



На правах рукописи

ИГОШИН АЛЕКСАНДР ВЛАДИМИРОВИЧ

**ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА
И ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В
УСЛОВИЯХ СИБИРИ**

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2025

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной генетики и селекции сельскохозяйственных животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Юдин Николай Серафимович**
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории молекулярной генетики и селекции сельскохозяйственных животных ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Камалдинов Евгений Варисович**
доктор биологических наук, доцент, заведующий Кафедрой прикладной биоинформатики Института цифровых технологий ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет», г. Новосибирск
Столповский Юрий Анатольевич
доктор биологических наук, заведующий Лабораторией сравнительной генетики животных ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук», г. Москва

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московская область, п. Дубровицы

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» в конференцзале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.icgbio.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Среди факторов, влияющих на продуктивные качества крупного рогатого скота (КРС) важнейшее место занимает климат [Adams et al., 1998; Astuti et al., 2024]. В этой связи, одной из основных задач сельскохозяйственной генетики является создание высокопродуктивных пород КРС, адаптированных к локальным климатическим условиям. Для Российской Федерации эта задача имеет особую актуальность. Обширные пространства в северных районах нашей страны, непригодные или малопригодные для земледелия, в перспективе могут быть использованы для развития скотоводства. Для реализации таких программ необходимо, в том числе, создание новых пород и внутривидовых типов крупного рогатого скота, адаптированных к холодному климату [Солошенко и др., 2020].

Одним из показателей адаптации к холоду у КРС является способность животных сохранять температурный гомеостаз при понижении температуры окружающей среды [Howard et al., 2014; Silva, Bittar, 2019]. Поддержание температурного гомеостаза в условиях холода у КРС осуществляется за счет ряда адаптивных реакций, приводящих к повышению теплопродукции и снижению теплопотерь [Shephard, Maloney, 2023]. Недостаточное развитие этих реакций в условиях низких температур приводит к гипотермии – снижению температуры тела, которое ухудшает продуктивность, репродуктивные качества, устойчивость к инфекциям и, в конечном счете, может привести к гибели животного [Khounsy et al., 2012; Silva, Bittar, 2019]. Наиболее опасна гипотермия для телят, являясь у них одной из причин повышенной смертности в первые месяцы жизни, особенно в холодный сезон [Silva, Bittar, 2019; Mota-Rojas et al., 2023].

В последние годы, значительную роль в улучшении адаптационных возможностей КРС отводят генетическим технологиям, в частности, геномной и маркер-ориентированной селекции (МОС) [Deb et al., 2022], а также геномному редактированию [Harrison, 2022]. Для применения этих технологий необходима информация о генах и ДНК-маркерах, вовлечённых в адаптацию КРС. Для идентификации таких локусов были проведены исследования по поиску следов отбора в геномах устойчивых к холоду пород КРС [Yurchenko et al., 2018; Weldenegodguad et al., 2018; Buggiotti et al., 2021; Ghoreishifar et al., 2020; Yan et al., 2022], анализу вариаций числа копий [Buggiotti et al., 2022], сравнительному транскриптомному анализу [Cao et al., 2017; Pokharel et al., 2019], полногеномному анализу ассоциаций (ПГАА) с адаптивной реакцией на холод [Howard et al., 2014]. Однако, поскольку большинство этих работ было сфокусировано на поиске генов, то число известных на сегодняшний день SNP-кандидатов, ассоциированных с холодовой адаптацией КРС, крайне невелико [Юдин и др., 2023].

Перспективным объектом для подобных исследований по поиску кандидатных генов и полиморфизмов холодовой адаптации, являются местные породы КРС [Yudin et al., 2021], в частности, сибирские популяции герефордской и

казахской белоголовой пород. Поскольку история разведения герефордов сибирской селекции и казахской белоголовой породы в Сибири составляет более десяти поколений [Дуров, 2002], можно ожидать наличие адаптивных изменений в геномах этих популяций. С помощью сравнения с неадаптированными популяциями и породами можно выявить гены и полиморфизмы, важные для процесса адаптации. Вероятно, значительная доля адаптивных аллелей в сибирских популяциях герефордской и казахской белоголовой пород еще не достигла фиксации, что делает их перспективным объектом для проведения ПГАА с фенотипами устойчивости к холоду [Uricchio, 2020].

Разводимые в Сибири популяции герефордов и казахской белоголовой породы являются одними из наиболее оптимальных с точки зрения компромисса между холодостойкостью и мясной продуктивностью и, в этой связи, перспективны для разведения на северных территориях РФ [Солошенко и др., 2020]. Поэтому, информация о кандидатных генах и полиморфизмах холодовой адаптации, выявленных в этих популяциях, может быть использована в хозяйствах при селекции на улучшение адаптивных качеств КРС.

Целью настоящего исследования является выявление генов- и SNP-кандидатов температурного гомеостаза и холодовой адаптации в сибирских популяциях мясных пород крупного рогатого скота.

Задачи:

1. Проведение на выборке герефордов сибирской селекции и породы казахская белоголовая полногеномного анализа ассоциаций выраженности адаптивной реакции на сильный холод на основе данных генотипирования на ДНК-чипах.
2. Поиск генов- и вариантов-кандидатов выраженности адаптивной реакции на сильный холод на основе данных ресеквенирования животных с контрастными фенотипами в вышеупомянутой выборке.
3. Проведение сравнительного анализа частот ДНК-полиморфизмов, ассоциированных с хозяйственно важными признаками, в выборках адаптированных к холоду герефордов сибирской селекции и зарубежных герефордов.

Научная новизна работы. Впервые проведено исследование генетических основ адаптивной реакции на сильный холод в популяциях герефордов сибирской селекции и породы казахская белоголовая. По итогам этого исследования впервые получены данные, указывающие на возможную адаптивную роль в условиях холода у КРС гена *GRIA4*. На основе сравнения частот ДНК-полиморфизмов, ассоциированных с хозяйственно важными признаками, между выборкой адаптированных к холоду герефордов сибирской селекции и выборкой зарубежных герефордов впервые показано, что аллели SNP в генах семейства STAT, негативно влияющие на репродуктивные признаки, реже встречаются у герефордов сибирской селекции по сравнению с зарубежными герефордами. Это, вероятно, отражает процесс их генетической адаптации к суровому климату Сибири.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные в настоящей работе данные дополняют имеющиеся представления о генах и генетических механизмах, участвующих в адаптации к холоду у КРС. Кандидатные SNP, после подтверждения ассоциаций на независимых выборках, могут быть использованы в маркер-ориентированной и геномной селекции на улучшение адаптации к холоду и на повышение воспроизводительных качеств животных в условиях сурового климата.

Положения, выносимые на защиту:

1. Лocus в районе генов *MSANTD4-GRIA4* на хромосоме 15 крупного рогатого скота (КРС) вовлечен в генетический контроль адаптивной реакции на низкие температуры (до -32 °C) у скота мясного направления продуктивности – герефордов сибирской селекции и казахской белоголовой и при этом не имеет значимой ассоциации с массой тела у этих животных.
2. Однонуклеотидные замены в генах семейства STAT транскрипционных факторов – *STAT1* (rs43705173), *STAT3* (rs110942700) и *STAT5A* (rs208753173) вовлечены в процесс генетической адаптации герефордской породы КРС к условиям Сибири.

Вклад автора. Все основные научные результаты были получены автором самостоятельно. Эксперимент по исследованию адаптивной реакции КРС на сильный холод проводился при участии автора, совместно с Н.С. Юдиным, Р.Б. Айтназаровым и Д.В. Петровским. VCF-файлы, полученные в результате обработки первичных данных полногеномного секвенирования животных герефордской и казахской белоголовой пород, были любезно предоставлены Д.М. Ларкиным. Генотипирование образцов ДНК КРС на чипах GGPND150K было проведено в компании GeneSeek (Сан Диего, США). Образцы ДНК КРС были ресеквенированы в компании Novogene (Гонконг, Китай).

Апробация работы. По материалам исследования были представлены доклады на следующих конференциях: Международная конференция по биоинформатике, структуре и регуляции генома (BGRS 2018, 2022, г. Новосибирск); 38-ая конференция Международного Общества по Генетике животных (ISAG 2021); 37-ая конференция Международного Общества по Генетике животных (ISAG 2019, г. Льейда, Испания).

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликованы 5 статей в журналах перечня ВАК и приравненных к ним (из них 4 входят в международные базы цитирования Web of Science и Scopus), а также 4 тезиса международных конференций.

Структура и объем работы. Текст диссертации состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (371 источник). Работа содержит 8 таблиц, 20 рисунков и два приложения. Общий объем диссертационного исследования составляет 129 страниц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выявление районов генома, вовлеченных в адаптивную реакцию на сильный холод у крупного рогатого скота, с помощью полногеномного анализа ассоциаций. В эксперименте по измерению адаптивной реакции на сильный холод были использованы 197 животных обоего пола пород герефордская (167 голов: 63 быка, 104 телки) и казахская белоголовая (30 голов: 23 быка, 7 телок) в возрасте от 6 месяцев до ~13 лет. В качестве меры выраженности адаптивной реакции мясного скота на сильный холод мы применили показатель AUCW5D – площадь под кривой тимпанальной температуры тела за пять самых холодных последовательных зимних дней наблюдения [Howard et al., 2014]. Для сбора информации о тимпанальной температуре животного использовали датчики FC-409 (Friendcom, КНР), которые заранее закрепляли в наружном слуховом проходе животных.

После генотипирования на ДНК-чипе GGRHD150K, содержащем 139 376 SNP, для ПГАА были использованы 183 образца (герефордская: 59 быков, 97 телок; казахская белоголовая: 21 бык, 6 телок). После ряда этапов фильтрации, для полногеномного анализа ассоциаций на основе отдельных SNP (тест EMMAX) нами были использованы 108 156 SNP маркеров. ПГАА на основе гаплотипов (тест HTR) был проведен с использованием 24 873 гапоблоков, которые, в свою очередь, были получены на основе фазированных генотипов 119 841 аутосомных SNP. В качестве предикторов в обоих тестах использовали пол и породу. При необходимости, проводили стандартную процедуру геномного контроля (метод «GC_{median}») [Dadd et al., 2009]. Для поправки на множественные сравнения использовали метод Бенджамини-Хохберга [Benjamini, Hochberg, 1995].

Полногеномный анализ ассоциаций массы тела у крупного рогатого скота. На этой же выборке животных мы провели полногеномный анализ ассоциаций массы тела с использованием отдельных SNP. ПГАА проводили аналогично таковому при исследовании ассоциаций с адаптивной реакцией на сильный холод. В качестве фенотипа использовали массу тела животного в определенном возрасте, отмеченную в карточках зоотехнического учета. В общей сложности, данные по массе тела в определенном возрасте имелись для 174 животных. В качестве предикторов использовали пол, породу и квадратный корень из возраста. Всего в анализе были использованы 107 550 SNP.

Анализ данных ресеквенирования животных с контрастными фенотипами по адаптивной реакции на сильный холод. Из выборки 183 животных мы отобрали двенадцать особей, демонстрирующих контрастные фенотипы (шесть животных в каждой группе) по адаптивной реакции на сильный холод. Образцы ДНК были ресеквенированы на платформе Illumina HiSeq4000 в компании Novogene (Гонконг, Китай). В полученных в итоге VCF-файлах, содержащих идентифицированные полиморфные варианты, насчитывалось 17 561 905 SNP, из которых 16 852 080 являлись аутосомными. Мы провели F_{st} -анализ [Weir, Cockerham, 1984] методом «скользящего окна» (размер «окна» 50 тыс. п.н.,

шаг 25 тыс. п.н.) для выявления районов генома, вносящих вклад в различия между двумя группами животных, контрастными по адаптивной реакции на сильный холод.

По итогам F_{st} -анализа для «окон» были получены значения взвешенного индекса F_{st} . Для идентификации кандидатных SNP в районах с наивысшим значением этого индекса, мы использовали ранжирование, проведенное на основе взвешенного F_{st} , различий в частоте аллелей между контрастными группами и FAETH-оценок, представляющих собой численную характеристику функциональной значимости полиморфизмов, рассчитанную на основе их вклада в 34 фенотипа КРС (в основном, хозяйственно-ценные признаки и морфометрические показатели) [Xiang et al., 2019]. Ранги были представлены значениями от нуля до единицы таким образом, что чем выше соответствующее значение (т.е. взвешенный F_{st} , разница частот или FAETH-оценка), тем меньше его ранг. Ранги были суммированы, после чего SNP были отсортированы по сумме рангов. SNP с наименьшей (<0.1) суммой рангов были аннотированы с помощью программ NGS-SNP [Grant et al., 2011] и Variant Annotation Integrator [Hinrichs et al., 2016]. Аннотация геномных районов соответствующими генами была произведена на основе файла разметки Bos_taurus.UMD3.1.94.gtf проекта Ensembl [Flicek et al., 2010].

Чтобы определить, какие биологические функции вносят вклад в различия по адаптивной реакции на сильный холод между двумя контрастными группами, мы провели анализ функционального обогащения с помощью веб-сервиса DAVID [Sherman et al., 2022]. В качестве целевого списка использовали гены аннотации Ensembl, пересекающиеся с 1% районов, имеющими наивысшие значения взвешенного индекса F_{st} .

Сравнение герефордов сибирской селекции и зарубежных герефордов по полиморфизмам, ассоциированным с хозяйственно-ценными признаками. Список кандидатных однонуклеотидных полиморфизмов, вставок и делеций был составлен на основе информации из базы данных OMIA (www.omia.org [Lenffer et al., 2006]) и рекомендаций по генетическим вариантам хозяйственного и клинического значения, изданным Ирландской федерацией разведения крупного рогатого скота (ICBF) [McClure, McClure, 2016].

Исследуемая выборка была представлена 18 животными герефордской породы сибирской селекции ресеквенированными нами и 123 зарубежными герефордами из проекта «1000 геномов быков» [Hayes, Daetwyler, 2019]. Полногеномное ресеквенирование проводили на платформе Illumina HiSeq4000 в компании Novogene (Гонконг, Китай). Обработка данных секвенирования проводилась Д.М. Ларкиным и описана в работе Игошина с соавторами [Igoshin et al., 2022]. Выборка 123 зарубежных герефордов была представлена животными из США ($n=54$), Канады ($n=41$), Австралии ($n=18$), Новой Зеландии ($n=8$) и Швейцарии ($n=2$).

Извлечение SNP, инсерций и делеций из полногеномных VCF-файлов проводили с помощью утилиты Tabix [Li, 2011]. Подсчет частот альтернативных аллелей осуществляли для 18 животных герефордской породы сибирской селекции и для совокупной выборки зарубежных герефордов (123 особи). Наличие различий по частотам аллелей между выборками проверяли с помощью точного теста Фишера, используя функцию «*fisher.test()*» языка R. Для поправки на множественные сравнения использовали метод Бенджамини-Хохберга. В качестве значимого использовали порог $q=0.2$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ПГАА по отдельным SNP (рисунок 1) нами было выявлено два полиморфизма на хромосоме 15, значимых на уровне $q < 0.10$. Наиболее значимый SNP – BovineHD1500000589 ($p = 9.55 \times 10^{-7}$, $q = 0.068$), был расположен в интронной области гена *GRIA4*, кодирующего субъединицу 4 глутаматного AMPA-рецептора. Второй SNP – BovineHD1500000472 (BTA15:2030345; $p = 1.7 \times 10^{-6}$, $q = 0.068$), был локализован между генами *MSANTD4* и *GRIA4*. По итогам ПГАА на основе гаплотипов, была выявлена статистически значимая ассоциация ($q < 0.05$) для двух гапоблоков. Наиболее значимый гапоблок ($p = 7.82 \times 10^{-7}$, $q = 0.016$) располагался на хромосоме 15 (BTA15:1991615-2060428) и состоял из 4 SNP. Один из них (BovineHD1500000472), как было упомянуто выше, демонстрировал тенденцию к ассоциации по результатам ПГАА с использованием отдельных SNP. Все четыре SNP были локализованы в промежутке между генами *GRIA4* и *MSANTD4*. Второй по значимости гапоблок ($p = 1.29 \times 10^{-6}$, $q = 0.016$) был расположен на хромосоме 22 (BTA22:18039089-18158982). Он состоял из пяти SNP, которые были расположены в районе между генами *GRM7* и *LMCD1*.

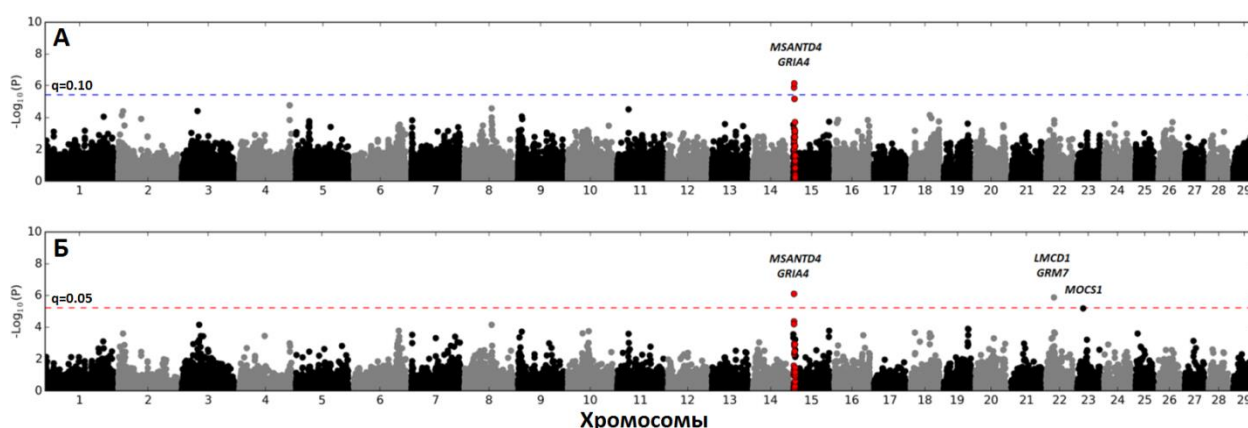


Рисунок 1. Манхэттенские графики, иллюстрирующие результаты ПГАА адаптивной реакции КРС на сильный холод с использованием отдельных SNP (А) и гаплотипов (Б). Красными точками обозначен общий район, идентифицированный в обоих тестах. Пунктирные линии обозначают пороги значимости.

В районе генов *MSANTD4-GRIA4*, идентифицированном двумя методами, ген *GRIA4* представляется наиболее вероятным геном-кандидатом, ответственным за поддержание температуры тела в условиях холода у КРС. Он кодирует одну из субъединиц (GluA4) AMPA-рецептора – ионотропного рецептора глутамата, передающего быстрые возбуждающие сигналы в синапсах нервной системы позвоночных [Platt, 2007]. Было показано, что активация AMPA-рецепторов в медиальной преоптической области гипоталамуса приводит к повышению температуры тела у крыс [Sengupta et al., 2016]. Также, на модели крыс показано, что

АМРА-рецепторы, вероятно, участвуют в проведении возбуждения от центра теплопродукции в гипоталамусе к ядрам продолговатого мозга [Kataoka et al., 2014].

Известно, что низкие температуры являются основной причиной повышенной смертности и заболеваемости телят и неадаптированных к холоду взрослых животных [Khounsy et al., 2012; Silva, Bittar, 2019]. Кроме того, в России существует проблема адаптации импортных пород и одним из показателей недостаточной адаптированности завезенных животных является их неспособность на должном уровне поддерживать температуру тела в условиях холода [Мостовая, Жуков, 2008]. В этой связи, маркер-ориентированная селекция по аллелям, ассоциированным с лучшим адаптивным ответом на низкие температуры, могла бы быть применена для снижения отхода телят в холодный сезон или ускорения процесса адаптации импортных пород. Однако, для использования в МОС, ассоциацию соответствующих SNP в районе *MSANTD4-GRIA4* с адаптивной реакцией на сильный холод следует подтвердить на независимой выборке [Pausch et al., 2015; Lee et al., 2019].

Важным условием при проведении МОС является то, что отбор на аллели, улучшающие целевой признак, не должен приводить к ухудшению других хозяйственно-ценных признаков [Lund et al., 2008; Cafe et al., 2010; Jiang et al., 2022]. Масса тела является важнейшим продуктивным признаком мясного скота [Herrera-Ojeda et al., 2019]. В этой связи, на той же выборке животных пород герефордская и казахская белоголовая мы провели ПГАА массы тела. По результатам ПГАА массы тела, пять SNP достигли статистически значимого уровня ассоциации ($q < 0.05$). Все эти SNP расположены на хромосоме 5 (рисунок 2). При этом четыре из них (BovineHD0500030503, BovineHD0500030501, BovineHD0500030494 и ARS-BFGL-NGS-106674) сконцентрированы в пределах участка размером 43 тыс. п.н. (BTA5:106294449–106337540), находящегося на расстоянии 18 тыс. п.н. от стартовой точки транскрипции гена *CCND2*. Пятый SNP – HD0500030398, отстоит от вышеуказанного скопления на 0.5 млн. п.н. (BTA5:105804923). В целом, район BTA5:105804923–106337540 содержит десять генов: *NDUFA9*, *AKAP3*, *MIR2285CR-2*, *RAD51AP1* (два паралога), *C5H12orf4* (два паралога), *FGF6*, *TIGAR*, *CCND2*. В то же время, стоит отметить, что значимого сигнала в районе *MSANTD4-GRIA4* обнаружено не было (рисунок 3).

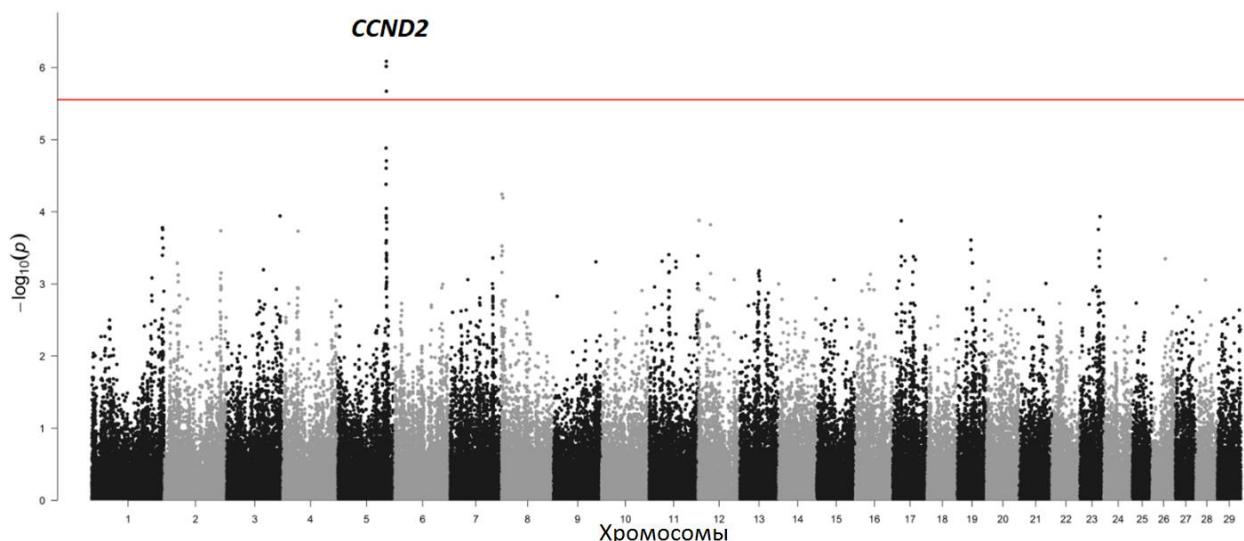


Рисунок 2. Манхэттенский график, иллюстрирующий результаты ПГАА массы тела КРС с использованием отдельных SNP. Красная линия указывает порог значимости ($q=0.05$).

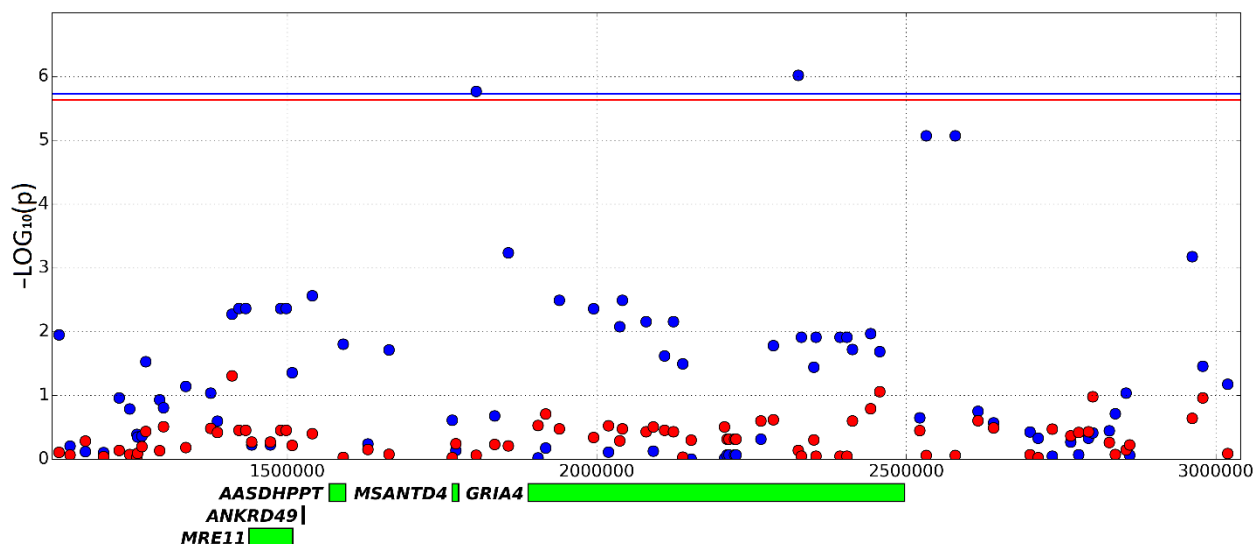


Рисунок 3. Сигналы ассоциации SNP с адаптивной реакцией на сильный холод (синим) и массой тела (красным) в районе *MSANTD4-GRIA4* на хромосоме 15. Координаты указаны для сборки ARS-UCD1.2. Синяя горизонтальная линия указывает предполагаемый уровень достоверности ($q=0.10$) для ассоциации с адаптивной реакцией. Красная горизонтальная линия указывает значимый уровень достоверности ($q=0.05$) для ассоциации с массой тела.

Стоит отметить, что результаты полученные в ПГАА массы тела хорошо согласуются с данными литературы: для наиболее вероятного гена-кандидата *CCND2* ранее была показана ассоциация с ежедневным привесом у герефордов [Seabury et al., 2017], ростом и индексом массы тела у человека [Steinthorsdottir et al., 2014], весом тела у мышей [Brown, Moore, 2012], приростом мышечной массы у кур [Willson et al., 2018] и отложением жира у свиней [Oliveira et al., 2022; Li et al., 2022]. Кроме того, сигнал вблизи гена *CCND2* был независимо воспроизведен в работе

Karacaöğren на основе наших данных, помещенных в открытый доступ [Karacaöğren, 2020].

Таким образом, можно утверждать, что район генов *MSANTD4-GRIA4* не ассоциирован с массой тела у исследуемых пород. В этой связи, МОС по аллелям SNP в районе *MSANTD4-GRIA4*, направленная на улучшение адаптивной реакции на сильный холод, вероятнее всего не приведет к снижению массы тела животных [Arthur et al., 2001; Coyne et al., 2019].

В качестве комплементарного подхода нами был проведен анализ данных ресеквенирования животных с крайними фенотипами по адаптивной реакции на сильный холод. По результатам F_{st} -анализа методом «скользящих окон» были получены 100 443 перекрывающихся района размером 50 тыс. п.н. (рисунок 4), из которых наивысшее значение взвешенного F_{st} равное 0.54 имел район BTA12:38850001-38900000, не содержащий известных генов согласно базам данных геномных аннотаций RefSeq, Ensembl и UCSC [Zhao, Zhang, 2015].

По итогам вычисления и суммирования рангов по взвешенному F_{st} , разнице частот между контрастными группами и FAETH-оценкам, 17 391 SNP имели сумму рангов < 0.10 . Из них, 635 являлись синонимичными вариантами, 258 – миссенс-вариантами, и 91 относились к сплайс-вариантам (заменам в области сайтов сплайсинга).

Для соответствующих генов содержащих SNP с суммой рангов < 0.10 был проведен поиск данных литературы в базе PUBMED (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>). В результате, для 30 генов-кандидатов были найдены данные по связи с терморегуляцией и адаптацией к холоду у животных. Для каждого гена имелся как минимум один SNP-кандидат. Четыре гена, включая *GRIA4*, идентифицированный в ПГАА адаптивной реакции, были вовлечены в адаптацию к холоду у КРС (наряду с *THBS1*, *CCL5* и *IFNGR1*). Еще семь генов были связаны с адаптацией КРС к жаре, но при этом у других видов животных они также были ассоциированы и с холодовой адаптацией (*DDX23*, *COX17*, *PLA1A*, *NR1I2*, *ATF1*, *PRKAG1* и *PPT1*). В гене *GRIA4* были найдены ряд кандидатных SNP, попадающих в верхнюю часть ранжированного списка (например, rs207668622, rs110930457 и rs137539466). Все эти SNP расположены в интронной области этого гена.

Среди других генов, наиболее перспективным кандидатом является ген тромбоспондина-1 *THBS1*, содержащий две миссенс-замены (rs43707861 и rs17870352). Pokharel и соавторы выявили значимое снижение уровня экспрессии мРНК *THBS1* в крови зимой у якутского скота по сравнению с голштинским [Pokharel et al., 2019]. Также, имеются данные по его возможному участию в адаптации к холоду у яков [Zheng et al., 2022], свиней [Lin et al., 2017] и морских млекопитающих (ламантинов и китообразных) [Yuan et al., 2021]. На культуре мышечных миобластов показано, что ген *THBS1* вовлечен в ответ на холодовой стресс *in vitro* [Lemieux et al., 2022]. Кроме того, *THBS*, вероятно, участвует в адаптации КРС к жаре [Bhardwaj et al., 2021].

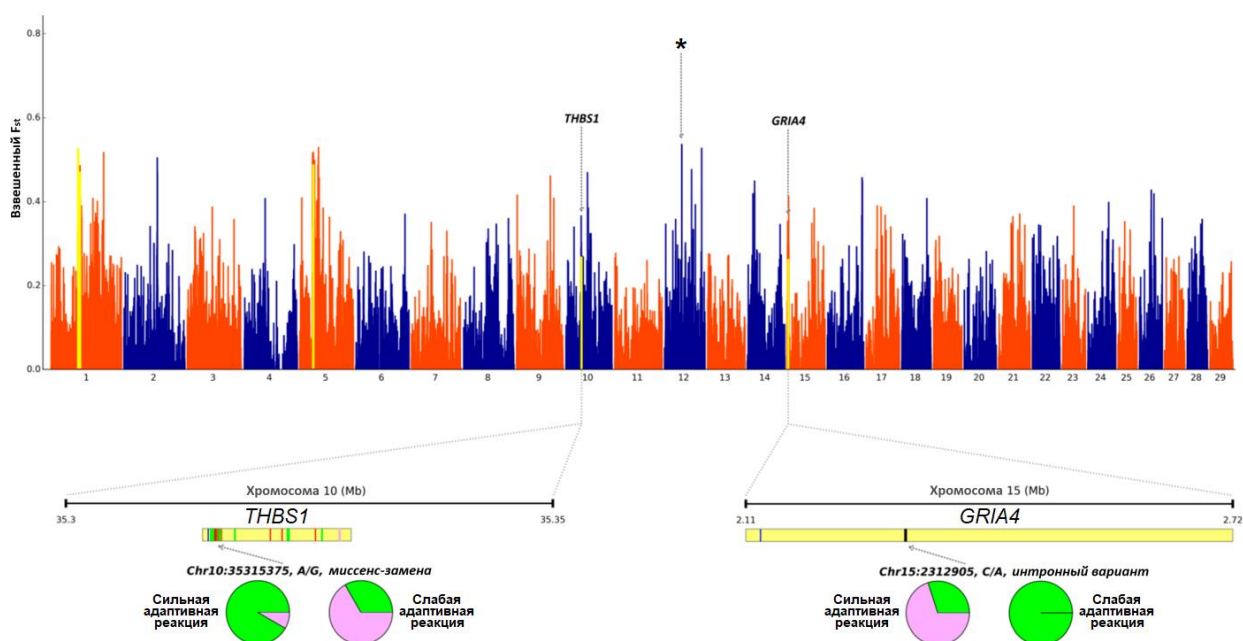


Рисунок 4. Примеры SNP-кандидатов адаптивной реакции КРС на сильный холод по данным ресеквенирования и их геномные позиции. Звездочкой обозначен район генома с наивысшим значением взвешенного F_{st} . Круговые диаграммы отображают частоты аллелей в контрастных группах. Референсный аллель окрашен зеленым, альтернативный – сиреневым.

По результатам анализа функционального обогащения списка генов пересекающихся с 1% районов с наивысшим значением взвешенного F_{st} , статистически значимого уровня ($q < 0.05$) достигли восемь терминов: «Меланогенез» ($q = 1.51 \times 10^{-3}$), «Адренергическая сигнализация в кардиомиоцитах» ($q = 7.27 \times 10^{-3}$), «Синдром Кушинга» ($q = 7.27 \times 10^{-3}$), «Сигнальные пути кальция» ($q = 1.27 \times 10^{-2}$), «Секреция инсулина» ($q = 1.9 \times 10^{-2}$), «Синтез и секреция альдостерона» ($q = 3.26 \times 10^{-2}$), «Сигнальные пути окситоцина» ($q = 4.59 \times 10^{-2}$) и «Сигнальный путь *Rap1*» ($q = 4.91 \times 10^{-2}$).

Вероятно, обогащение по термину «Меланогенез» обусловлено тем, что у КРС сигнальные и метаболические пути, связанные с синтезом меланинов вовлечены в контроль окраски шерсти [Gutiérrez-Gil et al., 2007; Seo et al., 2007]. Окраска влияет на способность шерсти к поглощению солнечной радиации, что имеет важное значение для теплового баланса у КРС [Dikmen et al., 2017; Scasta, 2021]. Обогащение по термину «Адренергическая сигнализация в кардиомиоцитах» может быть связано с тем, что для удовлетворения возросших энергетических нужд органов/тканей, осуществляющих теплопродукцию в условиях холода, млекопитающие, в том числе КРС, повышают частоту сердечных сокращений [Morrison et al., 2008; Kim et al., 2023; Wang et al., 2023]. Связь секреции инсулина с температурным гомеостазом при низких температурах, вероятно, опосредована его участием в адаптивном термогенезе в бурой жировой ткани [Heine et al., 2018]. Обогащение по сигнальным путям окситоцина может быть обусловлено участием этого гормона в адаптивном термогенезе у млекопитающих, а также в стимуляции

скучивания – сбивания животных в плотные группы, что снижает теплопотери при холоде [Takayanagi et al., 2008; Kasahara et al., 2015; Harshaw et al., 2018].

Чтобы выявить, какие хозяйственно-ценные признаки могли измениться под влиянием адаптации к холоду, мы провели сравнение выборок герефордов сибирской селекции и зарубежных герефордов по списку кандидатных полиморфизмов, ранее ассоциированных с рядом хозяйственно важных признаков. В результате, были выявлены пять локусов, статистически значимо ($q < 0.20$) различающиеся по частотам аллелей между популяциями герефордов. Из них, два SNP, расположенные в гене *CAPN1* (rs17871051 и rs17872050), были связаны с нежностью мяса [McClure et al., 2012]. При этом аллели, благоприятствующие более нежному мясу, имели меньшую частоту у отечественных животных. Три SNP были связаны с воспроизводительными функциями. В частности, rs43705173 и rs110942700, расположенные в генах *STAT1* и *STAT3*, соответственно, ассоциированы с выживаемостью эмбрионов [Khatib et al., 2009]. Аллели, негативно влияющие на выживаемость, при этом, имели меньшую представленность у сибирских герефордов. SNP rs208753173 в гене *STAT5A*, связан с оплодотворяемостью ооцитов *in vitro* [Khatib et al., 2008]. Российская популяция имела меньшую частоту нежелательного аллеля этого полиморфизма.

Вероятно, межпопуляционные отличия по локусам, ассоциированным с репродуктивными признаками, могут отражать восстановление воспроизводительной способности животных в ряду поколений после импорта в Алтайский край. Подобные примеры известны и у других сельскохозяйственных видов. Так, у импортированных в новую среду свиней породы ландрас снижалась выживаемость поросят и уменьшался размера помета. Однако, в течение нескольких поколений у животных происходило восстановление обоих воспроизводительных качеств [Klimas, Klimienė, 2011; Медведева, 2016].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе мы осуществили поиск генов- и SNP-кандидатов температурного гомеостаза и холодовой адаптации в сибирских популяциях мясных пород крупного рогатого скота. Полногеномный анализ ассоциаций на основе SNP и гаплотипов показал, что район генов *MSANTD4-GRIA4* ассоциирован с выраженностью адаптивной терморегуляторной реакции на сильный холод в выборке животных исследуемых мясных пород КРС. Ген *GRIA4*, являющийся основным кандидатом в этом районе, предположительно реализует свою функцию путем участия в проведении возбуждающих сигналов от центра химической терморегуляции в гипоталамусе. Проведенный на этой же выборке ПГАА массы тела не выявил достоверных сигналов в окрестностях генов *MSANTD4* и *GRIA4*. Таким образом, маркер-ориентированная селекция по аллелям SNP в районе *MSANTD4-GRIA4*, направленная на улучшение адаптивной реакции на сильный холод, вероятно, не приведет к снижению массы тела животных.

В качестве комплементарного подхода мы проанализировали данные ресеквенирования животных с крайними фенотипами. По итогам поиска среди кандидатных SNP, мы обнаружили ряд полиморфизмов в генах, ранее ассоциированных с температурной адаптацией у крупного рогатого скота и у других видов млекопитающих, включая вышеупомянутый ген *GRIA4*.

Дополнительно, мы провели сравнение выборок герефордов сибирской селекции и зарубежных герефордов по списку кандидатных полиморфизмов. Проведенный анализ выявил отличия по SNP, ассоциированным с репродукцией и нежностью мяса. Различия, наблюдаемые по локусам репродуктивных признаков, вероятно, отражают восстановление воспроизводительной способности животных в ходе адаптации к климату Сибири.

Таким образом, проведенная работа вносит вклад в понимание генетических механизмов адаптации к холоду у крупного рогатого скота, и указывает на SNP, потенциально пригодные для использования в маркер-ориентированной и геномной селекции.

ВЫВОДЫ

1. С помощью полногеномного анализа ассоциаций на основе SNP и гаплотипов показано, что район генов *MSANTD4-GRIA4* ассоциирован с выраженностью адаптивной терморегуляторной реакции на сильный холод в выборке герефордов сибирской селекции и животных близкородственной казахской белоголовой породы.
2. Полногеномный анализ ассоциаций с массой тела, проведенный на этой же выборке, идентифицировал район генома, содержащий известный ген-кандидат массы тела животных *CCND2*, но не выявил достоверных сигналов в окрестностях генов *MSANTD4* и *GRIA4*.
3. Анализ данных полногеномного ресеквенирования двух групп животных, имеющих крайние фенотипы по выраженности адаптивной терморегуляторной реакции на сильный холод, выявил ряд генов-кандидатов и SNP, из которых гены *GRIA4*, *COX17*, *IFNGR1*, *DDX23*, *PPT1*, *THBS1*, *CCL5*, *ATF1*, *PLA1A*, *PRKAG1* и *NR1I2*, по данным литературы, ранее были ассоциированы с адаптацией КРС к холоду или жаре.
4. Сравнение выборок герефордов сибирской селекции и зарубежных герефордов по полиморфизмам, ассоциированным с хозяйственно-важными признаками, показало, что частоты аллелей ряда SNP в генах семейства *STAT*, ассоциированных по данным литературы со снижением выживаемости эмбрионов и оплодотворяемости ооцитов *in vitro*, достоверно ниже у животных сибирской селекции. Эти различия могут быть связаны с восстановлением воспроизводительной способности импортных животных при длительном разведении в условиях Сибири.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Юдин Н.С., **Игошин А.В.**, Ларкин Д.М. Молекулярные маркеры адаптации к холодному климату у крупного рогатого скота // Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 9. – №. 1. – С. 5-14.

Igoshin A.V., Romashov G.A., Chernyaeva E.N., Elatkin N.P., Yudin N.S., Larkin D.M. Comparative analysis of allele frequencies for DNA polymorphisms associated with disease and economically important traits in the genomes of Russian and foreign cattle breeds // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2022. – Vol. 26. – №. 3. – P. 298-307. IF=0.98

Igoshin A.V., Yudin N.S., Aitnazarov R.B., Yurchenko A.A., Larkin D.M. Whole-Genome Resequencing Points to Candidate DNA Loci Affecting Body Temperature under Cold Stress in Siberian Cattle Populations // Life. – 2021. – Vol. 11. – №. 9. – P. 959. IF=3.2

Igoshin A.V., Yurchenko A.A., Belonogova N.M., Petrovsky D.V., Aitnazarov R.B., Soloshenko V.A., Yudin N.S., Larkin D.M. Genome-wide association study and scan for signatures of selection point to candidate genes for body temperature maintenance under the cold stress in Siberian cattle populations // BMC Genetics. – 2019. – Vol. 20. – №.1. – P. 26. IF=3.5

Igoshin A.V., Yudin N.S., Belonogova N.M., Larkin D.M. Genome-wide association study for body weight in cattle populations from Siberia // Animal Genetics. – 2019. – Vol. 50. – №. 3. – P. 250-253. IF=1.8