

УДК 636.4.082.12

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА CAST У ОВЕЦ ТАТАРСТАНСКОЙ И ЭДИЛЬБАЕВСКОЙ ПОРОД

В.П. ЛУШНИКОВ, Т.О. ФЕТИСОВА, А.А. СТРИЛЬЧУК

ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова

*В статье рассмотрены результаты ПЦР-ПДРФ анализа распределения генотипов гена CAST у овец татарстанской породы (n = 100), разводимой в Республике Татарстан, и эдильбаевской породы (n = 60), разводимой в Саратовской области. Полиморфизм данного гена впервые изучен у овец изучаемых пород. Так же были обнаружены животные-носители селекционно-значимого аллеля N.*

**Ключевые слова:** генетический полиморфизм, ген, CAST, генотип, ПЦР-ПДРФ анализ, аллели, татарстанская порода овец, эдильбаевская порода овец, ДНК-маркер, мясная продуктивность.

На сегодняшний день в России овцеводство имеет важное значение для обеспечения населения белком животного происхождения.

Вследствие экономической ситуации, сложившейся в нашей стране в 90-е гг. прошлого столетия, численность овец значительно снизилась. При этом многие отечественные породы находятся на грани исчезновения [9, 11].

В связи с этим сохранение генофонда отечественных пород овец, а так же повышение экономической эффективности производства мяса, является одной из главных задач современной сельскохозяйственной науки. Данная проблема весьма актуальна и требует внедрения новых методов и технологий селекционно-племенной работы. Одной из таких технологий является ДНК-маркеры. Маркерами считаются ДНК-последовательности, характеризующие различные аллельные варианты генов мясной продуктивности, точки SNP и другие [12, 8].

Существующие в настоящее время ДНК-технологии позволяют не только изучить генетическое разнообразие популяции животных, но и выделить гены и их ассоциации, несущие комплекс желательных для селекции признаков [13].

Среди известных семейств белков, влияющих на данный показатель, находятся катепсины и кальпаины [1]. В данном семействе кальпаинов выделяется эндогенный ингибитор кальпаина - кальпастин (CAST) [10, 14].

В нашей работе данный ген представляет наибольший интерес, т.к. определяет одну из потребительских свойств мяса - нежность. Современными методиками молекулярно-генетической диагностики была обнаружена полиморфность данного белка (однонуклеотидная замена G/A в гене кальпастина, апробированная в работе новозеландских ученых [6]) у овец. Отдельные полиморфные варианты были добавлены в так называемые маркерные панели для оценки генетического потенциала животных по нежности мяса [4]. На сегодняшний день влияние маркерных генов на показатели продуктивности животных достоверно не установлено, в связи с комплексностью проявления того или иного признака. В ряде исследований Ibrahim A.H.M., Khan Suh подтвердили связь кальпастина с признаками мясной продуктивности [3, 5], в то время как Sutikno S., Davut Bayram сообщали об ее отсутствии [7, 2].

Учитывая вышесказанное, до настоящего времени исследований полиморфизма гена кальпастина (CAST) у татарстанской и эдильбаевской пород не проводилось, что представляет научный и практический интерес.

**Материал и методика исследований.** Для проведения исследования полиморфизма гена CAST нами были отобраны баранчики (n = 60) эдильбаевской породы, разводимые в ООО ПР «Сельхозсервис» Новоузенского района, Саратовской области и матки (n = 7), ярки (n = 33) и баранчики (n = 60) татарстанской породы, разводимые в ООО Агрофирма «Кармалы» Нижнекамского района, Республики Татарстан.

Биологическим материалом для исследования служила ДНК, выделенная из образцов крови овец исследуемых пород. Исследования генетического материала овец татарстанской породы производилось с использованием набора реагентов «DIAtomtmDNAprep» (IsoGeneLab, Москва) в лаборатории иммуногенетики и ДНК-технологий ВНИОК - филиал ФГБНУ «Северо-кавказский ФНАЦ». Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) применялись наборы «GenePakPCRCore», (IsoGeneLab, Москва).

Методом ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) осуществлялось генотипирование овец по гену CAST. На программируемом четырехканальном термоциклере «Терцик» фирмы «ДНК-технология» (Россия) проводилась амплификация в объеме 20-25 мкл с использованием праймера: CAST - (F: 5'-tgg-ggc-cca-atg-acg-cca-tcg-atg-3' и R: 5'ggt-gga-gca-ctt-ctg-atc-acc-3'). Электрофоретическим методом в 1,8-4,0% агарозном геле при УФ-свете после окрашивания бромистым этидием определяли число и длину фрагментов рестрикции. В качестве маркера молекулярных масс использовали стандартный набор M 50 «GenePakDNAMarkers» (IsoGeneLab).

ДНК из образцов крови овец эдильбаевской породы выделяли с помощью наборов «ДНК-Экстран-2» компании Синтол (г. Москва). Исследования производились на базе лаборатории ДНК-технологий

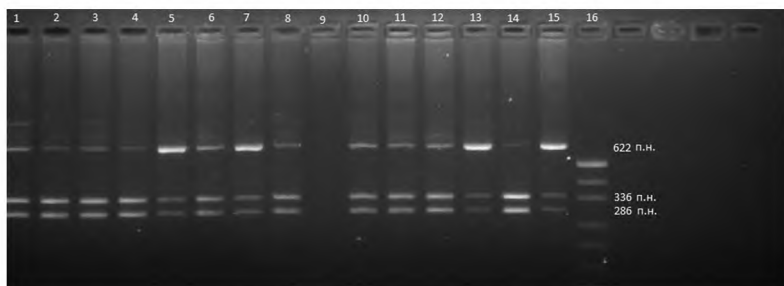


Рис. 1. Электрофоретическое разделение фрагментов рестрикции гена CAST у баранчиков эдильбаевской породы. Пробы 5, 7, 13, 15 имеют генотип MN; пробы 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 14 имеют генотип MM; проба 16 - маркер молекулярного веса pUC19/MspI



Рис. 2. Электрофоретическое разделение фрагментов рестрикции гена CAST у баранчиков татарстанской породы. Пробы 2, 5, 11, 18 имеют генотип MN; пробы 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 имеют генотип MM; проба номер 1 - маркер молекулярного веса 50 bp (Изоген)

Таблица 1

Частоты аллелей и генотипов CAST у овец эдильбаевской и татарстанской пород

Порода	Аллель		Генотип		
	M	N	MM	MN	NN
Эдильбаевская	0,94	0,06	0,88	0,12	-
Татарстанская	0,94	0,06	0,89	0,09	0,02

ФГБНУ «ВНИИПлем». Амплификация фрагментов ДНК (622 п.н.) производилась с помощью праймера CAST - (F: 5'-tgg-ggc-cca-atg-acg-cca-tcg-atg-3' и R: 5'ggt-gga-gca-ctt-ctg-atc-acc-3'), после чего они были расщеплены эндонуклеазой рестрикции MspI в соответствии с рекомендациями производителя СибЭнзим (г. Москва). После рестрикции проводился ПДРФ анализ в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. В качестве маркера длин фрагментов использовался маркер молекулярного веса pUC19/Msp I производства компании СибЭнзим (г. Москва).

Статистическая обработка полученных результатов исследований осуществлялась с помощью комплекса «Microsoft Office» с применением программы «Microsoft Excel», с обработкой данных в «Statistica 6.0» («Stat Soft Inc.», США) и компьютерной программы PopGene (v. 1.31).

**Результаты и их обсуждение.** На этапе выполнения ПЦР-ПДРФ анализа поголовья овец исследуемых пород, в результате амплификации необходимого локуса гена кальпастина (CAST), по приведенным ранее методикам, на электрофореграмме были получены фрагменты, имеющие размер 336 и 286 п.н. (гомозиготный генотип MM) и комплекс из трех фрагментов ДНК размером 622, 336 и 286 п.н. (гетерозиготный генотип MN). Гомозиготный генотип NN (длина фрагмента 622 п.н.) в нашем исследовании обнаружен не был (рис. 1 и 2).

Результаты ДНК-тестирования локуса гена кальпастина (CAST) на наличие M и N аллельных вариантов и присутствия возможных генотипов с помощью метода ПЦР-ПДРФ у овец татарстанской и эдильбаевской пород представлены в таблице 1.

Исходя из вышеуказанных данных в популяции овец эдильбаевской породы распределение частоты встречаемости аллелей было следующим: аллели CAST<sup>N</sup> - 0,06, аллели CAST<sup>M</sup> - 0,94. Частота встречаемости генотипа CAST<sup>MM</sup> составила 0,88, генотипа CAST<sup>MN</sup> - 0,12. Генотип CAST<sup>NN</sup> в данном исследовании обнаружен не был.

Частоты аллелей и генотипов у исследуемой популяции овец татарстанской породы распределились следующим образом: аллели CAST<sup>N</sup> - 0,06, аллели CAST<sup>M</sup> - 0,94, генотипа CAST<sup>MN</sup> - 0,09, генотипа CAST<sup>MM</sup> - 0,89, генотипа CAST<sup>NN</sup> - 0,02.

**Выводы.** Проводя анализ результатов исследования ДНК овец татарстанской и эдильбаевской породы установлено, что преобладающей и определяющей структуру данных популяций была аллель M (0,94) гена кальпастина (CAST). Соответственно, гомозиготный генотип MM (0,89 ± 0,01) был наиболее встречающимся в популяциях изучаемых пород и преобладал по частоте встречаемости над гетерозиготным

генотипом MN ( $0,1 \pm 0,03$ ). Гомозиготный генотип NN ( $0,02$ ) был выявлен только в поголовье овец татарстанской породы. Встречаемость аллели N в исследуемых породах была крайне мала -  $0,06$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dariusz Nowak. Enzymes in Tenderization of Meat - The System of Calpains and Other Systems - a Review // Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. - 2011. - 61 (1). - P. 231-237.

2. Davut Bayram et al. DGAT1, CAST and IGF-I Gene Polymorphisms in Akkaraman Lambs and Their Effects on Live Weights up to Weaning Age // Kafkas Univ Vet Fak-Derg. - 2019. - 25 (1). - P. 9-15.

3. Ibrahim A.H.M. et al. Calpastatin Polymorphism in Barki Lambs and their Effects on Growth and Carcass Traits // Journal of American Science. - 2015. - 11 (3). - P. 106-112.

4. Jiao Li et al. Association of CAST Gene Polymorphisms with Carcass and Meat Quality Traits in Chinese Commercial Cattle Herds // Asian-Aust. J. Anim. Sci. - 2010. - 23 (11). - P. 1405-1411.

5. Khan Suh et al. Calpastatin (CAST) gene polymorphism and its association with average daily weight gain in Balkhi and Kajli sheep and Beetal goat breeds // Pak J Zool. - 2012. - 44 (2). - P. 377-382.

6. Palmer B.R., Hickford J.G.H. and Bickerstaffe R. A candidate gene approach to animal quality traits // Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. - 1997. - 57. - P. 294-296.

7. Sutikno S., Yaminc M. & Sumantri C. Association of Polymorphisms Calpastatin Gene with Body Weight of Local Sheep in Jonggol // Media Peternakan. - 2011. - 34 (1). - P. 1-6.

8. Дейкин А.В. Генетические маркеры в мясном овцеводстве / А.В. Дейкин, М.И. Селионова, А.Ю. Криворучко, Д.В. Коваленко, В.И. Трухачев // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2016. - Т. 20. - № 5. - С. 576-583.

9. Ерохин А.И. Интенсификация производства и повышение качества мяса овец: Монография / А.И. Ерохин, Е.А. Карасев, С.А. Ерохин. - М.: МЭСХ, 2015. - 305 с.

10. Куликова К.А. Полиморфизм гена кальпастатина (CAST) у овец горного и степного внутрипородных типов тувинской короткожирнохвостой породы // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. - 2018. - № 1 (45). - С. 84-89.

11. Мельникова Е.С. Овцеводство и козоводство: тенденции и развитие // Символ науки, 2016. - № 4. - С. 61-65.

12. Марзанов Н.С. Сохранение биоразнообразия. Генетические маркеры и селекция животных / Н.С. Марзанов, Ю.В. Саморуков, Г.В. Ескин // Сельскохозяйственная биология. - 2006. - № 4. - С. 3-19.

13. Племяшов К. Геномная селекция - будущее животноводства // Животноводство России. - 2014. - № 5. - С. 2-4.

14. Трухачев В.И. Генетические маркеры мясной продуктивности овец (*Ovis Aries L.*). Сообщение I. миостатин, кальпаин, кальпастатин / В.И. Трухачев, М.И. Селионова, А.Ю. Криворучко, А.М.М. Айбазов // Сельскохозяйственная биология. - 2018. - Т. 53. - № 6. - С. 1107-1119.

*The article considers the results of PCR-pdrf analysis of the distribution of genotypes of the CAST gene in sheep of the Tatarstan breed (n = 100), bred in the Republic of Tatarstan, and the edilbaev breed (n = 60), bred in the Saratov region. The polymorphism of this gene was first studied in sheep of the studied breeds. Also, animals were found to be carriers of the selectively significant n allele.*

*Key words: genetic polymorphism, gene, CAST, genotype, PCR-RFLP analysis, alleles, Tatarstan sheep breed, Edilbayev sheep breed, DNA marker, meat productivity.*

**Лушников Владимир Петрович**, доктор с.-х. наук, профессор кафедры «Технология производства и переработки продукции животноводства», Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова; 410005, г. Саратов, Соколовая, 335; тел.: +79297718448, e-mail: lushnikovvp@mail.ru

**Фетисова Татьяна Олеговна**, ст. лаборант кафедры «Технология производства и переработки продукции животноводства»; тел.: +79873524211, e-mail: tat0775@yandex.ru

**Стрильчук Андрей Александрович**, аспирант кафедры «Технология производства и переработки продукции животноводства»; тел.: +79271633556, e-mail: andreiasp@yandex.ru