

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНУ CAST У ОВЕЦЬ КАРАКУЛЬСЬКОЇ ПОРОДИ

В. М. Іовенко, Н. Б. Писаренко, К. В. Скрепець
nadezhda.pisarenko@ukr.net

Інститут тваринництва степових районів імені М. Ф. Іванова
«Асканія-Нова» – Національний науковий селекційно-генетичний
центр з вівчарства
вул. Соборна, 1, смт Асканія-Нова, Чаплинський р-н,
Херсонська обл., 75230, Україна

Знання основних генів, пов'язаних із інтенсивністю росту та м'ясною продуктивністю овець, є актуальними у зв'язку з підвищенням попиту на баранину та молоду ягнятину.

Одним з основних генів, які впливають на м'ясні ознаки овець, є калпастатин (CAST). Він входить до родини Ca^{2+} -залежних нейтральних протеаз та регулює швидкість дозрівання м'яса після забою і ступінь його ніжності.

*Досліджено поліморфізм гену CAST у племінних баранів-плідників ($n=91$) каракульської породи. Визначення генотипу тварин проводилося методом ПЛР-ПДРФ з використанням ендонуклеази рестрикції *MspI*. Розділення продуктів рестрикції гену CAST здійснювалося у 2 % агарозному гелі з бромистим етідієм. Виділення геномної ДНК проводили за стандартною методикою з використанням набору реагентів ДНК Сорб-Б.*

Виявлено фрагменти довжиною 622, 336 та 286 п.н. У носіїв генотипу MM присутній один сайт рестрикції з довжиною фрагментів 339 п.н. та 286 п.н. Для генотипу MN характерною є наявність трьох фрагментів довжиною 622 п.н., 339 п.н. та 286 п.н., а для NN – тільки фрагменту 622 п.н.

За результатами досліджень поліморфізму гену калпастатину каракульська порода характеризується високою частотою гомозигот MM, яка становить 0,692, у той час як гетерозиготних генотипів за N-алелем виявлено тільки два (0,022). Частота гетерозигот MN була на рівні 0,286. В результаті такого розподілу генотипів спостерігається перевага алелю M (0,835), який встановлено у 83,5 % тварин. Частота алелю N становить усього 0,165 або 16,5%.

Ключові слова: вівці, каракульська порода, ген CAST, поліморфізм.

POLYMORPHISM of GENE CAST KARAKUL BREED of SHEEP

V. M. Iovenko, N. B. Pysarenko, K. V. Skrepets
nadezhda.pisarenko@ukr.net

Ascania Nova Institute of Animal Breeding in the Steppe Regions
named after M. F. Ivanov - National Scientific Selection-Genetics
Center for Sheep Breeding
1, Soborna Street, Askania Nova, Chaplynka district,
Kherson region, 75230, Ukraine

Knowledge of basic genes associated with the intensity of growth and meat productivity of sheep, are relevant in connection with the increase in demand for mutton and meat of young lambs.

One of the major genes, that affect the quality of meat of sheep, is calpastatin (CAST). It is part of a family of Ca²⁺ -dependent neutral proteases and adjusts the speed of maturation of meat and its degree of tenderness after slaughter.

Polymorphism of CAST gene in sire rams (n = 91) Karakul Breed was researched. Determination of genotype of animals was carried out by PCR-RFLP using the endonuclease of restriction MspI. Separation of the products of restriction gene CAST was performed in 2% agarose gel with ethidium bromide. Isolation of genomic DNA was performed according to standard procedures using DNA reagent kit Sorb-B. It was found the fragments of length 622, 336 and 286 bp. In carriers of genotype MM one restriction site is present, and it has length of fragments - 339 bp and 286 bp. The genotype MN is characterized by the presence of three fragments of 622 bp, 339 bp and 286 bp, and NN has only a fragment of 622 bp.

According to the results of studies of the gene polymorphism of calpastatin of Karakul breed of sheep is characterized by a high frequency of the homozygote MM, which is 0.692, while homozygous genotype of N allele is found only two (0,022). Frequency of the heterozygote MN was at 0.286. As a result of the distribution of genotypes it is observed the prevalence of allele M (0,835), which is defined at 83.5% of the animals. The frequency of the N allele is only 0,165, or 16.5%.

Keywords: sheep, Karakul breed of sheep, gene CAST, polymorphism.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА CAST У ОВЕЦ КАРАКУЛЬСКОЙ ПОРОДЫ

В. Н. Иовенко, Н. Б. Писаренко, К. В. Скрепец
nadezhda.pisarenko@ukr.net

Институт животноводства степных районов имени М. Ф. Иванова
«Аскания-Нова» – Национальный научный селекционно-
генетический центр по овцеводству
ул. Соборная, 1, пгт Аскания-Нова, Чаплинский р-н,
Херсонская обл., 75230, Украина

Знание основных генов, связанных с интенсивностью роста и мясной продуктивностью овец, актуальны в связи с повышением спроса на баранину и молодую ягнятину.

Одним из основных генов, которые влияют на мясные качества овец, является кальпастан (CAST). Он входит в семейство Ca^{2+} -зависимых нейтральных протеаз и регулирует скорость созревания мяса и степень его нежности после забоя.

Исследован полиморфизм гена CAST у племенных баранов ($n = 91$) каракульской породы. Определение генотипов животных проводилось методом ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеазы рестрикции MspI. Разделение продуктов рестрикции гена CAST осуществлялось в 2% агарозном геле с бромистым этидием. Выделение геномной ДНК проводили по стандартной методике с использованием набора реагентов ДНК Сорб-Б.

Обнаружены фрагменты длиной 622, 336 и 286 п.н. У носителей генотипа MM присутствует один сайт рестрикции, с длиной фрагментов 339 п.н. и 286 п.н. Для генотипа MN характерно наличие трех фрагментов длиной 622 п.н., 339 п.н. и 286 п.н., а для NN - только фрагмент 622 п.н.

По результатам исследований полиморфизма гена кальпастана каракульская порода характеризуется высокой частотой гомозигот MM, которая составляет 0,692, в то время как гомозиготных генотипов по N аллелю выявлено только два (0,022). Частота гетерозигот MN была на уровне 0,286. В результате такого распределения генотипов наблюдается преобладание аллеля M (0,835), который определен у 83,5% животных. Частота аллеля N составляет всего 0,165 или 16,5%.

Ключевые слова: овцы, каракульская порода, ген CAST, полиморфизм.

Підвищення генетичного потенціалу тварин здебільшого визначається наявністю інформації щодо генів, які контролюють ознаки продуктивності і дають змогу цілеспрямовано добирати та підбирати тварин [1]. Ефективність використання маркердопоміжної селекції у вівчарстві доведено в ряді країн світу, які є лідерами з виробництва продукції цієї галузі (Австралія, Нова Зеландія, країни Середземномор'я). Виявлено гени, пов'язані з багатоплідністю, молочною продуктивністю та якістю м'яса [2].

На сьогодні знання основних генів, пов'язаних із інтенсивністю росту та м'ясною продуктивністю овець, є актуальними у зв'язку з підвищенням попиту на баранину та молоду ягнятину.

Калпаїн-калпастатинова система (CCS) включає до себе сімейство Ca^{2+} -залежних нейтральних протеаз. [3]. Калпастатин є специфічним інгібітором Ca^{2+} -залежних протеолітичних ферментів (M і μ калпаїнів) і регулює швидкість дозрівання м'яса після забою та ступінь його ніжності [4, 5].

Ніжність м'яса після забою зумовлюється деградацією ключових міофібрилярних білків і білків цитоскелету. При деградації цих білків розриваються зв'язки м'язового волокна, що призводить до ослаблення структури м'язів. В результаті цього м'ясо стає ніжним. Це робить ген CAST відмінним кандидатом для управління м'ясними якостями сільськогосподарських тварини [6].

Ряд досліджень показали, що калпаїн-калпастатинова система також має важливе значення в нормальному рості скелетних м'язів. Швидкість і ступінь зростання скелетних м'язів залежить в основному від трьох чинників: швидкості синтезу м'язових білків, швидкості деградації м'язових білків, а також кількості та розміру клітин скелетних м'язів. Збільшення швидкості росту скелетних м'язів може бути результатом зниження швидкості деградації м'язового білка і це пов'язано зі зниженням активності калпаїна, обумовлено, головним чином, значним збільшенням активності калпастатина [7]. Саме тому генетичний поліморфізм гена CAST і його вплив на якість м'яса можуть бути використані як інструмент для прогнозування ніжності м'яса та інтенсивності росту у овець [8, 9].

Ген калпастатину (CAST) у овець розташовано на п'ятій хромосомі у першому інtronі. На молекулярному рівні калпастатин складається з п'яти доменів, що мають молекулярну масу 76 кДа. У літературі описані два алельні варіанти гену (M і N), визначені методом ПЛР-ПДРФ [10].

Матеріал і методика досліджень. Дослідження поліморфізму гену CAST проведено у лабораторії молекулярної генетики Інституту тваринництва степових районів імені М.Ф. Іванова "Асканія-Нова" на племінних баранах-плідниках (n=91) каракульської породи ТОВ

"Виробничо-комерційна фірма "Бородіно-А" Тарутінського району Одеської області.

Визначення генотипу тварин здійснювалося методом ПЛР-ПДРФ. Виділення геномної ДНК проводилося за стандартною методикою з використанням набору реагентів ДНК Сорб-Б (Амплісенс).

Для ампліфікації фрагмента гена CAST використовували наступні праймери [10]:

F: 5'- TGGGGCCCAATGACGCCATCGATG-3'

R: 5'- GGTGGAGCAGCACTTCTGATCACC-3'.

ПЛР проводили з використанням програмованого ампліфікатора Libe Line за наступними температурними режимами: початкова денатурація 5 хв. при 94°C, з наступними 33 циклами: денатурація – 15 сек. при 94°C, відпал праймерів – 30 сек. при 60°C і синтез – 30 сек. при 72°C. Завершує реакцію кінцевий синтез – 5 хв. при 72°C. Довжина ампліфікованого фрагменту складає 622 п.н.

Для рестрикції гена CAST використовували рестриктазу MspI. У носіїв генотипу MM присутній один сайт рестрикції, з довжиною фрагментів 339 п.н. та 286 п.н. Для генотипу MN характерна наявність трьох фрагментів довжиною 622 п.н., 339 п.н. та 286 п.н., а для NN – тільки фрагмент 622 п.н.

Результати досліджень. Результати розділення продуктів рестрикції гена CAST рестриктазою MspI у 2% агарозному гелі наведено на рисунку 1. Виявлено фрагменти довжиною 622, 336 та 286 п.н., що свідчить про наявність поліморфізму за цим локусом.

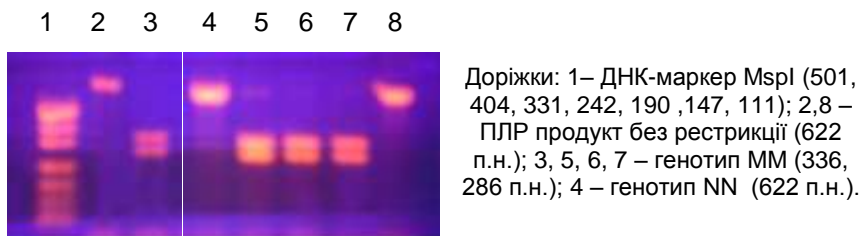


Рис. 1. Електрофореграма розділення продуктів рестрикції гена CAST (рестриктаза MspI) у овець каракульської породи

За результатами досліджень поліморфізму гена калпастанину каракульська порода характеризується високою частотою гомозигот MM (табл.1), яка становить 0,692, у той час, як гомозиготних генотипів за N-алелем виявлено тільки два (0,022). Частота гетерозигот MN була на рівні 0,286. В результаті такого розподілу генотипів спостерігається перевага алелю M (0,835), який встановлено у 83,5 %

тварин. Частота алелю N становить усього 0,165 або 16,5%.

Таблиця 1. Частоти алелів і генотипів овець каракульської породи за геном CAST

Показник	Алель		Генотип		
	M	N	MM	MN	NN
n	152	30	63	26	2
Частота	0,835	0,165	0,692	0,286	0,022

Аналогічні результати були отримані Shahroudi F.E (2006) при дослідженні локусу калпастатину у овець каракульської породи (n=100), яких розводять в Ірані. Встановлено алелі M і N з частотою 0,79 і 0,21. Частоти генотипів MM, MN і NN розподілилися наступним чином: 0,61, 0,36, 0,03 [11].

Ряд авторів у своїх дослідження вказують на високу частоту алелю M. Так, наприклад, у польських мериносів його частота становить 0,762, у овець породи Totally – 0,835 [12], у овець арабської породи – 0,850 [13], турецької породи овець KIV – 0,847 [14]. У овець породи Lacaune та східної фрізьської не виявлено алель N. Ці породи є малочисельними, що, певною мірою, вплинуло на відсутність поліморфізму за калпастатиновим локусом [4].

Висновки. Встановлено особливості генетичної структури за геном калпастатину у овець каракульської породи, яка розводиться в південному регіоні України. У цій популяції найбільш поширеним є алель M (0,835) та генотипи MM (0,692).

Відомо, що CAST є геном-кандидатом, пов'язаним з ніжністю м'яса. Для того, щоб використовувати в селекційній роботі результати генетичних досліджень потрібно проводити порівняння показників м'ясної продуктивності овець з різними генотипами за геном CAST. Подальшу роботу необхідно спрямовувати на формування бази даних атестованих тварин за основними селекційними ознаками.

Список використаної літератури

1. Копилов К. В. Методологія оцінки генотипу тварин за молекулярно-генетичними маркерами у тваринництві України / К. В. Копилов, О. М. Журкорський, К. В. Копилова та ін. : за наук. ред. акад. НААН М. В. Гладія. – К.:

Аграрна наука. – 2015. – 212 с.

2. Anani Azari M. Polymorphism of calpastatin, calpain and myostatin genes in native Dalagh sheep in Iran / M. Anani Azari, E. Dehnavi, S. Yosefi, L. Shahmohamadi // *Slovak J. Anim. Sci.* – 2012. – Vol. 45. – № 1. – P. 1-6.

3. Chung H.Y. Effect of the Calpain proteolysis and Calpain genotype on meat tenderness of Angus Bulls / Davis M.E., Hines H.C., Wulf D.M. // (1999). *J. Anim. Sci.* – 1999. – Vol. 77. – P. 31-38.

4. Gabor M. Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method / M. Gabor, A. Trakovicka, M. Miluchova // *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.* (Lucrari stiinti fice Zootehnie si Biotehnologii). – 2009. – Vol. 42. – P. 470-476.

5. Palmer B.R. Candidate gene approach to animal quality traits / B.R. Palmer, N. Robert, M.P. Kent // *Proc. New Zealand Soc Anim. Prod.* – 1999. – Vol. 57. – P. 294-296.

6. Koohmaraie M. The role of the Ca²⁺-dependent protease (Calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie.* (1992) 74: 239-245.

7. Goll D.E., (1998). The calpain system and skeletal muscle growth. / Thompson VF, Taylor RG, Ouali A // *Canadian J. Animal Sci.* – 1998. – Vol. 78. – P. 503-512.

8. Seiler J. The future role of molecular genetics in the control of meat production and meat quality / J. Seiler // *Meat Sci.* – 1994. – Vol. 36. – P. 29.

9. Zhang Li. Genome-Wide association studies for growth and meat production traits in sheep / L. Zhang, L. Jiasen, Z. Fuping, R. Hangxing [et al.] // *Plos One.* – 2013. – Vol. 8(6). – P. 1-12.

10. Palmer B.R. Rapid communication: PCR-RFLP for Mspi And Ncoi in the ovine calpastatin gene / B.R. Palmer, N. Roberts, J.G. Hickford, R. Bickerstaffe // *J. Anim. Sci.* – 1998. – Vol. 76. – P. 1499–1500.

11. Shahroudi F.E. Genetic polymorphism at MTR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep / F.E. Shahroudi, M.R. Nassiry, R. Valizadh, A.H. Moussavi, M. Tahmoorespour and H. Ghiasi // *Iranian Journal of Biotechnology.* – 2006, Vol. 4, No. 2. – P.117-122.

12. Szkudlarek-Kowalczyk M. Polymorphisms of calpastatin gene in sheep / Magdalena Szkudlarek-Kowalczyk, Ewa Wiśniewska, Sławomir Mroczkowski // *Journal of Central European Agriculture.* – 2011. – Vol. 12(3). – P. 425-432.

13. Mohammadi M. Polymorphism of calpastatin gene in Arabic sheep using PCR- RFLP / M. Mohammadi, M. T. Beigi Nasiri, K h. Alami-Saeid, J. Fayazi, M. Mamoe and A. S. Sadr / *African Journal of Biotechnology*– 2008, Vol. 7(15). – P.2682-2684.

14. Yilmaz O. Polymorphism of the ovine calpastatin gene in some Turkish sheep breeds / Onur Yilmaz, Tamer Sezenler, Nezih Ata, Yalçın Yaman, İbrahim Cemal, Orhan Karaca // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.* – 2014. – Vol. 38. – P. 354-357.