

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КОПЫТНОЙ ГНИЛЬЮ У ДОМАШНИХ И ДИКИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА OVIS

Т.Е. ДЕНИСКОВА✉, А.В. ДОЦЕВ

ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Российская Федерация, Московская обл., г.о. Подольск;
✉ horarka@yandex.ru

ANALYSIS OF POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH FOOTROT IN DOMESTIC AND WILD REPRESENTATIVES OF THE GENUS OVIS

T.E. DENISKOVA✉, A.V. DOTSEV

Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst;
Podolsk, Moscow Region, Russian Federation; ✉ horarka@yandex.ru

Аннотация. В статье представлены результаты определения генотипов в трех целевых SNP в гене MPDZ – потенциальном кандидате, влияющем на устойчивость овец к копытной гнили, у представителей домашних и диких *Ovis*. В качестве материалов для исследования были использованы высокоплотные SNP-профили, сгенерированные для 15 локальных пород домашних овец и 4 диких видов рода *Ovis*. SNP-профили 10 иностранных пород были добавлены к выборке как группы сравнения. Определены мажорные и минорные аллели в целевых SNP (rs418747104, rs426927857, rs406749947). Дискутируется влияние специфических генотипов в целевых SNP на устойчивость к копытной гнили. Результаты нашего исследования – это одна из первых попыток к пониманию генетических механизмов, лежащих в основе устойчивости / восприимчивости к копытной гнили у пород домашних овец, разводимых в России, и диких представителей рода *Ovis*.

Ключевые слова: SNP, генотипирование, генетическая устойчивость, генетическое разнообразие, род *Ovis*, копытная гниль

Summary. The article presents the results of genotype determination in three target SNPs in the MPDZ gene, a potential candidate influencing the resistance of sheep to footrot, in representatives of domestic and wild *Ovis*. High-density SNP profiles generated for 15 local sheep breeds and 4 wild species of the genus *Ovis* were used as materials for the study. SNP profiles of 10 foreign breeds were added to the sample as comparison groups. Major and minor alleles in target SNPs (rs418747104, rs426927857, rs406749947) were determined. The influence of specific genotypes in target SNPs on resistance to footrot is discussed. In this study, we made the first attempt to understand the genetic mechanisms underlying resistance/susceptibility to footrot in domestic sheep breeds raised in Russia and wild representatives of the genus *Ovis*.

Keywords: SNP, genotyping, genetic resistance, genetic diversity, genus *Ovis*, footrot

Введение. Копытная гниль (инфекционный пододерматит) – это инфекционная болезнь, характеризующаяся поражением кожи между пальцами

и отделением копыта от подлежащих тканей у мелкого рогатого скота [1]. Возбудитель копытной гнили – это анаэробная грамотрицательная бактерия *Dichelobacter nodosus*. Заразившиеся овцы испытывают боль, дискомфорт и ограничены в подвижности, что затрудняет доступ к кормам. Экономические потери возникают из-за расходов на лечение и из-за снижения темпов роста и наращивания продуктивности животных. Больные ягнята могут достигать убойного веса на месяц позже, чем здоровые сверстники [2].

На развитие клинической картины инфекции влияет индивидуальная резистентность организма животных. В связи с этим, выявление геномных вариантов, ответственных за такую устойчивость, и разработка соответствующих генетических инструментов для тестирования животных весьма актуальны.

Первые генетические исследования, направленные на поиск резистентных генотипов, были сфокусированы на установлении роли главного комплекса гистосовместимости в модуляции иммунных ответов в отношении устойчивости к копытной гнили [3]. Тем не менее, более многообещающие результаты были получены на основе проведения полногеномных ассоциативных исследований (GWAS). Первый GWAS с использованием ДНК-чипа средней плотности был проведен в породе тексель в 2015 г. [1]. Однако после применения строгой поправки Бонферрони ни один маркер не оказался значимым на уровне генома ($p < 0,05$). Семь хромосомно-значимых SNP ($p < 0,05$) были идентифицированы на хромосомах 4, 8, 14, 17, 18, 24 и 26. Среди них SNP OAR18_23478564.1 на OAR18 был значимым как для аддитивных, так и для доминантных моделей [1].

Далее Niggeler A. et al (2017) провели генотипирование 373 овец швейцарской белой породы с использованием ДНК-чипа высокой плотности, содержащего около 600 000 SNP. В качестве объектов исследования были выбраны клинически здоровые

особи и животные с диагнозом, подтвержденным с помощью теста на основе количественной ПЦР на наличие вирулентного штамма *Dichelobacter nodosus*. В результате GWAS, проведенного по схеме «случай-контроль», была выявлена достоверная ассоциация с SNP rs418747104 на OAR2 в регионе 81,2 Мб. Три наиболее значимых SNP-маркера были локализованы в гене *MPDZ* (multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex component), который кодирует белок, участвующий в поддержании барьерной функции и целостности плотных контактов. Авторы предположили, что особи, несущие определенные варианты в гене *MPDZ*, могут различаться по устойчивости / восприимчивости к копытной гнили из-за измененной целостности копытного рога и межпальцевой кожи. В связи с этим, ген *MPDZ* рассматривается в качестве перспективного функционального гена-кандидата [4].

Два исследования были проведены в популяциях двух португальских тонкорунных (меринос бранко и меринос прето) [5] и двух мясных гладкошерстных пород (катадин и барбадосская чернобрюхая) в 2024 г. [6]. Gaspar D. et al (2024) проанализировали 1375 SNP-генотипов овец из 17 отар на юге Португалии. Клиническое состояние овец было оценено путем визуального осмотра поражений копыт по модифицированной системе Эгертона. В результате GWAS выявлены три SNP на OAR24, достигающих общегеномной значимости после введения поправки Бонферрони ($p < 0,05$), и шесть суггестивных SNP на OAR2, 4, 7, 8, 9 и 15. Эти SNP расположены в областях генов-кандидатов, связанных с иммунными функциями и участвующих в регенерации тканей: *RALYL*, *HSPG2* и *THBS1*.

Американские гладкошерстные породы характеризуются повышенной устойчивостью к копытной гнили. При проведении GWAS с использованием смешанной модели, учитывающей ферму, основные компоненты и случайные факторы для матрицы геномных отношений в выборках этих пород, были выявлены три достоверно значимых SNP внутри или рядом с генами *GBP6* и *TCHN* [6].

Несмотря на распространенность заболевания, генетические аспекты устойчивости к копытной гнили у пород овец, разводимых в России, не были исследованы.

Цель исследований. Идентифицировать однонуклеотидные замены в позициях rs418747104, rs426927857 и rs406749947. Провести сравнительный анализ полиморфизма в исследуемых позициях у отечественных, иностранных породах домашних овец и диких видов (муфлон, уриал, архар, снежный баран).

Материал и методика. В качестве материалов для исследования были использованы полногеномные SNP-профили 25 пород домашних овец ($n=580$) и 4 диких видов рода *Ovis* ($n=132$). Образцы ткани овец от пород, разводимых в России, и диких видов были

получены из биобанка «Банк генетического материала домашних и диких видов животных и птицы», ФГБНУ ФИЦ животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста. Выборка пород овец, разводимых в России, включала: андийскую ($n = 8$), буубэй ($n = 30$), волгоградскую ($n = 20$), грозненскую ($n = 21$), калмыцкую курдючную ($n = 8$), каракульскую ($n = 25$), карачаевскую ($n = 26$), лезгинскую ($n = 26$), осетинскую ($n = 30$), романовскую ($n = 61$), русскую длинношерстную ($n = 21$), сальскую ($n = 19$), тувинскую короткожирнохвостую ($n = 26$), тушинскую ($n = 7$) и эдильбаевскую ($n = 27$). Выборка диких видов включала: муфлона (*O. gmelini*, $n = 5$), уриала (*O. vignei*, $n = 7$), архара (*O. ammon*, $n = 42$) и снежного барана (*O. nivicola*, $n = 78$).

Генотипирование образцов проводили на базе оборудования центра коллективного пользования «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных». Все профили были получены с использованием ДНК-чипа высокой плотности Ovine Infinium® HD SNP BeadChip (600 K SNPs) (Illumina, San Diego, США) в рамках выполнения предыдущих исследований [7].

SNP-профили иностранных пород были загружены из публично доступной базы данных WIDDE и включали финшип ($n = 22$), берришон дүшер ($n = 19$), иль-де-франс ($n = 23$), лакон ($n = 36$), меринос д'Арль ($n = 18$), рамбулье ($n = 27$), уесан ($n = 18$), романе ($n = 19$), суффолк ($n = 19$) и тексель ($n = 24$).

В качестве целевых мы выбрали три SNP rs418747104, rs426927857 и rs406749947, которые имели достоверные ассоциации с устойчивостью к копытной гнили [4]. Все три SNP располагались внутри (rs426927857 и rs406749947) или непосредственной близости (менее 100 Кб – rs418747104) от гена *MPDZ* на OAR2 (81,028,595-81,195,663 п.н. по сборке генома Oar_v3.1).

Результаты исследований и их обсуждение. В таблице 1 представлены генотипы, идентифицированные в трех целевых SNP в выборке представителей рода *Ovis*. В локусе rs418747104 аллель А встречался с большей частотой практически у всех домашних пород овец, разводимых в России – от 59,26% у эдильбаевской до 87,5% у волгоградской, и от 52,63% у романе до 97,22% у уесанн среди иностранных пород. У овец романовской породы, финшип и рамбулье чаще встречался аллель С (71,31%, 64,81% и 68,18%, соответственно).

Отмечено, что SNP rs426927857 и rs406749947 находятся в сцеплении у домашних овец, что предполагалось, учитывая их близкое расположение: rs426927857-81,162,741 п.н. и rs406749947-81,163,354 п.н. по сборке генома Oar_v3.1). Аллель С в rs426927857 был наиболее часто встречающимся: от 59,26% у эдильбаевской до 94,74% у сальской среди локальных пород и от 61,11% у лакон до 100% у текселя и рамбулье среди иностранных

Таблица 1. Генотипы в трех целевых SNP у изучаемых пород домашних овец и диких видов
Table 1. Genotypes at three target SNPs in the studied breeds of domestic sheep and wild species

Порода / вид	n	Целевые SNP					
		rs418747104		rs426927857		rs406749947	
		A	C	A	C	A	G
Локальные породы и породы домашних овец, разводимые в России							
Андийская	8	81,25	18,75	6,25	93,75	93,75	6,25
Буубэй	30	76,67	23,33	28,33	71,67	71,67	28,33
Волгоградская	20	87,5	12,5	7,5	92,5	92,5	7,5
Грозненская	21	78,57	21,43	23,81	76,19	76,19	23,81
Калмыцкая курдючная	8	62,5	37,5	25	75	75	25
Каракульская	25	60	40	28	72	72	28
Карачаевская	26	69,23	30,77	23,08	76,92	76,92	23,08
Лезгинская	26	86,54	13,46	17,31	82,69	82,69	17,31
Осетинская	30	80	20	13,33	86,67	86,67	13,33
Романовская	61	28,69	71,31	38,52	61,48	62,3	37,7
Русская длинношерстная	21	83,33	16,67	14,29	85,71	85,71	14,29
Сальская	19	78,95	21,05	5,26	94,74	94,74	5,26
Тувинская короткожирнохвостая	26	67,31	13,46	25	75	75	25
Тушинская	7	71,43	28,57	28,57	71,43	71,43	28,57
Эдильбаевская	27	59,26	40,74	40,74	59,26	59,26	40,74
Иностранные породы домашних овец							
Берришон ду Шер	19	78,95	21,05	21,05	78,95	78,95	21,05
Иль-де-Франс	23	82,61	17,39	17,39	82,61	82,61	17,39
Лакон	36	58,33	41,67	38,89	61,11	61,11	38,89
Меринос д'Арль	18	83,33	16,67	16,67	83,33	83,33	16,67
Рамбулье	27	35,19	64,81	0	100	100	0
Романе	19	52,63	47,37	28,95	71,05	71,05	28,95
Суффолк	19	65,79	34,21	34,21	65,79	65,79	34,21
Тексель	24	68,75	31,25	0	100	100	0
Уссан	18	97,22	2,78	2,78	97,22	97,22	2,78
Финншип	22	31,82	68,18	36,36	63,64	63,64	36,36
Дикие виды рода <i>Ovis</i>							
Архар (<i>O. ammon</i>)	42	0	100	97,62	2,38	100	0
Муфлон (<i>O. gmelini</i>)	5	80	20	50	50	100	0
Снежный баран (<i>O. nivicola</i>)	78	0	100	100	0	100	0
Уриал (<i>O. vignei</i>)	7	57,14	42,86	50	50	100	0

пород. Аллель А в rs406749947 встречался с аналогичной частотой, как аллель С в rs426927857.

У всех снежных баранов генотипы во всех локусах были фиксированными, то есть встречался только один вариант. Так в позиции rs418747104 встречался только аллель С, в rs426927857 – только А и rs406749947 – G. У архаров сходная тенденция наблюдалась в отношении rs418747104 и rs406749947, в то время как в локусе rs426927857 аллель С встречался с частотой 2,38%. У муфлонов и уриалов наблюдалось расщепление генотипов в локусе rs418747104. Привлечение большего числа образцов уриалов и муфлонов будет способствовать формированию окончательного вывода. Расщепление генотипа было замечено только у кызылкумского архара, который, как было показано ранее [8], имеет следы интрогрессии с уриалом.

Следует отметить, что мы наблюдали схожую тенденцию при сравнении генотипов в генах *BMP15*, *GDF9* и *BMPRII* у домашних овец и их диких сородичей [9]. Так, в некоторых позициях внутри этих генов у домашних овец и архаров встречались только противоположные гомозиготы, а у муфлонов встречались гетерозиготы и/или генотипы, свойственные домашним овцам, и/или все три варианта. Вероятно, это связано с эволюционными изменениями, происходящими с родом *Ovis*.

Niggeler A. et al (2017) установили достоверно значимые ассоциации целевых SNP с устойчивостью к копытной гнили и выявили частоты мажорного и минорного аллеля. Однако авторы не смогли установить, какой именно аллель связан с генетической устойчивостью, а какой с чувствительностью к копытной гнили [4].

К сожалению, у нас отсутствуют сведения о ветеринарном статусе исследуемых животных по заболеваемости копытной гнилью. Тем не менее, опираясь на работы других исследователей и характеристику отдельных пород, можно дискутировать о том, какой генотип «желательный» в аспекте устойчивости к копытной гнили. Так, например, у диких видов рода *Ovis* более прочный копытный рог и, исходя из специфики их мест обитания (в частности, хабитаты снежного барана и архара), логично предположить, что риск заражения копытной гнили у этих видов должен быть ниже по сравнению с домашними овцами. В связи с этим, можно было бы предположить, что аллели С, А и G в rs418747104,

rs426927857 и rs406749947, соответственно, связаны с устойчивостью к этому заболеванию. Однако, если построить аналогию с другим заболеванием овец – скрепи, то генотипы дикого типа неустойчивы к скрепи. Кроме того, теоретически может существовать и другая ситуация – например, беззащитность диких видов перед микробиомом, характерным для хозяйственного содержания, которое создает большую бактериальную нагрузку по сравнению с обитанием в дикой природе.

У диких жвачных копытная гниль до сих пор плохо описана, так как сбор морфопатологических образцов и наблюдение в природной среде зачастую осложнены или невозможны. Тем не менее, известны случаи заражения копытной гнилью с подтверждением штамма *D. nodosus* в популяциях свободно живущих альпийских козорогов (*Capra ibex ibex*) и муфлонов в Швейцарских Альпах [10]. Так, например, известно о вспышке копытной гнили в колонии альпийских козорогов «Vanil Noir» в Швейцарии с мая по декабрь 2014 г. С помощью ПЦР анализа было подтверждено, что возбудителем был штамм *D. nodosus*, вызывающий легкие поражения у домашних овец. Перенос инфекции от симпатрических видов домашних жвачных и нетипичная влажная теплая погода – это, вероятно, основные причины таких вспышек в дикой природе [10]. Высказываются предположения, что дикие виды более склонны к развитию заболеваний, чем овцы [10]. Интересно, что расщепление генотипов, выявленное в нашей работе, продемонстрировано среди муфлонов и уриалов – более близких видах к домашней овце, чем архары и снежные бараны. Кроме того, иногда муфлоны и уриалы обитают в зонах контакта с домашними овцами.

Примечательно, что романовская порода и финшип характеризовались значительной схожестью аллельных профилей по трем целевым SNP. Это, вероятно, связано с тем, что обе породы принадлежат к группе северно-европейских короткотошхвостых овец. Считается, что романовская порода скорее неустойчива к копытной гнили. Например, имеются сообщения, что гибриды романовской породы с текселем и катумской породы были менее подвержены копытной гнили, чем чистопородные ягнята-аналоги романовской породы [11].

Кроме того, результаты полевых исследований и экспериментов по заражению показали, что британские породы овец были более устойчивы к развитию тяжелой копытной гнили, чем мериносы [12]. Из английских пород в нашей выборке была одна порода – суффолк, у которой преобладал аллель А в локусе rs418747104. Что касается мериносов, частоты встречаемости аллелей у рамбулье и мериноса д'Арль были не согласованы.

Следует отметить, что помимо анализируемых целевых SNP у локальных пород могут существовать и другие неидентифицированные геномные регионы, ассоциированные с устойчивостью копытной гнили.

В случае окончательного определения устойчивых генотипов наличие полиморфизма в целевых позициях в гене *MPDZ* в выборках основных пород овец, разводимых в России, сможет способствовать ведению селекции для создания устойчивых линий внутри этих пород.

Выводы. Таким образом, впервые был изучен полиморфизм в трех позициях в гене *MPDZ* – потенциальном кандидате, ассоциированных с устойчивостью к копытной гнили, у пород овец, разводимых в России, и диких видов *Ovis*. Результаты нашего исследования могут быть рассмотрены как одна из первых попыток к пониманию генетических механизмов, лежащих в основе устойчивости / восприимчивости к копытной гнили у отечественных пород домашних овец, и диких представителей рода *Ovis*. Исследования необходимо продолжить в аспекте привлечения ветеринарных записей и вычисления корреляций специфических генотипов с иммунным статусом животного.

Суммируя вышеизложенное, необходимо продолжить исследования на овцах разных пород с учетом анамнеза по заболеваемости копытной гнилью.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов. Работа выполнена в рамках тематики Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема FGGN-2024-0015).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest. The work was carried out by order of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (theme FGGN-2024-0015).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mucha S., Bunger L., Conington J. Genome-wide association study of footrot in Texel sheep • *Genetics, selection, evolution: GSE*, 2015. No. 47 (1). P. 35. DOI: 10.1186/s12711-015-0119-3.
2. Zingg D. [et al.] Epidemiological and economic evaluation of alternative on-farm management scenarios for ovine footrot in Switzerland • *Frontiers in Veterinary Science*, 2017. No. 4. P. 70. DOI: 10.3389/fvets.2017.00070.
3. Raadsma H.W., Dhungyel O.P. A review of footrot in sheep: new approaches for control of virulent footrot • *Livestock Science*, 2013. No. 156. Pp. 115-125. DOI: 10.1016/j.livsci.2013.06.011.
4. Niggeler A. [et al.] A genome-wide significant association on chromosome 2 for footrot resistance/susceptibility in Swiss White Alpine sheep • *Animal genetics*, 2017. No. 48 (6). Pp. 712-715. DOI:10.1111/age.12614
5. Gaspar D. [et al.] Genome-wide association study identifies genetic variants underlying footrot in Portuguese Merino sheep • *BMC genomics*, 2024. No. 25 (1). P. 100. DOI: 10.1186/s12864-023-09844-x.
6. Cinar M.U. [et al.] Genome-wide association with footrot in hair and wool sheep • *Frontiers in genetics*, 2024. No. 14. P. 1297444. DOI:10.3389/fgene.2023.1297444

7. Igoshin A.V. [et al.] Copy number variants in genomes of local sheep breeds from Russia • *Animal Genetics*, 2022. No. 53 (1). Pp. 119-132. DOI: 10.1111/age.13163.

8. Dotsev A. [et al.] Genome-Wide Insights into Intraspecific Taxonomy and Genetic Diversity of Argali (*Ovis ammon*) • *Diversity*, 2023. No. 15 (5). P. 627. DOI: 10.3390/d15050627.

9. Денискова Т.Е. [и др.] Полиморфизм в генах-кандидатах, связанных с репродуктивными функциями у овец (*Ovis spp.*) • *Сельскохозяйственная биология*, 2023. № 58 (6). С. 1046-1056. DOI: 10.15389/agrobiology.2023.6.1046rus.

Deniskova T.E. [et al.] Analysis of polymorphism in the major genes for reproductive traits in sheep (*Ovis spp.*) • *Agricultural Biology*, 2023. No. 58 (6). P. 1046-1056. DOI: 10.15389/agrobiology.2023.6.1046eng.

10. Wimmershoff J. [et al.] Outbreak of severe foot rot associated with benign *Dichelobacter nodosus* in an Alpine ibex colony in the Swiss Prealps • *Schweiz Arch Tierheilkd*, 2015. No. 157 (5). P. 277-284. DOI: <https://doi.org/10.17236/sat00021>

11. Зиновкин И.А., Воронкова О.А. Сравнение степени устойчивости пород овец чистых линий и их гибридов к копытной гнили и её лечение. Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов – регионам. Том 3. Часть 2. Биологические науки: Сб. науч. трудов по результатам работы VIII Всероссийской научно-практ. конференции с международным участием • *Вологда–Молочное: ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА*, 2023. 250 с.

Zinovkin I.A., Voronkova O.A. Comparison of the degree of resistance of pure line sheep breeds and their hybrids to foot rot and its treatment. Young researchers of agro-industrial and forestry complexes – to the regions. Vol. 3. Part 2. Biological sciences: Collection of scientific papers based on the results of the VIII All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation • *Vologda–Molochnoye: Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Vologda GMHA*, 2023. 250 p.

12. Emery D.L., Stewart D.J., Clark B.L. The comparative susceptibility of five breeds of sheep to foot-rot • *Australian Veterinary Journal*, 1984. No. 61 (3). P. 85-88. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1984.tb15524.x.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Татьяна Евгеньевна Денискова, канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник группы генетики и геномики мелкого рогатого скота, тел.: (916) 914-20-17, e-mail: horarka@yandex.ru;

Арсен Владимирович Доцев, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, зав. лабораторией популяционной и эволюционной геномики животных, тел.: (915) 316-79-65, e-mail: asnd@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», 142132, Российская Федерация, Московская область, г.о. Подольск, пос. Дубровицы, д. 60.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Tatyana E. Deniskova, Ph D. Biol. sciences, Associate Professor, Leading Researcher of the Group of Genetics and Genomics of small cattle, tel.: (916) 914-20-17, e-mail: horarka@yandex.ru;

Arsen V. Dotsev, Ph D. Biol. sciences, Leading Researcher, Head of the Laboratory of Population and Evolutionary Genomics of Animals, tel.: (915) 316-79-65, e-mail: asnd@mail.ru

Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Research Center of Animal Husbandry – VIZ named after Academician L.K. Ernst”, 60 Dubrovitsy village, Podolsk, Moscow region, 142132; Russian Federation

Поступила в редакцию / Received 24.05.2024

Поступила после рецензирования / Revised 15.06.2024

Принята к публикации / Accepted 01.07.2024