

ПОЛИМОРФИЗМ В ГЕНАХ-КАНДИДАТАХ,
СВЯЗАННЫХ С РЕПРОДУКТИВНЫМИ ФУНКЦИЯМИ
У ОВЕЦ (*Ovis spp.*)*

Т.Е. ДЕНИСКОВА^{1, 2} ✉, А.В. ШАХИН¹, А. ESMAILZADEN³, А.В. ДОЦЕВ¹,
Н.А. ЗИНОВЬЕВА¹

Репродуктивные качества значительно влияют на себестоимость овцеводческой продукции. Главные гены-кандидаты репродуктивных качеств овец — *BMP15*, *GDF9* и *BMPR1B*, мутации в которых повышают число яйцеклеток при овуляции и число ягнят на ягнение. Периодически сообщается о сегрегации новых мутаций в расширяющемся породном спектре. Поэтому поиск новых SNPs в ранее не исследованных породах актуален для углубления знаний о генетических механизмах, лежащих в основе плодовитости овец. В нашей работе впервые проведен сравнительный анализ полных нуклеотидных последовательностей генов *GDF9*, *BMP15* и *BMP15B* у овец романовской породы, других пород домашних овец (*Ovis aries* L.) и диких родственных видов. Идентифицированы SNPs, наиболее сильно различающиеся при сопоставлении романовской породы с автохтонными породами домашних овец России и Персидского Нагорья, а также диких видов рода *Ovis*. Впервые изучен полиморфизм в главных генах-кандидатах пролиферативных признаков у архара (*O. ammon* L.) и муфлона (*O. orientalis* L.). Выявлены SNPs, фиксированные у архара и домашней овцы. Исследования проводили в 2022-2023 годах в ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Анализировали последовательности полных геномов домашних овец — романовской ($n = 9$), других российских ($n = 7$) и иранских ($n = 6$) пород, диких видов рода *Ovis* — азиатских муфлонов (*O. orientalis*, $n = 16$) и архаров (*O. ammon*, $n = 4$). Выравнивание на референсный геном выполнялось с помощью инструментов *bwa-mem2* и *SAMtools*. Из полных геномов извлечены последовательности генов *GDF9*, *BMP15* и *BMP15B*, в которых на основе расчета значений F_{ST} для каждого SNP для каждой пары групп проведен поиск наиболее различающихся SNPs. При сравнении последовательностей генов у романовских овец и других пород наибольшие различия были обнаружены в гене *BMPR1B* ($F_{ST} = 0,562-0,749$) в отличие от генов *BMP15* ($F_{ST} = 0,051-0,374$) и *GDF9* ($F_{ST} = 0,037-0,660$). Сравнение последовательностей генов у романовских овец и архара выявило наличие фиксированных SNPs ($F_{ST} = 1$), при этом в гене *GDF9* был идентифицирован один такой SNP. Наибольшие значения F_{ST} при сравнении овец романовской породы с муфлоном составили 0,702-0,780 (ген *BMPR1B*), 0,113-0,645 (ген *BMP15*) и 0,338-0,512 (ген *GDF9*). Таким образом, мы идентифицировали целевые SNPs и планируем продолжить изучение их влияния на репродуктивные признаки у романовских овец в следующих работах.

Ключевые слова: SNP, гены-кандидаты, *Ovis aries*, *Ovis ammon*, *Ovis orientalis*, домашняя овца, дикие виды овец, плодовитость.

Плодовитость — важный экономический признак, влияющий на себестоимость овцеводческой продукции. У пород, обитающих в средних и высоких широтах, все еще проявляется сезонность размножения, при этом сезон репродуктивной активности у овец короче, чем у баранов, и обычно длится с конца лета до января (1). Для удлинения сезона размножения синхронизируют половой цикл овец, что становится важным элементом современных программ воспроизводства (2). Однако особое внимание селекционеров привлекает возможность маркер-ориентированной селекции по закреплению желательных аллелей в целевых генах-кандидатах, ассоциированных с повышением плодовитости у овец. Во многих работах сообщалось о достоверном влиянии генов *BMP15*, *GDF9* и *BMPR1B* на репродуктивные признаки у овец. Эти гены называют главными генами-кандидатами репродуктивных качеств овец. Ген костного морфогенетического белка 15 (bone morphogenetic protein 15, BMP 15) *BMP15* и фактора роста и дифференцировки 9 (growth differentiation factor 9, GDF9) *GDF9* экспрессируются в яичниках и стимулируют рост фолликулов (3, 4), способствуют пролиферации

* Для проведения исследований использовали оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и ННФИ (согласно гранту № 98028814) в рамках научного проекта № 20-516-56002.

гранулезных клеток (5, 6), влияют на сигнальные пути жизнеспособности клеток (7, 8), а также модулируют другие факторы роста и гормоны (9-11).

BMP15 — это ключевой ген-кандидат, контролирующей функцию яичников. В гене идентифицированы несколько значимых мутаций: *FecX^I* (Fecundity Inverdale), *FecX^H* (Fecundity Hanna) (12), *FecX^B* (Fecundity Belclare), *FecX^G* (Fecundity Galway) (13), *FecX^L* (Fecundity Lacaune) (14), *FecX^R* (Fecundity Rasa Aragonesa) (15, 16), *FecX^{Bar}* (Barbarine) (17). Фенотипическое проявление всех перечисленных мутаций в целом единообразно: гетерозиготный генотип приводит к повышенной плодовитости, а гомозиготный по мутантному аллелю — к стерильности. Однако гомозиготные по мутантному аллелю овцы пород французский гриветт (Grivette) (*FecX^G*) и польская олькуска (Olkuska) (*FecX^O*) обладают сверхплодовитостью (hyperprolificacy) (18).

В гене рецептора 1В костного морфогенетического белка (*BMPRIВ*) идентифицирована первая мутация (аллель *FecB^B*, или Boogola), ассоциированная с плодовитостью. Этот генетический вариант, впервые выявленный у меринсов бурула (Boogoola Merino), оказывает аддитивное влияние на число яйцеклеток при овуляции и частично доминирующее влияние на число ягнят на одно ягнение (19-21). Затем *FecB^B* обнаружили у бенгальских овец гароле (Garole, или Bengal) из Индии (22, 23), у яванезских тошехвостых овец (Javanese) в Индонезии (24), у пород ху (Hu), хан (Small Tail Han), хуянг (Huyang), селе (Cele), дуоланг (Duolang) и баянбулак (Bayanbulak) из Китая (25-27), бонпала (Bonpala) из Индии (28) и калекухи (Kalehkoohi) из Ирана (29).

В гене *GDF9* (*FecG*) выявлены три мутации — *FecG^H*, *FecG^T* и *FecG^E*. Мутации *FecG^H* (Fecundity High Fertility) (13) и *FecG^T* (Fecundity Thoka) (30) имели фенотипический паттерн наследования, ассоциированный со стерильностью самок — гомозиготных носителей мутаций. Третью мутацию в гене *GDF9* — *FecG^E* (Fecundity Embrara), связанную с плодовитостью, идентифицировали в бразильской линии породы Санта-Инес (Santa Inks) (31), в которой впервые был продемонстрирован новый для гена *GDF9* фенотип, характеризующийся не стерильностью, а, наоборот, увеличением числа яйцеклеток при овуляции у овец, гомозиготных по *FecG^E*, по сравнению с немутантными особями — $2,22 \pm 0,12$ против $1,22 \pm 0,11$ при числе ягнят на одно ягнение $1,78$ против $1,13$ (31). В 2014 году появилось сообщение еще об одной мутации в сайте протеазного расщепления *GDF9* (*FecG^V*, или Vacaria), обнаруженной у породы иль-де-франс (Île-de-France) (32). Кроме того, несколько однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) в гене *GDF9* влияют на число ягнят на одно ягнение у китайской локальной породы ху (Hu) (33).

Анализ научных публикаций показывает, что в мировом генофонде пород овец идентифицированы аллели, которые как в гетеро-, так и в гомозиготном состоянии связаны с повышенной плодовитостью, но также описан обратный эффект, когда аллели ассоциированы со стерильностью у гомозиготных по ним самок. Из этого следует, что изучение полиморфизма главных генов-кандидатов репродуктивных качеств (особенно у пород, на которых такие исследования ранее не проводились) становится крайне важным для практической селекции, расширяя представления о генетическом контроле репродуктивной функции у овец.

В настоящей работе мы впервые сравнили полные нуклеотидные последовательности генов *GDF9*, *BMP15* и *BMP15B* у овец романовской породы, характеризующейся высокой плодовитостью, и у других пород домашних овец, а также у диких родственных видов. Идентифицированы SNPs, наиболее сильно различающиеся у романовской овцы и автохтонных пород домашних овец из России и Персидского Нагорья, а также у диких видов рода *Ovis*. Впервые изучен полиморфизм в главных генах-кандидатах

воспроизводительных качеств у архара (*O. ammon*) и муфлона (*O. orientalis*). Выявлены SNPs, фиксированные у архара и домашней овцы.

Цель работы — изучить полиморфизм в главных генах воспроизводительных признаков (*GDF9*, *BMP15* и *BMP15B*) у высокоплодовитых овец романовской породы в сравнении с малопродуктивными породами и их дикими сородичами.

Методика. Изученная выборка включала домашних овец (*Ovis aries* L.) романовской породы ($n = 9$), других российских пород — тушинской ($n = 3$) и карачаевской ($n = 4$) и иранских пород афшари (Afshari), гезель (Ghezeli), серая ширазская (Grey Shiraz), шал (Shal), моххани (Moghani), а также каракульская порода из популяции, разводимой на территории Ирана ($n = 6$). Дикие виды были представлены азиатскими муфлонами (*Ovis orientalis* L.) ($n = 16$) и архарами (*O. ammon* L.) ($n = 4$).

Образцы ткани (ушной выщип) домашних овец, в том числе тушинской ($n = 4$), карачаевской ($n = 4$) и романовской ($n = 9$) пород, и архаров ($n = 4$) были предоставлены УНУ «Банк генетического материала домашних и диких видов животных и птицы» в составе сетевой биоресурсной коллекции СБРК СХЖ (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста; соглашение с Минобрнауки России № 075-15-2021-1037 от 28 сентября 2021 года).

ДНК выделяли с использованием набора ДНК-Экстрен-2 (ООО «Синтол», Россия). Концентрацию ДНК в растворе измеряли на флуориметре Qubit® 4.0 («Invitrogen/Life Technologies», США), OD_{260/280} (контроль качества) — на спектрофотометре NanoDrop™ 8000 («Thermo-Fisher Scientific, Inc.», США). Минимальное количество ДНК при создании библиотек для секвенирования составляет 3 мкг, поэтому пороговое значение концентрации препаратов ДНК было установлено на уровне 30 нг/мкл при объеме не менее 100 мкл. Оптимальное соотношение OD_{260/280} составляло от 1,8 и выше. При получении препаратов с меньшей концентрацией ДНК выделяли повторно, увеличив количества исходного материала.

Полногеномное секвенирование проводили по NGS (next generation sequencing) (секвенатор NovaSeq 6000, «Illumina, Inc.», США). Библиотеки для секвенирования были подготовлены с использованием наборов TruSeq DNA Nano Library Prep kit («Illumina, Inc.», США) и Accel-NGS® 2S Plus DNA Library Kit (IDT) for Illumina® Platforms («Swift Biosciences, Inc.», США).

Последовательности полных геномов иранских пород овец были предоставлены профессором А. Esmailizadeh.

Последовательности полных геномов муфлонов (*O. orientalis*) были загружены из публично доступной онлайн базы данных NCBI (проект PRJNA624020, ID 624020) (34, 35). Выравнивание на референсный геном *Ovis aries rambouillet.Oar_rambouillet_v1.0.dna.toplevel.fa.gz* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/Ovis_aries_rambouillet/Info/Index/?db=core) проводили с помощью инструментов bwa-mem2 (36) и SAMtools (37). Из полных геномов были извлечены полные нуклеотидные последовательности генов-кандидатов воспроизводительных признаков овец (*GDF9*, *BMP15* и *BMP15B*), в которых осуществили поиск генетических вариантов. Гены были найдены согласно их координатам в референсном геноме *Ovis aries rambouillet.Oar_rambouillet_v1.0.dna.toplevel.fa.gz*. Координаты включали номер хромосомы, нуклеотидную позицию начала гена, нуклеотидную позицию конца гена, указание цепи ДНК (1 — прямая, -1 — обратная). Были использованы следующие координаты: X:56594565-56601245:-1 для гена *BMP15* (запись в Ensembl ENSOARG00020012408); 5:46544645-46547585:-1 для гена *GDF9* (запись в Ensembl ENSOARG00020021050); 6:33990928-34214488:-1 для гена

BMP15B (запись в Ensembl ENSOARG00020020206.1). Непосредственное извлечение полных последовательностей изучаемых генов проводили с использованием инструментов *bwa-mem2* и *SAMtools* по авторским скриптам.

Для проведения анализа были сформированы следующие группы сравнения: романовская порода против других российских пород; романовская порода против иранских пород; романовская порода против муфлона; романовская порода против архара.

Наиболее различающиеся SNPs в анализируемых генах выбирали на основании расчета значений F_{ST} для каждого SNP внутри каждого гена, выполненного с использованием R пакета *StAMPP* (38).

Результаты. По значениям F_{ST} были выявлены SNPs, локализованные внутри генов *GDF9*, *BMP15* и *BMP15B*, которые наиболее различались при сравнении нуклеотидной последовательности этих генов у романовских овец и группы, включающей породы овец, разводимые на территории России и Ирана (табл. 1). В целом наибольшие различия в последовательностях были выявлены в гене *BMP15B* (F_{ST} от 0,609 до 0,749 при сравнении романовской породы с иранскими породами и F_{ST} от 0,562 до 0,701 при сравнении романовской породы с другими российскими породами), тогда как по генам *BMP15* (F_{ST} соответственно от 0,051 до 0,374 и от 0,065 до 0,126) и *GDF9* (F_{ST} соответственно от 0,037 до 0,580 и от 0,114 до 0,660) различия существенно меньше.

1. SNPs в генах-кандидатах воспроизводительных признаков *Ovis aries*, наиболее различающиеся у романовских овец и пород с низкой плодовитостью (ФГБНУ ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2020-2023 годы)

Группа сравнения	SNP	Позиция SNP	F_{ST}
Ген <i>BMP15</i> , локализованный на X-хромосоме			
Романовская порода ($n = 9$) и иранские породы ($n = 6$)	rs400940002	56599692	0,374
	rs426251007	56600582	0,185
	rs1090246541	56597586	0,149
	X:56597710	56597710	0,146
	rs1086873546	56596059	0,051
Романовская порода ($n = 9$) и российские породы ($n = 7$)	rs55628000	56595188	0,126
	X:56597676	56597676	0,111
	X:56597286	56597286	0,109
	X:56599717	56599717	0,109
	X:56600871	56600871	0,065
Ген <i>GDF9</i> , локализованный на хромосоме 5			
Романовская порода ($n = 9$) и иранские породы ($n = 6$)	rs160076413	46545932	0,580
	rs418388291	46546176	0,490
	rs421019907	46545415	0,416
	rs399579080	46545431	0,369
	rs594156088	46544743	0,037
Романовская порода ($n = 9$) и российские породы ($n = 7$)	rs160076413	46545932	0,660
	rs418388291	46546176	0,432
	rs421019907	46545415	0,309
	rs399579080	46545431	0,227
	rs160076408	46545688	0,114
Ген <i>BMP15B</i> , локализованный на хромосоме 6			
Романовская порода ($n = 9$) и иранские породы ($n = 6$)	rs409507123	34036290	0,749
	rs421851559	34036546	0,749
	rs425275620	34009200	0,703
	rs410857597	34053188	0,630
	rs426525353	34035758	0,609
Романовская порода ($n = 9$) и российские породы ($n = 7$)	rs400119613	34016579	0,701
	6:34091908	34091908	0,623
	6:34092013	34092013	0,623
	6:34113605	34113605	0,562
	rs417658413	34113624	0,562

Анализ нуклеотидных последовательностей изучаемых генов у романовских овец и архара показал наличие фиксированных SNPs ($F_{ST} = 1$), при этом в гене *GDF9* был выявлен только один такой SNP (5:46545406) (табл. 2).

Наибольшие значения F_{ST} для SNP, выявленные при сравнении овец романовской породы с муфлоном, составили 0,702-0,780 (ген *BMP15*), 0,113-0,645 (ген *BMP15*) и 0,338-0,512 (ген *GDF9*).

2. SNPs в генах-кандидатах воспроизводительных признаков, наиболее различающиеся у романовских овец *Ovis aries* и диких сородичей муфлона и архара (ФГБНУ ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2020-2023 годы)

Группа сравнения	SNP	Позиция SNP	F_{ST}
Ген <i>BMP15</i> , локализованный на X-хромосоме			
Романовская порода ($n=9$) и муфлоны (<i>O. orientalis</i>) ($n=16$)	rs400940002	56599692	0,645
	rs403715147	56597068	0,511
	X:56597710	56597710	0,260
	rs420350765	56599601	0,159
	X:56596503	56596503	0,113
Романовская порода ($n=9$) и архары (<i>O. ammon</i>) ($n=4$)	rs422668280	56595720	1
	X:56595843	56595843	1
	X:56595928	56595928	1
	rs412479434	56597103	1
	X:56597429	56597429	1
	X:56598037	56598037	1
	X:56598317	56598317	1
rs417053670	56599070	1	
Ген <i>GDF9</i> , локализованный на хромосоме 5			
Романовская порода ($n=9$) и муфлоны (<i>O. orientalis</i>) ($n=16$)	rs399579080	46545431	0,512
	rs421019907	46545415	0,481
	5:46546592	46546592	0,373
Романовская порода ($n=9$) и архары (<i>O. ammon</i>) ($n=4$)	5:46546650	46546650	0,338
	5:46545406	46545406	1
	rs425601341	46546485	0,767
	5:46546592	46546592	0,767
	rs160076408	46545688	0,746
rs427433335	46546966	0,680	
Ген <i>BMP15</i> , локализованный на хромосоме 6			
Романовская порода ($n=9$) и муфлоны (<i>O. orientalis</i>) ($n=16$)	rs424055720	34152408	0,780
	rs400936557	34121377	0,772
	rs400817842	34051068	0,744
	rs414227223	34059131	0,734
	rs400453556	34053288	0,705
	rs408680692	34058728	0,702
	rs403920069	34059147	0,702
	rs420236481	33995134	1
Романовская порода ($n=9$) и архары (<i>O. ammon</i>) ($n=4$)	6:34002894	34002894	1
	rs402116959	34003208	1
	rs401004280	34003416	1
	rs428477215	34005483	1

Некоторые SNPs были идентифицированы в более чем одном сравнительном анализе. Так, SNP rs400940002 и X:56597710 в гене *BMP15* различались при сравнении последовательностей этого гена у романовской породы как с иранскими породами домашних овец, так и с муфлоном.

Наибольшее число совпадений SNPs мы выявили в гене *GDF9*. SNPs rs160076413 и rs418388291 входили в число наиболее различающихся при сравнении романовской породы как с иранскими, так с российскими породами. SNPs rs421019907 и rs399579080 различались при сравнении романовской породы как с породами домашних овец, так и с муфлонами. SNP 5:46546592 был выявлен при сравнении последовательностей этого гена у романовской породы с муфлоном и архаром, но различие с архаром было выше ($F_{ST} = 0,767$ против $F_{ST} = 0,373$). Интересно, что SNP rs160076408 совпадал при сравнении как с российскими породами, так и с архарами.

В гене *BMP15* все идентифицированные SNPs были уникальными для каждой из сравниваемых групп.

Далее были выявлены генотипы в позициях, которые характеризовались значениями F_{ST} , равными 1 (табл. 3). У исследованных домашних

овец и у архара встречались исключительно противоположные гомозиготные генотипы. Полиморфизм в ряде анализируемых SNPs отмечался только у азиатских муфлонов. В других SNPs, в которых отсутствовал полиморфизм, генотип муфлона соответствовал генотипу домашних овец.

3. Генотипы в позициях SNPs в изучаемых выборках домашних овец (*Ovis aries*), муфлона (*O. orientalis*) и архара (*O. ammon*) (ФГБНУ ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2020-2023 годы)

SNP	Идентифицированные генотипы в изучаемых выборках		
	<i>O. aries</i>	<i>O. ammon</i>	<i>O. orientalis</i>
	Ген <i>BMP15</i> , локализованный на X-хромосоме		
rs422668280	GG	AA	GG
X:56595843	CC	TT	TT, CC
X:56595928	TT	CC	TT
rs412479434	AA	TT	AA
X:56597429	GG	AA	GG
X:56598037	CC	TT	CC
X:56598317	AA	GG	AA
rs417053670	GG	AA	GG
	Ген <i>GDF9</i> , локализованный на хромосоме 5		
5:46545406	AA	CC	AA
	Ген <i>BMPR1B</i> , локализованный на хромосоме 6		
rs420236481	AA	CC	AA, CA
6:34002894	GG	AA	GG, AG
rs402116959	CC	GG	GG, CC, GC
rs401004280	AA	TT	AT, TT, AA
rs428477215	GG	AA	AG, GG

Репродуктивные признаки, выражающиеся в итоге в числе ягнят на одно ягнение, значительно влияют на рентабельность овцеводства. В связи с тем, что большинство овец приносят одного ягненка, идентификация генов, ответственных за те или иные признаки фертильности, представляет большой научный и экономический интерес. В качестве вероятных кандидатов, оказывающих влияние на репродуктивные признаки, рассматриваются гены *SPOCK1* (возраст первого эструса), *GPR173* (медиатор цикличности яичников), *HB-EGF* (сигнализирует об успешном начале беременности), *SMARCA1* и *HMGN3a* (регулируют экспрессию генов во время эмбриогенеза) (39), *B4GALNT2* (развитие фолликулов, описана мутация *FecL^L* в породе лакон — Lacaune) (40). Кроме того, некоторые гены не обсуждаются как вероятные кандидаты для применения в маркерной селекции, но они могут в той или иной степени влиять на репродуктивные признаки у овец, в частности это гены *ESR1* (41), *FSHR* (42), *FTF* или *NR5A2* (43).

Тем не менее именно гены *BMP15*, *GDF9* и *BMPR1B* по-прежнему вызывают наибольший интерес у исследователей. Например, предпринимались попытки установить связь известных мутаций в этих генах (особенно в гене *GDF9*) у пород овец, разводимых в России. Были изучены частоты встречаемости аллелей гена *GDF9* (полиморфизм с.260G>A) у горноалтайской (44) и дагестанской горной (45) пород, а также у маньчжского меринуса (46).

В романовской породе проводился генетический скрининг по основным мутациям в гене *BMP15* (*FecX^G*, *FecX^H*, *FecX^I*, *FecX^L*, *FecX^B*) и гене *GDF9*, в результате чего было показано отсутствие этих мутантных аллелей у всех животных в выборке (47). Продолжение скрининга на расширенной выборке также не принесло заметных успехов (48). Тем не менее следует отметить, что в целом эти результаты согласуются с нашими данными, так как ни один идентифицированный SNP не совпадал с известными ранее заменами. Вероятно, уникальные репродуктивные качества могут быть связаны с генетическими вариантами в других геномных регионах.

В работах других исследователей (44-48) изучался полиморфизм в

установленных позициях, имеющих известный эффект в определенных породах, что не всегда гарантировало положительных результатов в других породах. В связи с этим мы избрали другой методический подход, основанный на анализе полных последовательностей генов *BMP15*, *GDF9* и *BMPRII*. Это позволило нам изучить полиморфизм в каждом SNP в этих генах и выявить SNPs, наиболее сильно различающиеся у высокоплодовитых и низкоплодовитых пород овец. Мы планируем продолжить исследования, чтобы установить, влияют ли эти замены на репродуктивные признаки у овец романовской породы.

Кроме того, в нашей работе были впервые изучены полные последовательности генов *BMP15*, *GDF9* и *BMPRII* у архара (*O. ammon*) и муфлона (*O. orientalis*). Следует отметить, что специфическое распределение генотипов в фиксированных SNPs у муфлона (наличие общих аллельных вариантов с архаром) могло быть вызвано событиями интрогрессии, происшедшими до или после одомашнивания. Эта гипотеза согласуется с данными анализа полных геномов диких видов, который представил доказательства адаптивной интрогрессии от архара в геномы европейского и азиатского муфлонов (49).

Итак, мы изучили полиморфизм в генах-кандидатах воспроизводительных признаков (*GDF9*, *BMP15* и *BMP15B*) у высокоплодовитых романовских овец в сравнении с породами с низкой плодовитостью и с дикими видами рода *Ovis* (архар и муфлон). Выявлены SNPs, которые наиболее сильно различаются у романовской породы по сравнению с российскими и иранскими породами, а также с дикими видами. Впервые изучен полиморфизм в главных генах-кандидатах признаков плодовитости у архара (*O. ammon*) и муфлона (*O. orientalis*). Выявлены SNPs, фиксированные у архара и домашней овцы.

¹ФГБНУ Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60, e-mail: horarka@yandex.ru ✉, alexshahin@mail.ru, asnd@mail.ru, n_zinovieva@mail.ru;

Поступила в редакцию
16 октября 2023 года

²Базовая кафедра генетических технологий в животноводстве, ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина,

109472 Россия, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23;

³Department of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman,

Iran, Kerman 76169-14111,
e-mail: aliesmaili@uk.ac.ir

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2023, V. 58, № 6, pp. 1046-1056

ANALYSIS OF POLYMORPHISM IN THE MAJOR GENES FOR REPRODUCTIVE TRAITS IN SHEEP (*Ovis* spp.)

T.E. Deniskova^{1, 2} ✉, A.V. Shakhin¹, A. Esmailzadeh³, A.V. Dotsev¹, N.A. Zinovieva¹

¹Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail horarka@yandex.ru (✉ corresponding author), alexshahin@mail.ru, asnd@mail.ru, n_zinovieva@mail.ru;

²Basic Department of Genetic Technologies in livestock Farming, Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 23, ul. Akademika Skryabina, Moscow, 109472 Russia;

³Department of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, Kerman 76169-14111, e-mail aliesmaili@uk.ac.ir

ORCID:

Deniskova T.E. orcid.org/0000-0002-5809-1262

Dotsev A.V. orcid.org/0000-0003-3418-2511

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

During the research, the equipment of the Center for Biological Resources and Bioengineering of Agricultural Animals (Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry) was used.

Sequences of the Iranian sheep complete genomes were provided by Professor A. Esmailizadeh, the Head of project No. 98028814 (from the Iranian side), implemented as part of a competition for the best basic research projects conducted by the Russian Foundation for Basic Research and the National Science Foundation of Iran.

Funded by RFBR and INSF (grant number No 98028814), within the project No. 20-516-56002

Final revision received October 16, 2023

doi: 10.15389/agrobiolgy.2023.6.1046eng

Accepted November 06, 2023

Abstract

The reproductive traits significantly affect the cost of production of sheep products. The *BMP15*, *GDF9* and *BMP1B* are the major genes for reproduction in sheep, mutations in which increase number of eggs per ovulation and litter size. The segregation of new mutations in an expanding breed diversity has been periodically reported. In this regard, the search for new SNPs in unexplored breeds is relevant to deepen knowledge about the genetic mechanisms underlying sheep prolificacy. In our work, for the first time, a comparative analysis of the complete nucleotide sequences of the *GDF9*, *BMP15* and *BMP15B* genes in the Romanov sheep was carried out in comparison with other breeds of domestic sheep (*Ovis aries* L.) and wild relatives. The most significantly varied SNPs were identified based on comparing the Romanov breed with autochthonous breeds of domestic sheep from Russia and the Persian Highlands, as well as wild *Ovis* species. Polymorphism in the major genes for reproduction in sheep was studied for argali (*O. ammon* L.) and mouflon (*O. orientalis* L.) for the first time. SNPs fixed in argali and domestic sheep were identified. The studies were conducted at Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry in 2022-2023. We analyzed whole genome sequences of domestic sheep, Romanov ($n = 9$), other Russian breeds ($n = 7$), Iranian breeds ($n = 6$) and wild *Ovis* species, the Asian mouflon (*O. orientalis*, $n = 16$) and argali (*O. ammon*, $n = 4$). Alignment to the reference genome was performed using bwa-mem2 and SAMtools. The sequences of the *GDF9*, *BMP15*, and *BMP15B* genes were extracted from the whole genomes, in which the most different SNPs were searched based on the calculation of F_{ST} values for each SNP for each pair of groups. Gene sequences comparison of the Romanov breed with other breeds showed that the greatest differences were identified in the *BMP1B* gene ($F_{ST} = 0.562-0.749$) when compared to the *BMP15* ($F_{ST} = 0.051-0.374$) and *GDF9* genes ($F_{ST} = 0.037-0.660$). Comparative analysis of gene sequences in the Romanov sheep and argali showed the presence of fixed SNPs ($F_{ST} = 1$), while one such SNP was identified in the *GDF9* gene. The highest F_{ST} values identified based on comparing Romanov breed sheep with mouflon were 0.702-0.780 (*BMP1B* gene), 0.113-0.645 (*BMP15* gene) and 0.338-0.512 (*GDF9* gene). Thus, target SNPs were identified the effect of which on reproductive traits in the Romanov sheep should be studied in future work.

Keywords: SNP, candidate genes, *Ovis aries*, *Ovis ammon*, *Ovis orientalis*, domestic sheep, wild species, prolificacy.

REFERENCES

1. Mamontova T.V., Selionova M.I., Aybazov A.-M.M. Sexual activity and sperm production of charolais and ile-de-france rams in different seasons of the year. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2021, 56(4): 752-762 (doi: 10.15389/agrobiolgy.2021.4.752eng).
2. Lukanina V.A., Chinarov R.Yu., Singina G.N. The effect of hormonal stimulation scheme and season on the efficiency of estrus synchronization in Romanov ewes (*Ovis aries* L.). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2023, 58(2): 333-344 (doi: 10.15389/agrobiolgy.2023.2.333eng).
3. Dong J., Albertini D.F., Nishimori K., Kumar T.R., Lu N., Matzuk M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 1996, 383(6600): 531-535 (doi: 10.1038/383531a0).
4. Nilsson E.E., Skinner M.K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biology of Reproduction*, 2002, 67(3): 1018-1024 (doi: 10.1095/biolreprod.101.002527).
5. Gilchrist R.B., Ritter L.J., Myllymaa S., Kaivo-Oja N., Dragovic R.A., Hickey T.E., Ritvos O., Mottershead D.G. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(Pt 18): 3811-3821 (doi: 10.1242/jcs.03105).
6. Spicer L.J., Aad P.Y., Allen D., Mazerbourg S., Hsueh A.J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *Journal of Endocrinology*, 2006, 189(2): 329-339 (doi: 10.1677/joe.1.06503).
7. Hussein T.S., Froiland D.A., Amato F., Thompson J.G., Gilchrist R.B. Oocytes prevent cumulus

- cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(Pt 22): 5257-5268 (doi: 10.1242/jcs.02644).
8. Orisaka M., Orisaka S., Jiang J.Y., Craig J., Wang Y., Kotsuji F., Tsang B.K. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(10): 2456-2468 (doi: 10.1210/me.2005-0357).
 9. Juengel J.L., Bodensteiner K.J., Heath D.A., Hudson N.L., Moeller C.L., Smith P., Galloway S.M., Davis G.H., Sawyer H.R., McNatty K.P. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Animal Reproduction Science*, 2004, 82-83: 447-460 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.021).
 10. Inagaki K., Shimasaki S. Impaired production of BMP-15 and GDF-9 mature proteins derived from proproteins with mutations in the proregion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 328 (1-2): 1-7 (doi: 10.1016/j.mce.2010.05.017).
 11. Otsuka F., McTavish K.J., Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*, 2011, 78(1): 9-21 (doi: 10.1002/mrd.21265).
 12. Galloway S.M., McNatty K.P., Cambridge L.M., Laitinen M.P., Juengel J.L., Jokiranta T.S., McLaren R.J., Luiro K., Dodds K.G., Montgomery G.W., Beattie A.E., Davis G.H. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 2000, 25(3): 279-283 (doi: 10.1038/77033).
 13. Hanrahan J.P., Gregan S.M., Mulsant P., Mullen M., Davis G.H., Powell R., Galloway S.M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 2004, 70 (4): 900-909 (doi: 10.1095/biolreprod.103.023093).
 14. Bodin L., Di Pasquale E., Fabre S., Bontoux M., Monget P., Persani L., Mulsant P. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology*, 2007, 148(1): 393-400 (doi: 10.1210/en.2006-0764).
 15. Martinez-Royo A., Jurado J.J., Smulders J.P., Martí J.I., Alabart J.L., Roche A., Fantova E., Bodin L., Mulsant P., Serrano M., Folch J., Calvo J.H. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Animal Genetics*, 2008, 39(3): 294-297 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2008.01707.x).
 16. Monteagudo L.V., Ponz R., Tejedor M.T., Lavina A., Sierra I. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Animal Reproduction Science*, 2009, 110(1-2): 139-146 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.01.005).
 17. Lassoud N., Benkhilil Z., Woloszyn F., Rejeb A., Aouina M., Rejik M., Fabre S., Bedhiaf-Romdhani S. FecX Bar a novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine sheep. *BMC Genetics*, 2017, 18(1): 43 (doi: 10.1186/s12863-017-0510-x).
 18. Demars J., Fabre S., Sarry J., Rossetti R., Gilbert H., Persani L., Tosser-Klopp G., Mulsant P., Nowak Z., Drobik W., Martyniuk E., Bodin L. Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genetics*, 2013, 9(4): e1003482 (doi: 10.1371/journal.pgen.1003482).
 19. Mulsant P., Lecerf F., Fabre S., Schibler L., Monget P., Lanneluc I., Pisselet C., Riquet J., Monniaux D., Callebaut I., Cribiu E., Thimonier J., Teyssier J., Bodin L., Cognié Y., Chitour N., Elsen J.M. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(9): 5104-5109 (doi: 10.1073/pnas.091577598).
 20. Souza C.J., MacDougall C., Campbell B.K., McNeilly A.S., Baird D.T. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRI1B) gene. *Journal of Endocrinology*, 2001, 169(2): R1-6 (doi: 10.1677/joe.0.169r001).
 21. Wilson T., Wu X.Y., Juengel J.L., Ross I.K., Lumsden J.M., Lord E.A., Dodds K.G., Walling G.A., McEwan J.C., O'Connell A.R., McNatty K.P., Montgomery G.W. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(4): 1225-1235 (doi: 10.1095/biolreprod64.4.1225).
 22. Davis G.H., Galloway S.M., Ross I.K., Gregan S.M., Ward J., Nimbkar B.V., Ghalsasi P.M., Nimbkar C.G., Gray G.D., Subandriyo, Inounu I., Tiesnamurti B., Martyniuk E., Eythorsdottir E., Mulsant P., Lecerf F., Hanrahan J.P., Bradford G.E., Wilson T. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biology of Reproduction*, 2002, 66(6): 1869-1874 (doi: 10.1095/biolreprod66.6.1869).
 23. Polley S., De S., Brahma B., Mukherjee A., Vinesh P.V., Batabyal S., Arora J.S., Pan S., Samanta A.K., Datta T.K., Goswami S.L. Polymorphism of BMPRI1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 2010, 42(5): 985-993 (doi: 10.1007/s11250-009-9518-1).
 24. Bradford G.E., Inounu I., Iniguez L.C., Tiesnamurti B., Thomas D.L. The prolificacy gene of Javanese sheep. In: *Major genes for reproduction in sheep*. J.M. Elsen, L. Bodin, J. Thimonier (eds.). Inra, Paris, France, 1991.

25. Davis G.H. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 2005, 37(Suppl. 1): 11-23 (doi: 10.1186/1297-9686-37-S1-S11).
26. Hua G.H., Yang L.G. A review of research progress of *FecB* gene in Chinese breeds of sheep. *Animal Reproduction Science*, 2009, 116(1-2): 1-9 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.01.001).
27. Zuo B., Qian H., Wang Z., Wang X., Nisa N., Bayier A., Ying S., Hu X., Gong C., Guo Z., Wang F. A study on BMPR-IB genes of Bayanbulak sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2013, 26(1): 36-42 (doi: 10.5713/ajas.2012.12238).
28. Roy J., Polley S., De S., Mukherjee A., Batabyal S., Pan S., Brahma B., Datta T.K., Goswami S.L. Polymorphism of fecundity genes (*FecB*, *FecX*, and *FecG*) in the Indian Bonpala sheep. *Animal Biotechnology*, 2011, 22(3): 151-162 (doi: 10.1080/10495398.2011.589239).
29. Mahdavi M., Nanekarani S., Hosseini S.D. Mutation in *BMPR-IB* gene is associated with litter size in Iranian Kolehkoohi sheep. *Animal Reproduction Science*, 2014, 147(3-4): 93-98 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.04.003).
30. Nicol L., Bishop S.C., Pong-Wong R., Bendixen C., Holm L.E., Rhind S.M., McNeilly A.S. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific *GDF9* gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*, 2009, 138(6): 921-933 (doi: 10.1530/REP-09-0193).
31. Silva B.D., Castro E.A., Souza C.J., Paiva S.R., Sartori R., Franco M.M., Azevedo H.C., Silva T.A., Vieira A.M., Neves J.P., Melo E.O. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (*GDF9*) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal Genetics*, 2011, 42(1): 89-92 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x).
32. Souza C.J., McNeilly A.S., Benavides M.V., Melo E.O., Moraes J.C. Mutation in the protease cleavage site of *GDF9* increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Animal Genetics*, 2014, 45(5): 732-739 (doi: 10.1111/age.12190).
33. Li Y., Jin W., Wang Y., Zhang J., Meng C., Wang H., Qian Y., Li Q., Cao S. Three complete linkage SNPs of *GDF9* gene affect the litter size probably mediated by *OCT1* in Hu sheep. *DNA Cell Biology*, 2020, 39(4): 563-571 (doi: 10.1089/dna.2019.4984).
34. *European Nucleotide Archive (ENA)*. Available: <https://www.ebi.ac.uk/>. No date.
35. *The National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. No date.
36. Vasimuddin M., Misra S., Li H., Aluru S. Efficient architecture-aware acceleration of BWA-MEM for multicore systems. *Proc. 2019 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS)*. Rio de Janeiro, Brazil, 2019: 314-324 (doi: 10.1109/IPDPS.2019.00041).
37. Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., Whitwham A., Keane T., McCarthy S.A., Davies R.M., Li H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Giga-Science*, 2021, 10(2): giab008 (doi: 10.1093/gigascience/giab008).
38. Pembleton L.W., Cogan N.O., Forster J.W. StAMPP: an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. *Molecular Ecology Resources*, 2013, 13(5): 946-952 (doi: 10.1111/1755-0998.12129).
39. Dolebo A.T., Khayatzaadeh N., Melesse A., Wragg D., Rekić M., Haile A., Rischkowsky B., Rothschild M.F., Mwacharo J.M. Genome-wide scans identify known and novel regions associated with prolificacy and reproduction traits in a sub-Saharan African indigenous sheep (*Ovis aries*). *Mammalian Genome*, 2019, 30(11-12): 339-352 (doi: 10.1007/s00335-019-09820-5).
40. Drouilhet L., Mansanet C., Sarry J., Tabet K., Bardou P., Woloszyn F., Lluçh J., Harichaux G., Viguié C., Monniaux D., Bodin L., Mulsant P., Fabre S. The highly prolific phenotype of Lacaune sheep is associated with an ectopic expression of the *B4GALNT2* gene within the ovary. *PLoS Genetics*, 2013, 9(9): e1003809 (doi: 10.1371/journal.pgen.1003809).
41. Ozmen O., Seker I., Cinar Kul B., Ertugrul O. Haplotype variation of estrogen receptor α (*era*) gene exon 4 in Turkish sheep breeds. *Genetika*, 2012, 48 (10): 1185-1189.
42. Chu M.X., Guo X.H., Feng C.J., Li Y., Huang D.W., Feng T., Cao G.L., Fang L., Di R., Tang Q.Q., Ma Y.H., Li K. Polymorphism of 5' regulatory region of ovine FSHR gene and its association with litter size in Small Tail Han sheep. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 3721-3725 (doi: 10.1007/s11033-011-1147-x).
43. Lu T.T., Makishima M., Repa J.J., Schoonjans K., Kerr T.A., Auwerx J., Mangelsdorf D.J. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Molecular Cell*, 2000, 6(3): 507-515 (doi: 10.1016/s1097-2765(00)00050-2).
44. Selionova M.I., Chizhova L.N., Surzhikova E.S., Podkorytov N.A., Podkorytov A.T. *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki*, 2020, 50(1): 92-100 (doi: 10.26898/0370-8799-2020-1-11) (in Russ.).
45. Ozdemirov A.A., Chizhova L.N., Khozhokov A.A., Surzhikova E.S., Dogeev G.D., Abdulmagomedov S.Sh. *Yug Rossii: ekologiya, razvitiye*, 2021, 16(2): 39-44 (doi: 10.18470/1992-1098-2021-2-39-44) (in Russ.).
46. Skorykh L.N., Sukhoveeva A.V., Surzhikova E.S. *Ovtsy,kozy, sherstyanoe delo*, 2022, 2: 22-25 (doi: 10.26897/2074-0840-2022-2-22-25) (in Russ.).
47. Malyuchenko O.P., Alekseev Ya.I., Monakhova Yu.A., Marzanova S.N., Marzanov N.S. *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii*, 2011, 6: 167-169 (in Russ.).

48. Marzanov N.S., Devrishov D.A., Ozerov M.Y., Maluchenko O.P., Marzanova S.N., Shukurova E.B., Koreckaya E.A., Kantanen J., Petit D. The significance of a multilocus analysis for assessing the biodiversity of the Romanov sheep breed in a comparative aspect. *Animals (Basel)*, 2023, 13(8): 1320 (doi: 10.3390/ani13081320).
49. Chen Z.H., Xu Y.X., Xie X.L., Wang D.F., Aguilar-Gómez D., Liu G.J., Li X., Esmailizadeh A., Rezaei V., Kantanen J., Ammosov I., Nosrati M., Periasamy K., Coltman D.W., Lenstra J.A., Nielsen R., Li M.H. Whole-genome sequence analysis unveils different origins of European and Asiatic mouflon and domestication-related genes in sheep. *Communications Biology*, 2021, 4(1): 1307 (doi: 10.1038/s42003-021-02817-4).