

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ У ОВЕЦ СЕВЕРОКАВКАЗСКОЙ МЯСО-ШЕРСТНОЙ ПОРОДЫ

© 2023 г. А. Ю. Криворучко^{1, 2, *}, Р. В. Зуев², А. И. Суров¹, А. В. Скокова¹,
А. А. Каниболоцкая¹, А. А. Лиховид², О. А. Яцык¹

¹Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр, Ставропольский край, Михайловск, 356241 Россия

²Северо-Кавказский Федеральный университет, Ставрополь, 355017 Россия

*e-mail: rcvm@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.08.2022 г.

После доработки 29.09.2022 г.

Принята к публикации 25.10.2022 г.

Поиск новых генов, влияющих на рост и развитие мышечной ткани, ассоциированных с признаками мясной продуктивности овец, является актуальной задачей, выполнение которой неразрывно связано с перспективами развития маркер-ориентированной и геномной селекции. В статье приведены данные по использованию нового подхода к обнаружению генов-кандидатов мясной продуктивности овец. Генотипирование животных выполняли с использованием ДНК-биочипов *Ovine Infinium HD BeadChip 600K*, поиск ассоциаций проводили с использованием программного обеспечения *PLINK V.1.07*. В ходе проделанной работы выявлены SNP, достоверно ассоциированные с фенотипическими признаками, характеризующими мясную продуктивность у овец северокавказской мясо-шерстной породы: высотой в холке, живой массой при рождении, толщиной жировой ткани, шириной “мышечного глаза”. Для поиска генов-кандидатов было отобрано 19 однонуклеотидных замен с наибольшей достоверностью ассоциаций. Определение местоположения анализируемых SNP позволило установить 16 новых генов-кандидатов, ассоциированных с прижизненными показателями мясной продуктивности овец северокавказской мясо-шерстной породы: *CILK1*, *ENO4*, *CTPS2*, *GABRB2*, *SLC44A1*, *C12ORF45*, *SLC41A2*, *CASD1*, *SINE2*, *SLC35F1*, *RP*, *SH3KBP1*, *LRRIQ1*, *SWAP70*, *THBS1* и *FSIP*. Генотипирование животных по этим генам следует использовать в маркер-ассоциированной селекции для улучшения показателей мясной продуктивности овец и изучения их влияния на фенотип.

Ключевые слова: овца, SNP, полногеномный поиск ассоциаций, ПГАА, ген-кандидат, северокавказская мясо-шерстная порода.

DOI: 10.31857/S0016675823050090, **EDN:** FNVKYA

Интенсивное развитие мясного овцеводства, связанное с возрастающим спросом на высококачественную баранину, обуславливает необходимость совершенствования существующих пород с целью повышения их продуктивных качеств. Одним из наиболее перспективных подходов для решения этой задачи является использование методов маркер-ассоциированной селекции по аллелям генов, влияющих на мясную продуктивность [1, 2].

В результате ранее проведенных научных исследований выявлен ряд генов, связанных с количественными и качественными показателями мясной продуктивности овец. Одним из наиболее изученных маркерных генов является ген *MSTN* (*myostatin*). Белковый продукт этого гена ограничивает рост мышечной ткани у млекопитающих. Присутствие аллелей гена, ассоциированных со

снижением функциональной активности миостатина, приводит к развитию фенотипа двойной мускулатуры [3, 4]. В качестве маркерных также были предложены гены, тем или иным образом влияющие на работу миостатина. Так, ген *MYOD1* (*myogenic differentiation 1*) влияет на параметры мясной продуктивности овец путем регуляции экспрессии *MSTN* [5]. Ген *FST* (*follicle-stimulating hormone*) рассматривается как перспективный маркер мясной продуктивности в связи с тем, что мышечные изоформы белка фолликуларного стимулирующего гормона обладают ингибирующей способностью в отношении миостатина [6]. Гормон роста обладает мощным анаболическим и антикатаболическим действием в различных типах клеток. В наибольшей степени эффект гормона проявляется в мышечной и хрящевой тканях [7]. Выявлена связь полиморфизма гена *GH* (*growth hormone*) с живой массой и показателя-

ми роста овец [8, 9]. Возникновение мутации каллипинги в межгенной области *DLK1* (*Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1*) – *GTL2* (*WAS/WASL-interacting protein family member*) вызывает эктопическую экспрессию кластера импринтированных генов в скелетных мышцах, что приводит к гипертрофии отдельных групп мышц бедер овец и снижению количества жира [10]. Также ранее было показано, что полиморфизм генов *REM1* (*RRAD and GEM like GTPase 1*), *MEF2B* (*myocyte enhancer factor 2B*) и *FABP4* (*fatty acid binding protein 4*) связан с рядом прижизненных и убойных показателей продуктивности у овец [11–13].

Несмотря на наличие достаточно большого количества информации о генах, влияющих на показатели мясной продуктивности у овец, их список далеко не полон. Это связано с участием множества белков и ферментов в формировании мышечных волокон, каждый из которых зависит от структуры и функций различного числа генов [14]. Также сложности при поиске новых генов мясной продуктивности возникают в связи с тем, что их эффект может быть скрыт наличием совокупности аллельных вариантов уже известных генов с доказанным влиянием на развитие мышц. Вместе с тем поиск новых генов, влияющих на рост и развитие мышечной ткани, связанных с фенотипическими признаками овец, актуален для дальнейшего развития селекционной работы. В связи с этим целесообразно, по нашему мнению, проводить поиск новых генов-кандидатов мясной продуктивности в группе животных, имеющих сходный генотип по набору полиморфизма известных маркерных генов. Вероятно, разнообразие параметров мясной продуктивности в такой группе будет обусловлено не полиморфизмом уже изученных маркерных генов, а аллельными вариантами ранее не рассмотренных генов.

Стабилизацию влияния одних генов и проявление функции других генов можно наблюдать среди пород, подвергающихся селекции для получения максимальной продуктивности в определенных экологических нишах, различающихся по климату, составу кормов и воды. К таким породам овец относится северокавказская мясо-шерстная, хорошо адаптированная для разведения в условиях засушливых степей Юга России. Она отличается достаточно высокой мясной продуктивностью для своего класса, бараны-производители имеют среднюю массу более 100 кг, а ярки – 60 кг. При этом дисперсия фенотипа мясных форм в породе указывает на определенное разнообразие генетического потенциала и возможность дальнейшего ее совершенствования [15, 16].

Цель нашего исследования – поиск новых генов-кандидатов мясной продуктивности у овец северокавказской мясо-шерстной породы в группе животных с учетом генотипов по полиморфиз-

му известных генов, влияющих на развитие мышечной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе лабораторий Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства (ВНИИОК) – филиала ФГБНУ “Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр”, Сколковского института науки и технологий “Сколтех”.

Объект исследования – бараны северокавказской мясо-шерстной породы в возрасте 12 мес., принадлежащие к племенному ядру. На первом этапе было генотипировано 275 баранов. Среди них были отобраны 50 баранов с наиболее близкими генотипами по полиморфизму известных генов мясной продуктивности: *MSTN* (oar3_OAR2_118149265; oar3_OAR2_118150665), *MEF2B* (oar3_OAR5_3860373; oar3_OAR5_3867887), *FABP4* (oar3_OAR9_57537070), *GH* (oar3_OAR11_47529756; oar3_OAR11_47545769), *REM1* (oar3_OAR13_60384593; oar3_OAR13_60385591), *MYOD1* (oar3_OAR15_3434222; oar3_OAR15_3441596), *FST* (OAR16_27849538.1; oar3_OAR16_25632659; oar3_OAR16_25632701; oar3_OAR16_25633632\$; oar3_OAR16_25638968), *DLK1* (oar3_OAR18_64313560; oar3_OAR18_64314938; oar3_OAR18_64341672). Выбранные бараны принадлежали к трем неродственным селекционным линиям, внутри линий степень родства не превышала 50% по отцу. Животные содержались в одинаковых оптимальных условиях в племенном заводе “Восток” Ставропольского края. Так как мясная продуктивность породы оценивается по баранам, ярки в группу исследованных животных не входили. У отобранных баранов определяли 15 прижизненных показателей мясной продуктивности. Живую массу при рождении и в 12 мес. измеряли с помощью весов МП 300 ВЕДА Ф-1 (МИДЛК, Россия), по этим параметрам рассчитывали ежедневный суточный прирост. С использованием линейки и измерительной ленты измеряли высоту в холке и крестце, ширину груди и спины, глубину груди, обхват плеча, предплечья и бедра. С помощью переносного УЗИ-сканера DUS 60 VET (EDAN, Китай), используя линейный датчик с частотой 5.0 МГц, определяли параметры толщины и ширины “мышечного глазка”, толщину бедренной мышцы и жировой ткани в поясничной области. Все животные были клинически здоровы и получали полноценный смешанный рацион.

Генотипирование

Геномную ДНК выделяли из образцов цельной крови, взятой в асептических условиях из яремной вены, с помощью набора Pure Link Genomic DNA MiniKit (Invitrogen Life Technologies,

США) в соответствии с протоколом производителя. Генотипирование животных проводили с использованием *Ovine Infinium HD BeadChip 600K* (Illumina Inc. CA, США) в соответствии с протоколом производителя. Первичную обработку результатов генотипирования проводили с помощью программы *Genome Studio 2.0* (Illumina Inc. CA, США).

Контроль качества генотипирования

Контроль качества генотипирования проводили с использованием программного обеспечения *PLINK v1.07* [17]. В обработку данных были включены образцы с показателем количества выявленных однонуклеотидных замен больше 0.95 (Call Rate). Из анализа были исключены SNP (single nucleotide polymorphism), не имеющие хромосомной или физической локализации, с частотой минорных аллелей (MAF – Minor Allele Frequency) меньше 0.01, частотой потерянных генотипов (missing genotype) больше 0.1. В качестве порогового значения по критерию Харди–Вайнберга (Hardy–Weinberg equilibrium) использовалось значение $p = 0.0001$. С положительным результатом контроль качества генотипирования прошли 50 образцов. Из 606006 SNP для дальнейшего анализа были использованы 562549.

Генетический и статистический анализ

Полногеномный анализ ассоциаций (ПГАА) выполняли с использованием программного обеспечения *PLINK v1.07* [17] на основе оценки значимости влияния SNP на количественные прижизненные признаки мясной продуктивности овец. Для множественных сравнений вводили поправку Бонферрони, устанавливающую показатель уровня значимости $p = 0.8 \times 10^{-6}$. Визуализацию и построение графиков проводили с применением пакета “*QQman*” на языке программирования R. Поиск генов-кандидатов осуществляли среди ближайших генов, расположенных на расстоянии, не превышающем 250000 пн (половина сантиморганиды) от SNP, показавших достоверную ассоциацию с признаками мясной продуктивности. Анализируемые полиморфизмы представлены биаллельными SNP, аллелям присвоены обозначения A и B, в соответствии с наименованием на чипе *Ovine Infinium HD BeadChip 600K* (Illumina Inc. CA, США). Для картирования SNP использовали сборку генома *Ovis Aries_3.1*. Аннотирование генов выполняли с использованием геномных браузеров UCSC (www.genome.ucsc.edu) и Ensembl (www.ensembl.org).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенный поиск ассоциаций полиморфизма известных маркерных генов с некоторыми при-

жизненными параметрами продуктивности показал отсутствие достоверных ассоциаций у обследуемой группы овец северокавказской мясо-шерстной породы (табл. 1). Достоверность ассоциаций для четырех SNP, расположенных в генах *MSTN*, *MEF2B* и *FABP4*, не была рассчитана, так как у изучаемых животных они присутствовали только в виде мономорфных гомозиготных вариантов. Для остальных генетических вариантов показатель достоверности был значительно выше порогового значения p с учетом поправки Бонферрони.

Тепловая карта распределения аллелей SNP маркерных генов (рис. 1) мясной продуктивности демонстрирует отсутствие выраженной кластеризации исследуемых животных по выявленным генотипам. Не сформировано каких-либо достаточно крупных кластеров до 3–4 порядка, распределение генотипов носит случайный характер. Несколько SNP присутствовали в виде мономорфных аллелей (в генах *MSTN*, *MEF2B* и *FABP4*), часть замен в генах *FST* и *DKL1* имела единичные гетерозиготные варианты. Таким образом, в подобранной группе животных полиморфизм известных генов продуктивности, вероятно, не оказывал достоверного влияния на параметры фенотипа овец северокавказской мясо-шерстной породы.

В результате полногеномного поиска ассоциаций выявлено около 20 SNP, достоверно связанных с прижизненными показателями мясной продуктивности у овец северокавказской мясо-шерстной породы (рис. 2).

Для высоты в холке максимальный показатель достоверности был у двух SNP, расположенных на хромосомах 20 и 22 (рис. 2,а). Одна из них находилась в интроне гена, другая – в межгенном пространстве. При оценке ассоциаций с живой массой при рождении (рис. 2,б) три замены с высокой достоверностью ассоциаций располагались на хромосоме X. Все они находились очень близко друг от друга рядом с геном *CTPS2*, что позволяет предположить их совместное наследование.

Для параметра “толщина жировой ткани” было выявлено три SNP, преодолевших порог достоверности с учетом поправки Бонферрони (рис. 2,в). Наибольшую достоверность связи имели замены на хромосомах 2, 3 и 5. Две из них находились в межгенном пространстве, а одна – в интроне гена.

Достоверные связи с параметром “ширина мышечного глазка” были выявлены для нескольких SNP, при этом наибольшую достоверность имели ассоциации SNP, расположенные на хромосоме 4 (рис. 2,г). Они находились в разных интронах одного и того же гена.

В результате ПГАА выявлено несколько SNP, ассоциированных с обхватом предплечья (рис. 2,д), для дальнейшего анализа было отобрано девять замен. Замены с достоверным уровнем ассоциа-

Таблица 1. Связь полиморфизма маркерных генов с прижизненными показателями мясной продуктивности овец северокавказской мясо-шерстной породы

Ген	SNP	Хромосома	Позиция	ЖМ, <i>p</i>	ТМГ, <i>p</i>
<i>MSTN</i>	oar3_OAR2_118149265	2	118 149 265	N/A	N/A
<i>MSTN</i>	oar3_OAR2_118150665	2	118 150 665	N/A	N/A
<i>MEF2B</i>	oar3_OAR5_3860373	5	3860373	0.93	0.98
<i>MEF2B</i>	oar3_OAR5_3867887	5	3867887	N/A	N/A
<i>FABP4</i>	oar3_OAR9_57537070	9	57 537 070	N/A	N/A
<i>GH</i>	oar3_OAR11_47529756	11	47 529 756	0.40	0.23
<i>GH</i>	oar3_OAR11_47545769	11	47 545 769	0.04	0.78
<i>REM1</i>	oar3_OAR13_60384593	13	60 384 593	0.15	0.87
<i>REM1</i>	oar3_OAR13_60385591	13	60 385 591	0.15	0.87
<i>MYOD1</i>	oar3_OAR15_3434222	15	3434222	0.49	0.53
<i>MYOD1</i>	oar3_OAR15_3441596	15	3441596	0.61	0.19
<i>FST</i>	OAR16_27849538.1	16	25631318	0.11	0.34
<i>FST</i>	oar3_OAR16_25632659	16	25632659	0.56	0.83
<i>FST</i>	oar3_OAR16_25632701	16	25632701	0.86	0.66
<i>FST</i>	oar3_OAR16_25633632	16	25633632	0.56	0.83
<i>FST</i>	oar3_OAR16_25638968	16	25638968	0.03	0.54
<i>DLK1</i>	oar3_OAR18_64313560	18	64 313 560	0.77	0.67
<i>DLK1</i>	oar3_OAR18_64314938	18	64 314 938	0.14	0.79
<i>DLK1</i>	oar3_OAR18_64341672	18	64 341 672	0.99	0.55

Примечание. N/A — полиморфизм не обнаружен; ЖМ — живая масса; ТМГ — толщина “мышечного глазка”.

ции на хромосомах 8 и 17 расположены в межгенном пространстве, замены на хромосомах 3, 7, 15 и X обнаружены в интронах генов. При этом одна из замен на хромосоме 7 картировалась в интроны сразу двух генов.

Для ряда других прижизненных показателей мясной продуктивности овец северокавказской

мясо-шерстной породы, включающего в себя живую массу в годовалом возрасте, среднесуточный прирост, высоту в крестце, ширину и глубину груди, ширину спины, обхваты плеча и бедра, толщину “мышечного глазка” и толщину бедренной мышцы, достоверных ассоциаций с SNP обнаружено не было.

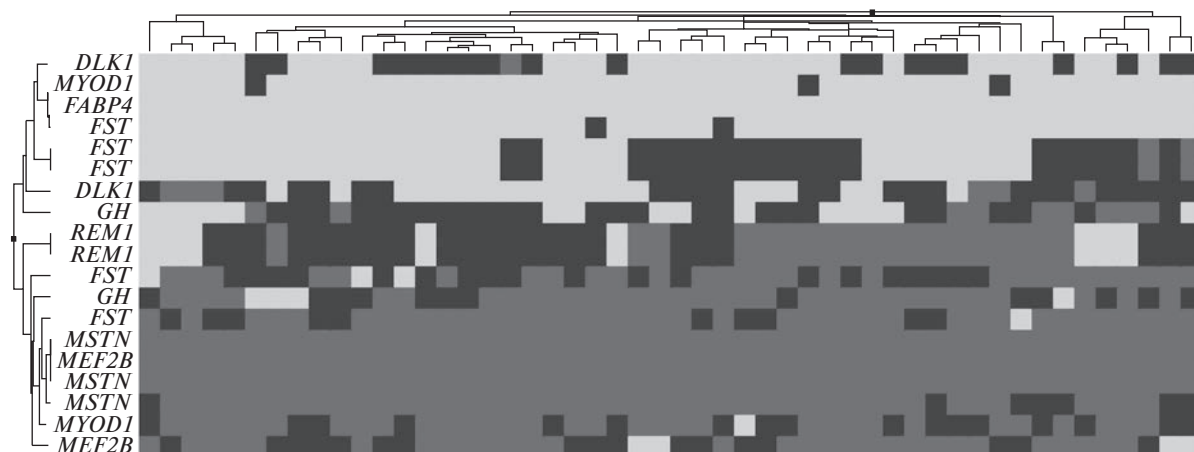


Рис. 1. Тепловая карта распределения аллелей SNP маркерных генов, достоверно не связанных с мясной продуктивностью, у овец северокавказской мясо-шерстной породы. Кластеризация по генотипам. Светло-серый цвет — гомозигота А, серый цвет — гетерозигота АВ, темно-серый цвет — гомозигота В.

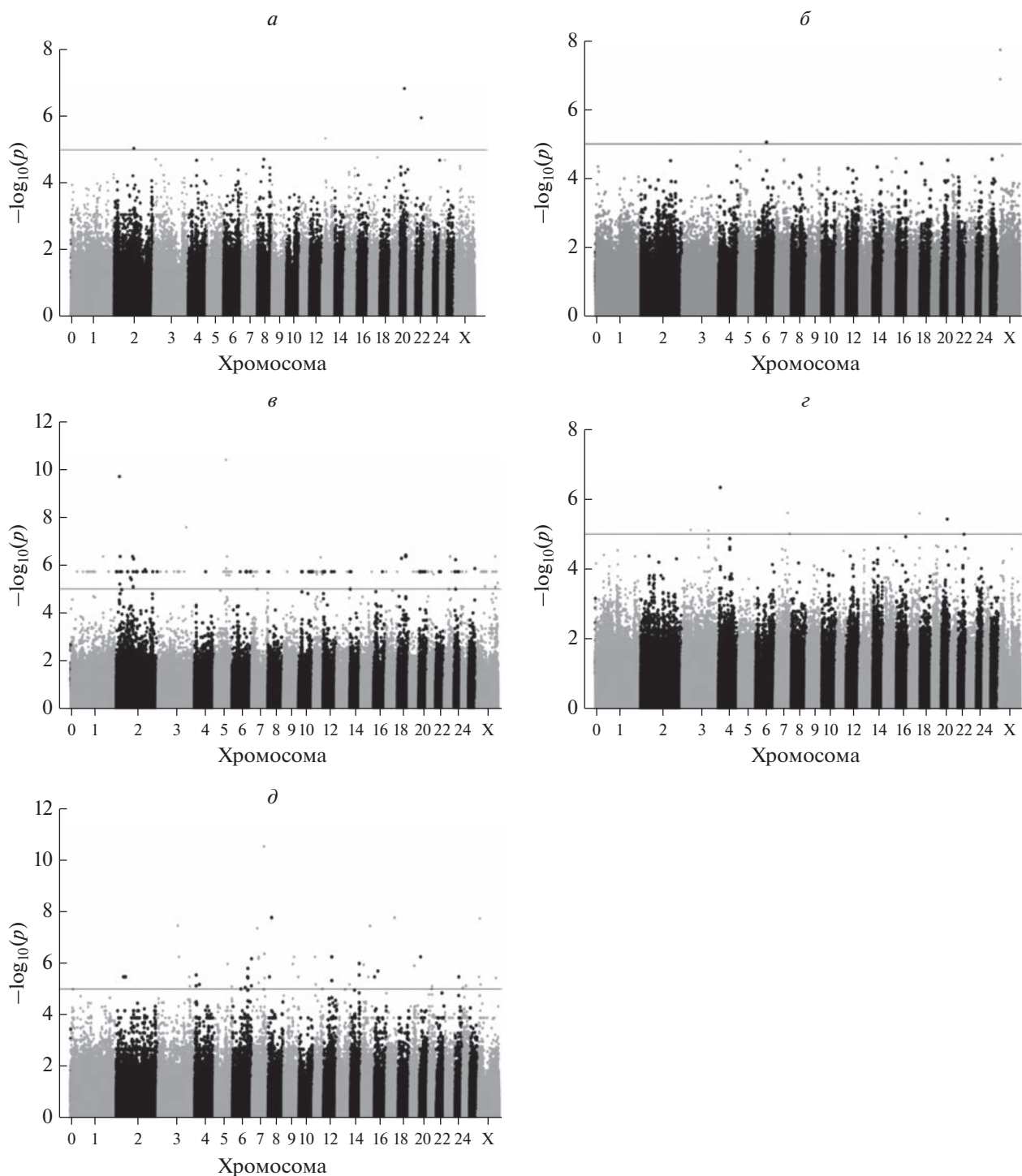


Рис. 2. Манхэттенский график результатов ПГАА с набором значений $-\log_{10}(p)$ для исследуемых SNP по прижизненным показателям мясной продуктивности: высота в холке (*а*), живая масса при рождении (*б*), толщина жировой ткани (*в*), ширина “мышечного глаза” (*г*), обхват предплечья (*д*). Синяя линия обозначает порог ожидаемой достоверности различий при значении $-\log_{10}(p) = 5$.

Для дальнейшего изучения и аннотирования близлежащих генов-кандидатов было отобрано 19 SNP, имеющих наибольший уровень достоверности ассоциаций (табл. 2). Из них девять были

расположены в интронах генов, остальные 10 — на разном удалении от генов. Ближе всех находилась замена rs411918327 на хромосоме 17 — 17782 пн. Наиболее отдаленное расположение относитель-

Таблица 2. Связь SNP с прижизненными показателями мясной продуктивности и новые гены-кандидаты овец северокавказской мясо-шерстной породы

Признак	Хромосома	SNP	Позиция	<i>p</i>	Ген/расстояние до гена, пн
ВВХ	20	rs405580662	25023 121	1.01e-07	<i>CILK1</i> /intron 11-12
	22	rs404887224	36 141 759	1.07e-06	<i>ENO4</i> /61224
ЖМР	X	rs410901922	14048 240	1.83e-08	<i>CTPS2</i> /29384
	X	rs410836916	14054083	1.83e-08	<i>CTPS2</i> /23541
	X	rs416819309	14045890	1.30e-07	<i>CTPS2</i> /31734
ТЖТ	5	rs410336272	70279825	4.07e-11	<i>GABRB2</i> /intron 9-10
	2	rs411177492	17793666	2.06e-10	<i>SLC44A1</i> /112524
	3	rs406382505	173590152	2.74e-08	<i>C12ORF45</i> /26001; <i>SLC41A2</i> /30547
ШМГ	4	rs420242290	11782536	4.64e-07	<i>CASD1</i> /intron 3-4
	4	rs427172181	11801072	4.64e-07	<i>CASD1</i> /intron 10-11
ОПП	7	rs422152157	73053165	2.84e-11	<i>SINE2</i> /intron 2-3
	8	rs398907349	19601156	1.66e-08	<i>SLC35F1</i> /62507
	17	rs399242667	49481697	1.66e-08	<i>RP</i> /34798
	17	rs430083361	49493261	1.66e-08	<i>RP</i> /23234
	17	rs411918327	49498713	1.66e-08	<i>RP</i> /17782
	X	rs428366450	17003427	1.79e-08	<i>SH3KBP1</i> /intron 13-14
	3	rs429375653	121233501	3.43e-08	<i>LRR1Q1</i> /intron 13-14
	15	rs413432564	42537319	3.43e-08	<i>SWAP70</i> /intron 1-2
	7	rs422549589	32364039	4.36e-08	<i>THBS1</i> /intron 22-23; <i>FSIPI</i> /intron 9-10

Примечание. ВВХ — высота в холке; ЖМР — живая масса при рождении; ТЖТ — толщина жировой ткани; ШМГ — ширина “мышечного глазка”; ОПП — обхват предплечья.

но ближайшего гена-кандидата имела замена rs411177492 на хромосоме 2. Она составила 112524 пн. Для большинства других замен дистанция не превышала 40 тпн. Это указывает на очень высокую вероятность сцепленного наследования обнаруженных SNP с приведенными в табл. 2 генами-кандидатами продуктивности.

Ассоциированная с высотой в холке замена rs405580662 располагается в интроне гена *CILK1*. Ген *ENO4* (*enolase 4*) расположен в 60 тпн от замены rs404887224. Три обнаруженные нами на хромосоме X замены находятся в непосредственной близости (от 23 до 32 тпн) от гена *CTPS2* (*Cytidine 5'-Triphosphate Synthetase 2*). В интроне гена *GABRB2* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta2*), расположенного на хромосоме 5, находится замена с очень высокими показателями достоверности ассоциаций с толщиной жира в поясничной области. Еще один ассоциированный с толщиной жира SNP расположен в области гена *SLC44A1* (*solute carrier family 44 member 1*). Между геном *SLC41A2* (*solute carrier family 41 member 2*) и геном *C12ORF45* (*chromosome 12 open reading frame 45*) (30 и 26 тпн соответственно) также находится SNP, связанный с толщиной жира. Две замены на хромосоме 4, ассоциированные с шириной “мышечного глазка”, располагаются в интронах гена

CASD1 (*CAS1 domain containing 1*). Ген *SINE2* (*spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2*) содержит в своем интроне SNP с очень высокими показателями ассоциации с обхватом предплечья. Еще одна замена, связанная с обхватом предплечья, находится в 60 тпн от гена *SLC35F1* (*solute carrier family 35 member F1*). Сразу три SNP, ассоциированных с обхватом предплечья, находятся в области гена *RP* (*Ribosomal protein*) на хромосоме 17, имея расстояние от 17 до 35 тпн до гена. На хромосоме X находится ген *SH3KBP1* (*SH3 domain containing kinase binding protein 1*), содержащий в интроне SNP с высокой ассоциацией с обхватом предплечья. Также связанная с обхватом предплечья SNP локализуется в интроне гена *LRR1Q1* (*leucine rich repeats and IQ motif containing 1*). Замена rs413432564 обнаружена в интроне гена *SWAP70* (*switching B cell complex subunit*). Замена rs422549589 располагается в локусе, попадающем в интроны сразу двух генов — *THBS1* (*thrombospondin 1*) и *FSIPI* (*fibrous sheath interacting protein 1*).

Тепловая карта генотипов животных по обнаруженным нами SNP (рис. 3) показывает совершенно другое распределение гомо- и гетерозиготных вариантов по сравнению с тепловой картой для известных генов мясной продуктивности (рис. 1). Ни одна из замен, формирующих генотипы, не

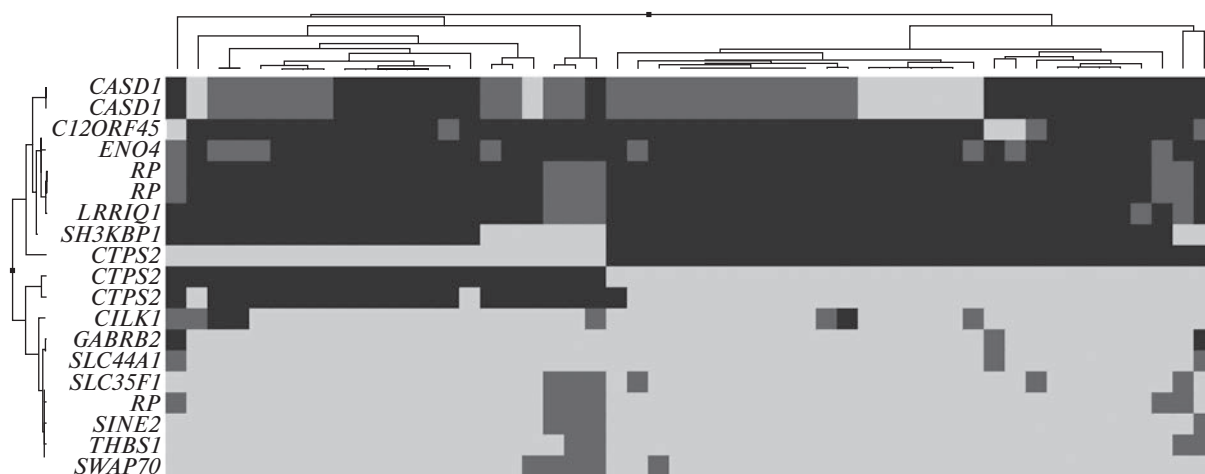


Рис. 3. Тепловая карта распределения аллелей SNP, достоверно ассоциированных с прижизненными показателями мясной продуктивности у овец северокавказской мясо-шерстной породы. Кластеризация по генотипам. Светло-серый цвет — гомозигота А, серый цвет — гетерозигота АВ, темно-серый цвет — гомозигота В.

представлена у исследуемых животных в мономорфном варианте, при этом преобладают гомозиготные варианты. Гетерозиготные варианты представлены у достаточно малого числа животных. Кластеризация генотипов позволила выделить две большие группы, существенно различающиеся по аллелям SNP, расположенных преимущественно в двух генах — *CTPS2* (*CTP synthase 2*) и *CASD1* (*ciliogenesis associated kinase 1*).

Таким образом, использованный нами способ выбора животных с минимальным влиянием известных генов продуктивности на фенотип позволил обнаружить новые локусы генома, имеющие достоверную связь с прижизненными показателями мясной продуктивности, и предложить ряд новых генов-кандидатов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ связи полиморфизма известных генов продуктивности с параметрами роста и развития овец показал, что у некоторых представителей овец северокавказской мясо-шерстной породы в результате проводимой селекционной работы эти гены утратили свою роль в обеспечении дисперсии фенотипа. Это связано с тем, что ген миостатина, наиболее сильного регулятора развития мышечной ткани, у обследуемых животных имеет только один аллельный вариант. У них встречается тот же вариант SNP, что и у австралийских мериносовых овец, которые являются одними из предков северокавказской мясо-шерстной породы [18]. На этом фоне влияние остальных известных генов на разнообразие фенотипа существенно снижено еще и по той причине, что замены в них сгруппированы в достаточно случайном по-

рядке, варианты генотипов плохо кластеризуются. Все это указывает на то, что выбранные нами овцы северокавказской мясо-шерстной породы хорошо подходят для поиска новых генов-кандидатов мясной продуктивности, так как животные имеют достаточную вариабельность в параметрах экстерьера и ультразвуковых измерениях. Соответственно обнаруженная дисперсия фенотипа должна иметь под собой основу в виде особенностей генотипа.

Полногеномный поиск ассоциаций SNP с прижизненными параметрами мясной продуктивности выявил несколько замен с достаточно высокими показателями достоверности связи. Для некоторых из них уровень значимости был меньше 0.8×10^{-6} . Это указывает на необходимость пристального изучения особенностей строения обнаруженных локусов генома.

Кластеризация и построение тепловой карты для генотипов по SNP, ассоциированным с показателями продуктивности, показали четкое разделение обследованных животных как минимум на две группы. И связано оно в основном с полиморфизмом в области генов *CTPS2* и *CASD1*, влияние которого на параметры фенотипа ранее вообще не рассматривалось. По нашему мнению, именно на них стоит обратить особое внимание при дальнейшем изучении механизма влияния генов продуктивности на параметры роста и развития животных.

Для большинства предлагаемых нами новых генов-кандидатов исследований связи с продуктивными качествами животных ранее не проводилось. Ген *CILK1* (*Ciliogenesis Associated Kinase 1*)

кодирует киназу 1, связанную с цилиогенезом, и экспрессируется во многих тканях организма. Мутации в гене *CILK1* приводят у человека к наследственным заболеваниям с нарушением развития костно-мышечной системы, легких, головного мозга и других органов. У мышей мутации сопровождаются замедлением роста и патологиями позвоночника [19]. Исходя из этого, ген *CILK1* может быть связан с изменениями размера тела у овец и требует дальнейшего изучения.

Продуктом гена *ENO4* (*enolase 4*) является фермент, участвующий в одном из этапов синтеза пирувата в процессе гликолиза. Высокая активность гена выявлена в спермиях человека, барана и мыши. Полиморфизм гена *ENO4* у мышей связывают с нарушениями подвижности сперматозоидов и развитием бесплодия [20]. Важность гена *ENO4* для энергетического обмена позволяет предположить его влияние на рост и развитие животных.

Ген *CTPS2* (*Cytidine 5'-Triphosphate Synthetase 2*) кодирует одну из изоформ фермента, катализирующего последнюю стадию синтеза пиримидина, входящего в состав молекул урацила, тимина и цитозина. Фермент крайне важен во все периоды развития организма, гомозиготы с нокаутированным геном *CTPS2* погибают еще на этапе эмбрионального развития [21]. Учитывая функции гена и особенности распределения генотипов, выявленных в нашем исследовании, следует считать его возможным кандидатом, связанным с продуктивностью изучаемых животных.

Влияние гена *GABRB2* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta2*) на фенотип животных не изучалось, у человека его полиморфизм связывают с развитием наследственных форм эпилепсии и эпилептической энцефалопатии [22]. Это указывает на его важность для передачи импульсов нейронами и позволяет считать косвенно связанным с регуляцией роста и развития организма.

Кодируемый геном *SLC44A1* (*solute carrier family 44 member 1*) митохондриальный белок отвечает за трансмембранный транспорт холина и регулирует его метаболизм. У мышей высокая активность гена была выявлена в гепатоцитах и мышечной ткани [23]. В связи с этим ген *SLC44A1* может рассматриваться в качестве кандидата, связанного с продуктивностью у овец.

Ген *C12ORF45* (*chromosome 12 open reading frame 45*) имеет открытую рамку считывания. Несмотря на то что обнаружено достаточно много участков генома, представляющих собой открытые рамки считывания без стоп-кодона, их функция не ясна. Существует мнение, что они кодируют регуляторные аминокислотные последовательности для раз-

личных биологических процессов [24]. Ген *SLC41A2* относится к группе, кодирующей белки Mg^{2+} -каналов у бактерий и у высших животных [25]. Оба описанных гена могут влиять на обменные процессы в организме и рассматриваются нами как кандидаты, связанные с мясной продуктивностью.

Ген *CASD1* (*CAS1 domain containing 1*) содержит домен белка, катализирующего превращение сиаловой кислоты. Сиаловая кислота участвует в регуляции межклеточных взаимоотношений, передаче сигналов, распознавании клеток [26]. Мы считаем необходимым дальнейшее изучение роли гена *CASD1* в реализации продуктивных качеств у овец.

Есть сообщения о связи мутаций в гене *SINE2* (*spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2*) с развитием нейро-мышечной дистрофии и поражением миокарда у человека [27]. Это указывает на возможность связи полиморфизма гена *SINE2* с развитием мышечной ткани у животных.

Ген *SLC35F1* (*solute carrier family 35 member F1*) кодирует белок из семейства трансмембранных транспортеров, особенно активно функционирующих в нервной системе при реализации функций гемато-энцефалического барьера [28]. По нашему мнению, ген *RP* (*Ribosomal protein*) заслуживает внимания для дальнейшего изучения связи с мясной продуктивностью. Было показано, что рибосомальные протеины не только связаны с функцией рибосом, но и участвуют в процессах канцерогенеза, передаче сигналов в иммунной системе, а также отвечают за нормальное развитие организма [29].

Ген *SH3KBP1* (*SH3 domain containing kinase binding protein 1*) отличается способностью к продукции ряда изоформ белкового продукта за счет альтернативного сплайсинга и принимает участие в перестройке цитоскелета, клеточной адгезии, процессах апоптоза, миграции и инвазии клеток [30]. Такое многообразие функций делает его перспективным геном-кандидатом продуктивных свойств овец.

Функцию генов семейства, к которому относится *LRR1Q1* (*leucine rich repeats and IQ motif containing 1*), связывают с реализацией неспецифического иммунного ответа [31]. Ген *SWAP70* (*switching B cell complex subunit*) участвует в миграции клеток, фагоцитозе, процессах деструкции костной ткани [32]. Оба этих гена представляют интерес для изучения связи их полиморфизма с фенотипическими параметрами овец.

Ген *THBS1* (*thrombospondin 1*) принимает участие в большом количестве обменных процессов, включая межклеточные взаимодействия, регуля-

цию утилизации глюкозы, метаболизм адипоцитов [33]. Функция гена *FSIP1* (*fibrous sheath interacting protein 1*) до конца не изучена. Имеются сведения об участии гена *FSIP1* во взаимодействии ряда белковых молекул, а также о связи его полиморфизма с развитием слизистой меланомы [34] и рака мочевого пузыря [35]. Исходя из структурно-функциональных особенностей локуса, ассоциированного с показателем продуктивности, мы считаем необходимым дальнейшее изучение обоих этих генов на предмет участия в реализации фенотипа животных.

Таким образом, использован новый подход к обнаружению генов-кандидатов продуктивности, основанный на проведении ПГАА в группе животных с учетом генотипа по полиморфизму известных генов, влияющему на развитие мышечной ткани. В результате проведенного ПГАА у овец северокавказской мясо-шерстной породы было выявлено 19 SNP, связанных с прижизненными показателями мясной продуктивности. Определение местоположения анализируемых SNP позволило установить 16 новых генов-кандидатов, ассоциированных с показателями мясной продуктивности овец северокавказской мясо-шерстной породы. Обнаруженные замены располагались в интронах или фланкирующих областях генов: *CILK1*, *ENO4*, *CTPS2*, *GABRB2*, *SLC44A1*, *C12ORF45*, *SLC41A2*, *CASD1*, *SINE2*, *SLC35F1*, *RP*, *SH3KBP1*, *LRR1Q1*, *SWAP70*, *THBS1* и *FSIP1*. Предложенные гены-кандидаты участвуют в метаболизме белков и нуклеиновых кислот, обеспечении межклеточных взаимодействий и передачи нервного импульса, в регуляции развития мышечной ткани. Дальнейшие исследования должны быть направлены на подтверждение влияния предложенных генов-кандидатов на фенотип овец, а также на изучение структуры этих генов для выявления конкретных полиморфизмов, вызывающих изменения фенотипа.

Финансирование работы проводилось за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1037 (внутр. № 15.БРК.21.0001).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sahu A.R., Nayak N., Panigrahi M., Kumar S. Advances in genomic strategies to improve growth and meat production traits in sheep: An overview // *Ind. J. Small Ruminants*. 2017. V. 23. № 2. P. 139. <https://doi.org/10.5958/0973-9718.2017.00052.6>
2. Trukhachev V.I., Selionova M.I., Krivoruchko A.Y., Aibasov A.M.M. Genetic markers of meat productivity of sheep (*Ovis aries* L.). I. Myostatin, calpain, calpastatin // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*. 2018. V. 53. № 6. P. 1107–1119. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1107eng>
3. Aiello D., Patel K., Lasagna E. The myostatin gene: An overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals // *Animal Genet*. 2018. V. 49. № 6. P. 505–519. <https://doi.org/10.1111/age.12696>
4. Osman N.M., Shafey H.I., Abdelhafez M.A. et al. Genetic variations in the Myostatin gene affecting growth traits in sheep // *Veterinary World*. 2021. V. 14. № 2. P. 475. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.475-482>
5. Sousa-Junior L.P.B., Meira A.N., Azevedo H.C. et al. Variants in myostatin and MyoD family genes are associated with meat quality traits in Santa Inês sheep // *Animal Biotechnol*. 2022. V. 33. № 2. P. 201–213. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1781651>
6. Nissinen T.A., Hentilä J., Fachada V. et al. Muscle follistatin gene delivery increases muscle protein synthesis independent of periodical physical inactivity and fasting // *The FASEB J*. 2021. V. 35. № 3. P. e21387. <https://doi.org/10.1096/fj.202002008R>
7. Sharma R., Kopchick J.J., Puri V., Sharma V.M. Effect of growth hormone on insulin signaling // *Mol. Cell. Endocrinol*. 2020. V. 518. P. 111038. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111038>
8. Abdelmoneim T.S., Brooks P.H., Afifi M., Swelum A.A.A. Sequencing of growth hormone gene for detection of polymorphisms and their relationship with body weight in Harri sheep // *Ind. J. Animal Res*. 2017. V. 51. № 2. P. 205–211. <https://doi.org/10.18805/ijar.11457>
9. Gorlov I.F., Kolosov Y.A., Shirokova N.V. et al. Association of the growth hormone gene polymorphism with growth traits in Salsk sheep breed // *Small Ruminant Res*. 2017. V. 150. P. 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.019>
10. Takeda H., Caiment F., Smit M. et al. The callipyge mutation enhances bidirectional long-range DLK1-GTL2 intergenic transcription in cis // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 21. P. 8119–8124. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602844103>
11. Cheng J., Zhang X., Li F. et al. Detecting single nucleotide polymorphisms in MEF2B and UCP3 and elucidating their association with sheep growth traits // *DNA Cell Biol*. 2021. V. 40. № 12. P. 1554–1562. <https://doi.org/10.1089/dna.2021.0782>
12. Gavran M., Antunović Z., Gantner V. Candidate genes associated with economically important traits of sheep—a review // *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2021. V. 86. № 3. P. 195–201.

13. *Trukhachev V.I., Skripkin V.S., Yatsyk O. et al.* The polymorphism of REM-1 gene in sheep genome and its influence on some parameters of meat productivity // *Research J. Pharmaceutical, Biol. Chem. Sciences*. 2016. V. 7. № 3. P. 2351–2357.
14. *Nesvadbova M., Borilova G.* Molecular regulation of skeletal muscle tissue formation and development // *Veterinari Med. (Praha)*. 2018. V. 63. № 11. P. 500–512.
<https://doi.org/10.17221/7/2018-VETMED>
15. *Омаров А.А., Гайдашов С.И.* Продуктивные показатели овец северокавказской мясо-шерстной породы и их взаимосвязь с основными селекционируемыми признаками // *Вестн. Алтайского гос. аграрного ун-та*. 2021. № 2(196). С. 66–72.
16. *Селькин И.И.* Породе 50 лет // *Сб. науч. трудов Ставропольского научно-исслед. института животноводства и кормопроизводства*. 2010. № 13. С. 258–283.
17. *Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al.* PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // *The Am. J. Human Genet.* 2007. V. 81. № 3. P. 559–575.
<https://doi.org/10.1086/519795>
18. *Kijas J.W., McCulloch R., Edwards J. et al.* Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the Ovine GDF8 locus // *J. Animal Breed. Genet.* 2013. V. 130. № 6. P. 468–475.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-8-80>
19. *Fu Z., Gailey C.D., Wang E.J., Brautigan D.L.* Ciliogenesis associated kinase 1: Targets and functions in various organ systems // *FEBS Letters*. 2019. V. 593. № 21. P. 2990–3002.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13600>
20. *Nakamura N., Dai Q., Williams J. et al.* Disruption of a spermatogenic cell-specific mouse enolase 4 (eno4) gene causes sperm structural defects and male infertility // *Biol. Reproduction*. 2013. V. 88. № 4. P. 90.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107128>
21. *Hickl D., Scheuring D., Möhlmann T.* CTP Synthase 2 From *Arabidopsis thaliana* is required for complete embryo development // *Frontiers Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 652434.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.652434>
22. *El Achkar C.M., Harrer M., Smith L. et al.* Characterization of the GABRB2-Associated Neurodevelopmental Disorders // *Annals Neurology*. 2021. V. 89. № 3. P. 573–586.
<https://doi.org/10.1002/ana.25985>
23. *Michel V., Bakovic M.* The solute carrier 44A1 is a mitochondrial protein and mediates choline transport // *The FASEB J.* 2009. V. 23. № 8. P. 2749–2758.
<https://doi.org/10.1096/fj.08-121491>
24. *Ladoukakis E., Pereira V., Magny E.G. et al.* Hundreds of putatively functional small open reading frames in *Drosophila* // *Genome Biol.* 2011. V. 12. № 11. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-11-r118>
25. *Fleig A., Schweigel-Röntgen M., Kolisek M.* Solute carrier family SLC41: what do we really know about it? // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*. 2013. V. 2. № 6. P. 227–239.
<https://doi.org/10.1002/wmts.95>
26. *Baumann A.-M.T., Bakkens M.J.G., Buettner F.F.R. et al.* 9-O-Acetylation of sialic acids is catalysed by CASD1 via a covalent acetyl-enzyme intermediate // *Nat. Communications*. 2015. V. 6. P. 7673.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8673>
27. *Bamaga A., Vajsaar J.* Spectrin repeat-containing nuclear envelope protein 2: SYNE2 presenting as a congenital myopathy: A case report // *Neuromuscul Disord.* 2016. V. 26. P. 139.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.06.195>
28. *Mochizuki T., Mizuno T., Kurosawa T. et al.* Functional investigation of solute carrier family 35, member F2, in three cellular models of the primate blood-brain barrier // *Drug Metabolism Disposition*. 2021. V. 49(1). P. 3–11.
<https://doi.org/10.1124/dmd.120.000115>
29. *Zhou X., Liao W.-J., Liao J.-M. et al.* Ribosomal proteins: Functions beyond the ribosome // *J. Mol. Cell Biol.* 2015. V. 7. № 2. P. 92–104.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv014>
30. *Hua X.-Y., Bie X.-X., Cheng X., Zhang S.-G.* High expression of CIN85 promotes proliferation and invasion of human esophageal squamous cell carcinoma // *Mol. Med. Reports*. 2021. V. 23. № 1. P. 12.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11650>
31. *Ng A., Xavier R.J.* Leucine-rich repeat (LRR) proteins: Integrators of pattern recognition and signaling in immunity // *Autophagy*. 2011. V. 7. № 9. P. 1082–1084.
<https://doi.org/10.4161/auto.7.9.16464>
32. *Kriplani N., Duncan R.R., Leslie N.R.* SWAP70 undergoes dynamic conformational regulation at the leading edge of migrating cells // *FEBS Letters*. 2019. V. 593. № 4. P. 395–405.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13326>
33. *Gutierrez L.S., Gutierrez J.* Thrombospondin 1 in metabolic diseases // *Frontiers Endocrinol.* 2021. V. 12. P. 638536.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.638536>
34. *Chen M., Wu Y., Li W. et al.* Loss-of-function variants in FSIP1 identified by targeted sequencing are associated with one particular subtype of mucosal melanoma // *Gene*. 2020. V. 759. P. 144964.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144964>
35. *Sun M., Zhao W., Zeng Y. et al.* Fibrous sheath interacting protein 1 overexpression is associated with unfavorable prognosis in bladder cancer: A potential therapeutic target // *OncoTargets Therapy*. 2017. V. 10. P. 3949.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S143491>

A Genome-Wide Search of New Meat Productivity Candidate Genes in North Caucasian Meat and Wool Sheep Breed

A. Yu. Krivoruchko^{a, b, *}, R. V. Zuev^b, A. I. Surov^a, A. V. Skokova^a,
A. A. Kanibolotskaya^a, A. A. Likhovid^b, and O. A. Yatsyk^a

^aNorth Caucasian Federal Scientific Agrarian Center, Stavropol Krai, Mikhailovsk, 356241 Russia

^bNorth Caucasian Federal University, Stavropol, 355017 Russia

*e-mail: rcvm@yandex.ru

The search for new genes that affect the growth and development of muscle tissue and associated with meat productivity traits in sheep is an actual task. The implementation of this is inextricably linked with the prospects for the development of marker-assisted and genomic selection. Research presents data of new approach in the detection of candidate genes for sheep meat productivity. Animal genotyping was performed using Ovine Infinium HD BeadChip 600K DNA, association search was performed using PLINK v1.07 software. As a result of the work, identified SNPs that were significantly associated with phenotypic traits directly related to the level of meat productivity in the North-Caucasian meat and wool sheep: height at the withers, live weight at birth, thickness of adipose tissue, width of the muscle "eye". To search for candidate genes, 19 polymorphisms with the highest association reliability were selected. Determining the location of the analyzed SNPs made it possible to identify 16 new candidate genes associated with lifetime meat productivity traits in North-Caucasian meat and wool sheep: *CILK1*, *ENO4*, *CTPS2*, *GABRB2*, *SLC44A1*, *C12ORF45*, *SLC41A2*, *CASD1*, *SINE2*, *SLC35F1*, *RP*, *SH3BP1*, *LRRIQ1*, *SWAP70*, *THBS1* and *FSIP*. Animal genotyping for these genes should be used in marker-associated breeding to improve sheep meat productivity and study their effect on the phenotype.

Keywords: sheep, SNP, genome-wide association search, GWAS, candidate gene, North Caucasian meat and wool breed.