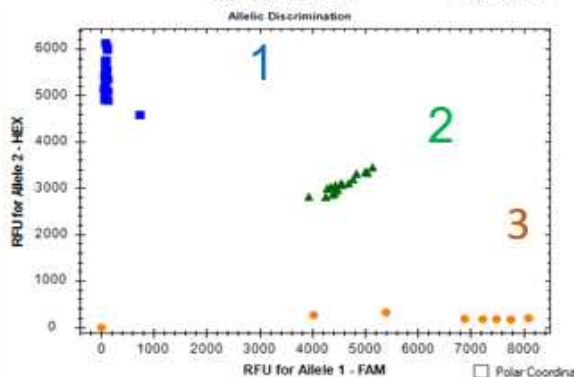


Рис.2 – Детекция бинарной SNP-мутации *CAPN1\_316* методом ПЦРРВ

Кластер №1, 3 – генотипы гена кальпаина (CC и CG *CAPN1\_316*), ассоциированные с более нежным мясом КРС

- Выявлена частота встречаемости животных с желательной аллельной формой в гомозиготе (генотип AA *CAST\_2959*), которая составляет у абердин-ангусской породы – 11,8 %, у лимузинов – 3,7%, у геррефордов – 1,9%.
- Частота встречаемости гетерозиготных животных (генотип CG *CAPN1\_316*) с предпочтительным аллелем C составила у абердин-ангусской породы – 45,1 %, у лимузинов – 31,2%, у геррефордов – 23,9%.



Благодарю за внимание!

