

ВЛИЯНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ MYOD₁ НА ПОКАЗАТЕЛИ МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ОВЕЦ СЕВЕРОКАВКАЗСКОЙ ПОРОДЫ

КРИВОРУЧКО Александр Юрьевич, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр»

СЕЛИОНОВА Марина Ивановна, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр»

САФАРЯН Елена Юрьевна, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр»

ЯЦЫК Олеся Андреевна, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр»

Проведены исследования, касающиеся поиска однонуклеотидных замен в гене MyoD₁, связанных с продуктивными качествами овец северокавказской породы. Объект исследования – баранчики северокавказской породы (15 голов). Геномную ДНК выделяли из образцов цельной крови. Проверку качества образцов выделенной ДНК определяли спектрофотометрическим методом с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000/2000C. Образец геномной ДНК использовался для целевого секвенирования последовательности гена MyoD₁. Сравнительный анализ убойных показателей баранчиков северокавказской породы с различными аллелями гена MyoD₁ позволил выявить однонуклеотидную замену (с.*1279A>C), связанную с продуктивными качествами. Анализ убойных показателей продуктивности между животными, гомозиготными по аллелю дикого типа с.*1279A и несущими мутантный аллель с.*1279C, показал достоверные различия. Исходя из этого, для улучшения продуктивных качеств баранчиков северокавказской породы рекомендуется закрепить в популяции аллель с.*1279A.

Введение. В мировом овцеводстве одним из важных направлений селекции является повышение мясной продуктивности. Это касается как количественных признаков (выход туши, мякоти, коэффициент мясности), так и качественных, в том числе органолептических свойств, определяющих потребительский спрос на баранину на мировом рынке [3, 5, 7, 11].

Несмотря на большое количество исследований, методы геномной и маркер-ассоциированной селекции до настоящего времени не нашли широкого применения в овцеводстве, в отличие от молочного и мясного скотоводства. Связано это с двумя важными причинами. Во-первых, большое количество разводимых пород овец приводит

к значительному разнообразию аллельных вариантов уже известных генов, влияющих на развитие мышечной ткани. Во-вторых, множество генов, которые участвуют в развитии и росте мышечной ткани, на сегодняшний день недостаточно изучены. В связи с этим актуально проведение исследований по поиску генов-кандидатов, аллели которых можно будет использовать в качестве генетических маркеров мясной продуктивности [6].

Перспективным геном-кандидатом у овец на сегодняшний день является MyoD₁, кодирующий один из четырех важных миогенных регуляторных факторов семейства «MRF». Его белковый продукт имеет большое значение в развитии мышечной ткани





в эмбриональном и постэмбриональном периоде у сельскохозяйственных животных [8, 16]. MyoD1 кодирует белок длиной 319 аминокислот, играющий важную роль в активации экспрессии генов, необходимых для дифференцировки миообластов в миоциты [14].

В ходе исследований учеными было доказано влияние полиморфизмов гена MyoD1 на мясную продуктивность крупного рогатого скота [12], свиней [13, 15], птицы [8, 10]. Подобных исследований овец российских пород не проводилось. Одной из ведущих полутонкорунных пород в России признана северокавказская. Порода характеризуется высоким уровнем мясной продуктивности. Мясные формы четко выражены – глубокая грудь; широкая поясница, спина; крепкие устойчивые ноги, окорока широкие. Характерный признак овец данной породы – высокая скороспелость [1, 2, 4].

Исходя из вышеизложенного, цель данной работы – поиск однонуклеотидных полиморфизмов у овец, связанных с мясной продуктивностью.

Методика исследований. Исследования выполняли на базе лабораторий Научно-диагностического и лечебно-ветеринарного центра (НДиЛВЦ) Ставропольского ГАУ, лаборатории Ставропольского научно-исследовательского противочумного института и лабораторий Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства – филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр». Объектом исследования служили баранчики северокавказской породы (возраст 12 месяцев). Геномную ДНК выделяли из образцов цельной крови, отбираемой из яремной вены, с использованием набора Pure Link Genomic DNA MiniKit (Invitrogen Life Technologies, США) в соответствии с протоколом производителя. Проверку качества образцов выделенной ДНК проводили спектрофотометрическим методом с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000/2000C (Thermo Fisher, США). Образец геномной ДНК использовался для целевого секвенирования гена MyoD1.

Библиотеки фрагментов ДНК животных были подготовлены в соответствии с протоколом Rapid Library Preparation Method Manual (Roche NimbleGen, США). Очистку амплифицированной библиотеки ДНК проводили с применением колонок QIAquick PCR Purification column (QIAGEN, Нидер-

ланды). Проверку качества библиотеки ДНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (ThermoFisher, США). Секвенирования методом «NGS» выполняли на геномном секвенаторе GS Junior (Roche NimbleGen, США) с помощью набора реагентов GS Junior Titanium Sequencing Kit (Roche NimbleGen, США). Данные, полученные в результате секвенирования, выравнивали на геном овцы (*Ovis aries*), сборка ovi Ari 4.0 (NCBI Genome) – с помощью программного обеспечения GS RM v2.9 (Roche NimbleGen, США).

Для описания однонуклеотидных замен использовали номенклатуру HGVS (www.hgvs.org). Оценку мясной продуктивности выполняли по методике, разработанной ГНУ СНИИЖК (г. Ставрополь). Были взяты промеры, которые характеризуют общее развитие животного. Для наиболее полного изучения продуктивных качеств проводили контрольный убой животных. Взвешивание целой туши, а также отдельных частей и органов проводили с точностью до 1 г на весах SVI-50C (Acculab, США). Живую массу определяли путем индивидуального взвешивания с применением весов Эльтон (Ск) – 150 (Россия). Анализ статистических различий показателей мясной продуктивности между баранчиками с различными генотипами выполняли в программе Microsoft Excel 2016 (Microsoft, США) с применением *t*-теста Стьюдента. Достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты исследований. В ходе проведенных исследований в 5' фланкирующей области гена MyoD1 нами было обнаружено 15 однонуклеотидных замен (табл. 1), пять из которых не внесены в базу данных NCBI. Это замены с.-1608 С>Т, с.-1603 G>Т, с.-1578 G>А, с.-1176 А>G и с.-932 G>Т. У исследованных животных наибольшую частоту встречаемости имели мутантные аллели с.-1806G (83 %), с.-1608Т и с.-1603Т (100 %).

Мутации с.-1806 А>G, с.-1608 С>Т, с.-1603 G>Т были найдены в структуре гена MyoD1 у всех исследованных животных. Замены с.-1607 С>А и с.-932 G>Т были обнаружены у одной особи в гетерозиготном варианте. Частота встречаемости мутантного аллеля составила 6 %.

В области первого экзона в ходе исследований было обнаружено 15 мутаций (табл. 2), четыре из которых не внесены в базу данных (с. 245 С>Т, с. 247 G>Т, с. 254 G>Т,

Мутации в 5' фланкирующей области гена *MyoD1* у овец северокавказской породы

№	Идентификационный номер (NCBI)	SNP	Область
1	rs 404 884 444	c.-2112 C>G	5' фланкирующая
2	rs 597 385 459	c.-1807 C>T	
3	rs 424 553 252	c.-1806 A>G	
4	rs 406 278 149	c.-1687 T>C	
5	Нет в базе данных	c.-1608 C>T	
6	rs 596 561 479	c.-1607 C>A	
7	Нет в базе данных	c.-1603 G>T	
8	Нет в базе данных	c.-1578 G>A	
9	rs 425 767 816	c.-1447 C>T	
10	rs 412 308 724	c.-1235 G>A	
11	Нет в базе данных	c.-1176 A>G	
12	Нет в базе данных	c.-932 G>T	
13	rs 412 662 330	c.-880 G>A	
14	rs 409 662 616	c.-637 C>T	
15	rs 420 129 038	c.-412 G>T	

с. 270 C>G). Двенадцать мутаций встречались у 100 % подопытных животных, за исключением трех замен – с. 245 C>T, с. 247 G>T, с. 326 T>C. Однонуклеотидные замены с. 245 C>T и с. 247 G>T встречались у 93 % животных, замена с. 326 T>C – у 13 %.

В 3' фланкирующей области гена *MyoD1* нами было выявлено 10 мутаций (табл. 3), три из которых не внесены в базу данных.

Высокую частоту встречаемости имел мутантный аллель с.*1279C – 63 %. Низкую частоту встречаемости выявили для мутантных аллелей с.*706G, с.*1258T, с.*1379A, с.*1834A (3 %). Однонуклеотидные замены с.*706 A>G, с.*1258 G>T, с.*1379 G>A и с.*1834 G>A встречались только у одного исследуемого животного в гетерозиготном варианте.

Для оценки взаимосвязи полиморфизма гена *MyoD1* с продуктивными качествами у овец северокавказской породы на роль маркера мясной продуктивности нами была отобрана мутация с.*1279 A>C, имеющая достаточную для этого частоту встречаемости.

Сравнительный анализ прижизненных показателей продуктивности животных, гомозиготных по аллелю дикого типа (с.*1279A), и животных, несущих мутантный аллель (с.*1279C) достоверных различий не выявил. Однако достоверные различия были выявлены при сравнительном анализе убойных показателей между баранчиками с генотипом дикого типа и баранчиками, несущими мутантный аллель (табл. 4).

Таблица 2

Мутации в области первого экзона гена *MyoD1* у овец северокавказской породы

№	Идентификационный номер (NCBI)	SNP	Область
1	rs 868 996 545	c. 244 C>A	Экзон I
2	Нет в базе данных	c. 245 C>T	
3	Нет в базе данных	c. 247 G>T	
4	Нет в базе данных	c. 254 G>T	
5	rs 868 996 540	c. 260 G>C	
6	rs 868 996 539	c. 262 C>T	
7	Нет в базе данных	c. 270 C>G	
8	rs 868 996 537	c. 275 C>A	
9	rs 868 99 6536	c. 277 C>G	
10	rs 868 996 535	c. 278 C>A	
11	rs 868 996 534	c. 280 C>T	
12	rs 868 996 533	c. 282 C>A	
13	rs 868 996 532	c. 288 C>A	
14	rs 599 663 516	c. 326 T>C	
15	rs 868 996 531	c. 484 C>T	



Мутации в 3' фланкирующей области гена *MyoD1* у овец северокавказской породы

№	Идентификационный номер (NCBI)	SNP	Область
1	rs 418 127 847	c.*486 A>C	3' фланкирующая
2	Нет в базе данных	c.*706 A>G	
3	rs 409 089 414	c.*825 G>C	
4	Нет в базе данных	c.*1258 G>T	
5	rs 428 554 459	c.*1279 A>C	
6	rs 415 349 259	c.*1379 G>A	
7	rs 406 127 036	c.*1561 G>A	
8	Нет в базе данных	c.*1834 G>A	
9	rs 416 501 217	c.*1840 C>T	
10	rs 403 138 072	c.*2065 A>G	

Таблица 4

Сравнительный анализ прижизненных и убойных показателей овец северокавказской породы между животными с генотипом дикого типа и носителями мутации

№	Показатели прижизненные, см, и убойные, кг	Замена – с.*1279 A>C		p
		генотип AA M±m	генотипы – CC, AC M±m	
1	Высота в холке	72,6±0,76	70,8±1,18	0,19
2	Длина туши	87,8±0,82	87,4±0,45	0,65
3	Обхват груди	104,6±1,44	101,3±1,29	0,09
4	Глубина груди	33,6±0,57	33,0±0,82	0,53
5	Ширина груди	29,0±0,61	27,6±0,61	0,11
6	Ширина поясницы	19,0±0,61	18,2±0,49	0,29
7	Живая масса перед откормом	60,0±1,12	55,5±1,47	0,02*
8	Живая масса после откорма	68,4±1,23	63,4±1,72	0,02*
9	Предубойная живая масса	66,4±1,18	61,6±1,65	0,02*
10	Убойная масса туши	32,9±0,50	30,3±0,79	0,01*
11	Масса парной туши	32,1±0,49	29,7±0,78	0,01*
12	Масса внутреннего жира	0,7±0,03	0,6±0,02	0,04*
13	Масса печени	0,8±0,03	0,7±0,02	0,02*
14	Бедро, всего	3,0±0,03	2,9±0,10	0,28
15	Бедро, мякоть	2,7±0,03	2,6±0,09	0,12
16	Голень, всего	0,8±0,01	0,7±0,02	0,17
17	Голень, мякоть	0,4±0,02	0,4±0,02	0,10
18	Крестец, всего	1,2±0,04	1,2±0,06	0,35
19	Крестец, мякоть	0,7±0,07	0,7±0,06	0,61
20	Поясница, всего	1,7±0,09	1,5±0,04	0,14
21	Поясница, мякоть	1,4±0,04	1,1±0,04	0,01*
22	Грудь, всего	4,5±0,15	4,0±0,15	0,01*
23	Грудь, мякоть	3,4±0,11	2,9±0,14	0,01*
24	Лопатка, всего	1,3±0,05	1,2±0,03	0,42
25	Лопатка, мякоть	1,1±0,07	1,0±0,03	0,47
26	Плечо, всего	0,9±0,03	0,9±0,04	0,87
27	Плечо, мякоть	0,7±0,03	0,7±0,04	0,68
28	Предплечье, всего	0,4±0,01	0,4±0,01	0,67
29	Предплечье, мякоть	0,2±0,01	0,2±0,01	0,10
30	Шея, всего	1,4±0,05	1,3±0,04	0,14
31	Шея, мякоть	1,0±0,05	0,9±0,05	0,33
32	Абсолютная масса мякоти	12,0±0,30	10,8±0,41	0,03*
33	Коэффициент мясности	3,3±0,09	2,9±0,11	0,02*
34	Убойный выход, %	49,5±0,01	0,4±0,01	0,69

* различия достоверны при $p < 0,05$.



У животных с мутацией с.*1279С живая масса перед откормом была достоверно меньше (на 7,6 %), чем у животных без мутации. Живая масса после откорма и предубойная живая масса у баранчиков с мутацией достоверно меньше на 7,3 %, чем у баранчиков, не имеющих мутацию. Убойная масса туши и масса парной туши у животных с мутантным аллелем с.*1279С достоверно меньше (на 9 %), чем у животных, несущих аллель дикого типа с.*1279А. У особей с мутантным аллелем с.*1279С масса внутреннего жира была достоверно меньше (на 13 %), чем у баранчиков с аллелем дикого типа с.*1279А. По массе печени баранчики, у которых был выявлен мутантный аллель с.*1279С, достоверно (на 11,2 %) уступали животным, не имеющим данный аллель.

Масса мякоти при обвалке поясницы у животных с мутантным аллелем с.*1279С была меньше на 15 % ($p<0,05$), чем у баранчиков, несущих аллель дикого типа в гомозиготном варианте. Масса груди у носителей мутации (с.*1279 А>С) была на 12,3 % меньше, чем у животных, не имеющих данную замену. Масса мякоти, полученной при обвалке груди, у носителей мутации была достоверно меньше (на 15,4 %), чем у животных, не имеющих этой мутации в геноме. Абсолютная масса мякоти у баранов, гомозиготных по аллелю с.*1279С, была достоверно меньше (на 9,4 %), чем у баранов, гомозиготных по аллелю дикого типа (см. табл. 4).

По коэффициенту мясности подопытные баранчики, несущие мутантный аллель с.*1279С, на 11 % достоверно уступали баранчикам, несущим аллель дикого типа в гомозиготном варианте. По остальным убойным показателям между носителями мутантного аллеля с.*1279С и животными с диким генотипом достоверных различий не выявлено.

Заключение. В ходе проведенных исследований в 5' фланкирующей области гена MyoD1 нами обнаружено 15 однонуклеотидных замен, пять из которых обнаружены впервые. В области первого экзона было найдено 15 мутаций, четыре из них не найдены в базе данных и выявлены впервые. В 3' фланкирующей области гена MyoD1 нами было выявлено 10 мутаций, три из которых не внесены в базу данных однонуклеотидных полиморфизмов у овец.

В ходе сравнительного анализа убойных показателей продуктивности между живот-

ными, гомозиготными по аллелю дикого типа с.*1279А, и животными, несущими мутантный аллель с.*1279С, были выявлены достоверные различия. На основании проведенных исследований в качестве маркера мясной продуктивности для овец северокавказской породы рекомендуется использовать замену с.*1279 А>С. Для улучшения продуктивных качеств баранчиков северокавказской породы рекомендуется закрепить в популяции аллель с.*1279А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Омаров А.А. Динамика роста и развития молодняка северокавказской мясо-шерстной породы и помесей разных генотипов // Сб. науч. тр. Всерос. науч.-исслед. ин-та овцеводства и козоводства. – 2012. – Т. 1. – № 5. – С. 27–29.
2. Отрадных В.А., Фролов В.А. Продуктивность овец Северокавказской породы // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2005. – № 1. – С. 40–44.
3. Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификация племенного материала в животноводстве / Н.А. Зиновьева [и др.]. – М., 2008. – 329 с.
4. Создание внутривидового типа овец северокавказской мясошерстной породы для центральной зоны Ставрополя / И.С. Исмаилов [и др.] // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2008. – № 3. – С. 10–15.
5. Телегина Е.Ю., Криворучко А.Ю., Яцык О.А. Взаимосвязь полиморфизма гена MyoD1 с показателями мясной продуктивности овец ставропольской породы // Аграрный научный журнал. – 2018. – № 6. – С. 21–25.
6. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4(2). – С. 59–64.
7. Яковлев А.Ф., Смарагдов А.Ф. ДНК-технологии в селекции сельскохозяйственных животных // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 8. – С. 49–51.
8. An SNP in the MyoD1 Gene Intron 2 Associated Populations / Y. Wu [et al.] // Biochem Genet., 2012, № 5, P. 898–907.
9. Embryonic Myogenesis Pathways in Muscle Regeneration / P. Zhao [et al.] // Developmental Dynamics, 2004, Vol. 229, No. 2, P. 380–392.
10. Genetic effects of polymorphisms in myogenic regulatory factors on chicken muscle fiber traits / Z.Q. Yang [et al.] // Journal of Animal Sciences, 2015, Vol. 28, No. 6, P. 782–787.
11. Genomic selection as a possible accelerator of traditional selection, russ / M.G. Smaragdov [et al.] // Journal of Genetics, 2009, Vol. 45, No. 6, P. 633–639.

12. Identification of SNPs in MYOD gene family and their associations with carcass traits in cattle / M. Bhuiyan [et al.] // *Livestock Science*, 2009, Vol. 26, P. 292–297.

13. Impact of MYOD family genes on pork traits in Large White and Landrace pigs. / J. Verner [et al.] // *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2007, Vol. 124(2), P. 81–85.

14. Myf5 expression in satellite cells and spindles in adult muscle is controlled by separate genetic elements / P.S. Zammit [et al.] // *Developmental Biology*, 2004, Vol. 273, No. 2, P. 454–465.

15. The impact of MYOG, MYF6 and MYOD1 genes on meat quality traits in crossbred pigs / R. Stupka [et al.] // *African Journal of Biotechnology*, 2012, Vol. 11, No. 88, P. 15405–15409.

16. The potential of muscle stem cells. / P. Seale [et al.] // *Developmental cell*, 2001, Vol. 1, No. 3, P. 333–342.

Криворучко Александр Юрьевич, д-р биол. наук, директор, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр». Россия.

Селионова Марина Ивановна, д-р биол. наук, проф., зав. лабораторией геномной селекции и репродуктивной криобиологии, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр». Россия.

Сафарян Елена Юрьевна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории геномной селекции и репродуктивной криобиологии, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр». Россия.

Яцык Олеся Андреевна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории геномной селекции и репродуктивной криобиологии, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр». Россия.

355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 15.
Тел.: 8(8652) 71-70-33.

Ключевые слова: мясные качества; северокавказская порода; баранчики; ген; MyoD1; мутация.

INFLUENCE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN MYOD1 GENE ON MEAT PRODUCTIVITY INDICES IN SHEEP OF NORTH CAUCASIAN BREED

Krivoruchko Alexander Yurievich, Doctor of Biological Sciences, Director, All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch of the North Caucasus Federal Scientific Agricultural Center, Russia.

Selionova Marina Ivanovna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the laboratory of genomic selection and reproductive Cryobiology, All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch of the North Caucasus Federal Scientific Agricultural Center, Russia.

Safaryan Elena Yurievna, Candidate of Biological Sciences, Researcher, All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch of the North Caucasus Federal Scientific Agricultural Center, Russia.

Yatsyk Olesya Andreevna, Candidate of Biological Sciences, Researcher, All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch of the North Caucasus Federal Scientific Agricultural Center, Russia.

Keywords: Meat qualities; North Caucasian breed; rams; gene; MyoD1; mutation.

The aim of the study was to search for single-nucleotide substitutions in the *myod1* gene associated with productive qualities in North Caucasian sheep. The object of research – sheep of the North Caucasian breed (15 heads). Genomic DNA was isolated from whole blood samples. The quality control of the isolated DNA

samples was determined by spectrophotometric method using NanoDrop 2000/2000C spectrophotometer. The genomic DNA sample was used for target sequencing of the *myod1* gene sequence. Sequencing was performed by NGS method on GS Junior sequencer (Roche NimbleGen, USA). A set of reagents "GS Junior Titanium Sequencing Kit" was used for sequencing. The data obtained by sequencing were aligned on the sheep genome (*Ovis aries*), Assembly ovi Ari 4.0 (National Center for Biotechnology Information Genome), using the software "GS RM v2.9" (Roche NimbleGen, USA). Assessment of meat productivity of sheep of the North Caucasian breed was carried out on lifetime and slaughter indicators. The analysis of the reliability of differences in meat productivity between rams with different genotypes was performed in Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA) using the student's t-test. Comparative analysis of slaughter indices of North Caucasian rams with different alleles of the *myod1* gene revealed a single-nucleotide replacement (c.*1279A>C) associated with productive qualities. The analysis of slaughter productivity indices between animals homozygous by the wild-type allele c.*1279A and carrying the mutant allele c.*1279C showed significant differences. Based on this, to improve the productive qualities of sheep of the North Caucasian breed, it is recommended to fasten the allele c.*1279A in the population.

