

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ КАЛЬПАСТАТИНА *CAST* И АНДРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА *AR* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ *Rangifer tarandus*

© 2024 г. Е. А. Коноров^{1, 2, *}, К. А. Курбаков^{1, 2}, М. Т. Семина¹,
Ю. А. Столповский¹, К. А. Лайшев^{1, 3}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук,
Москва, 109316 Россия

³Северо-Западный центр междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения,
Санкт-Петербург, 196608 Россия

*e-mail: casqy@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 13.03.2024 г.

Принята к публикации 26.03.2024 г.

Маркерная селекция для повышения мясной продуктивности северного оленя находится в начальной стадии разработки, для которой требуется изучение изменчивости в генах-кандидатах мясной продуктивности. В качестве таких генов нами были выбраны гены кальпастатина и андрогенового рецептора для изучения их изменчивости у северного оленя. Полиморфизм и индели в гене андрогенового рецептора связывают с характеристиками роста и веса у разных видов одомашненных животных. Изменчивость в регионе гена кальпастатина *CAST* по результатам многих исследований была ассоциирована с качеством мяса и мясной продуктивностью скота. Анализ главных компонент по изменчивости *CAST* объединил диких и домашних оленей Якутии, а также диких и домашних оленей из Амурской обл., что подразумевает поток генов между локальными породами одомашненного оленя и дикими популяциями. При этом в случае обнаруженных в данном исследовании трех микросателлитных локусов в интроне андрогенового рецептора анализ главных компонент разделил диких и домашних оленей.

Ключевые слова: *Rangifer tarandus*, гены продуктивности, кальпастатин, андрогеновый рецептор.

DOI: 10.31857/S0016675824080046 **EDN:** BFRMEB

Маркерная селекция для повышения мясной продуктивности северного оленя находится в начальной стадии разработки, для которой требуется изучение изменчивости в генах-кандидатах мясной продуктивности. Кандидатами для изучения полиморфизма и составления SNP-чипов продуктивности являются полиморфные сайты в последовательностях генов к андрогеновым рецепторам (*AR*) и к рецепторам к гормонам роста (*GHR*), поскольку изменчивость в них влияет на рост, репродуктивные признаки и формирования скелетной мускулатуры, что было показано на свиньях [1] и овцах [2]. У оленей же также изучали ассоциацию изменчивости в андрогеновом рецепторе и скорости роста рогов на примере пятнистого оленя [3]. Другим из возможных генов-кандидатов является кальпастатин, наравне с кальпаином, изменчивость в которых связывали с качеством мяса и

мясной продуктивностью для овец [4], КРС [5, 6] и свиней [7]. Крайне мало исследований посвящено исследованию изменчивости отдельных генов северного оленя, за исключением филогенетических маркеров и гена прионного белка [8, 9].

Среди domesticiрованных оленей в России утверждены четыре породы (ненецкая, эвенская, чукотская и эвенкийская), еще несколько региональных популяций (тофаларские, тоджинские оленя) имеют фенотипические отличия, достаточные для выделения их в отдельную породу. Из-за свободного выпаса и непланового скрещивания дикие особи могут вносить вклад в генетическое разнообразие географических типов домашних оленей, а генетический пул домашних пород — в приспособленность диких популяций. Таким образом, территории, где дикий олень обитает совместно с домашним оленем, представляют собой

отдельный интерес как для изучения экологии и локальной адаптации северного оленя, так и для селекционной работы с внутривидовыми типами домашнего подвида.

В настоящей работе мы исследовали изменчивость андрогенового рецептора и кальпастатина домашних и диких северных оленей для поиска полиморфных сайтов и международных различий. Помимо тоджинского и ненецкого оленя мы взяли для анализа домашних и диких особей из Амурской обл. и Якутии, чтобы посмотреть, насколько дифференцированы дикие и домашние олени на небольшом расстоянии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего исследовано 95 (70 образцов для *AR*) оленей, из них 68 (50 для *AR*) – домашние особи ненецкой, эвенкийской, эвенской и чукотской пород, а также 27 (20 для *AR*) диких оленей из Амурской области и Якутии (табл. 1). Образцы дикой популяции были представлены мышечной тканью, домашних животных – ушным выщипом. ДНК выделялось с использованием набора QIAmp DNA mini

Таблица 1. Объемы выборок и места сбора

Популяция, порода	<i>n</i>	Место сбора материала
Дикие	10	Якутия
Дикие	17	Амурская обл.
Эвенкийские (тоджинские)	22	Тува, Тоджинский р-н
Эвенская	7	Якутия
Эвенкийская	23	Амурская обл., Зейский р-н
Ненецкая	16	Ненецкий АО: колхоз “ЕРВ”, (племярепродуктор) НАО, западная часть Большеземельной тундры

Таблица 2. Частоты аллелей для полиморфных сайтов гена *CAST* у *R. tarandus* (позиция сайта отмечена относительно кальпастатина *Bos taurus* NM_174003.2)

Популяция, порода	<i>n</i>	3788		3797		3862		4138	
		<i>A</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>G</i>
Тоджинские	22	0.93	0.07	1	0	0.05	0.95	0.5	0.5
Дикие (Амурская обл.)	17	0.94	0.06	0.94	0.06	0.18	0.82	0.68	0.32
Эвенкийская (Амур. обл.)	23	0.96	0.04	0.87	0.13	0.22	0.78	0.54	0.46
Эвенская (Якутия)	7	0.93	0.07	0.86	0.14	0	1	1	0
Дикие, Якутия	10	0.7	0.3	0.9	0.1	0.05	0.95	0.95	0.05
Ненецкая	16	0.72	0.28	0.78	0.22	0.25	0.75	0.63	0.38

Kit (QIAGEN, Хильден, Германия). Амплификация гена *PRNP* происходила с помощью qPCRmix-HS (Евроген, Москва, Россия) и праймеров, подобранных с помощью Primer-BLAST [10] и OligoAnalyzer v.3 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Корректировка последовательностей на основании хроматограммы и поиск гетерозигот проводился с помощью программы EditR [11]. Выравнивание последовательностей генов *CAST* и *AR* производилось с помощью пакета Muscle [12], и последующий анализ последовательностей производился с помощью программы Mega X [13]. Анализ изменчивости микросателлитных участков гена *AR* производился с помощью программы GenAlex 6 [14]. Анализ главных компонент, его визуализация и корреляционный анализ производился с помощью пакета FactoMineR [15] языка программирования R.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе анализа последовательностей *CAST* было обнаружено четыре полиморфных сайта, их позиция относительно кальпастатина *Bos Taurus*

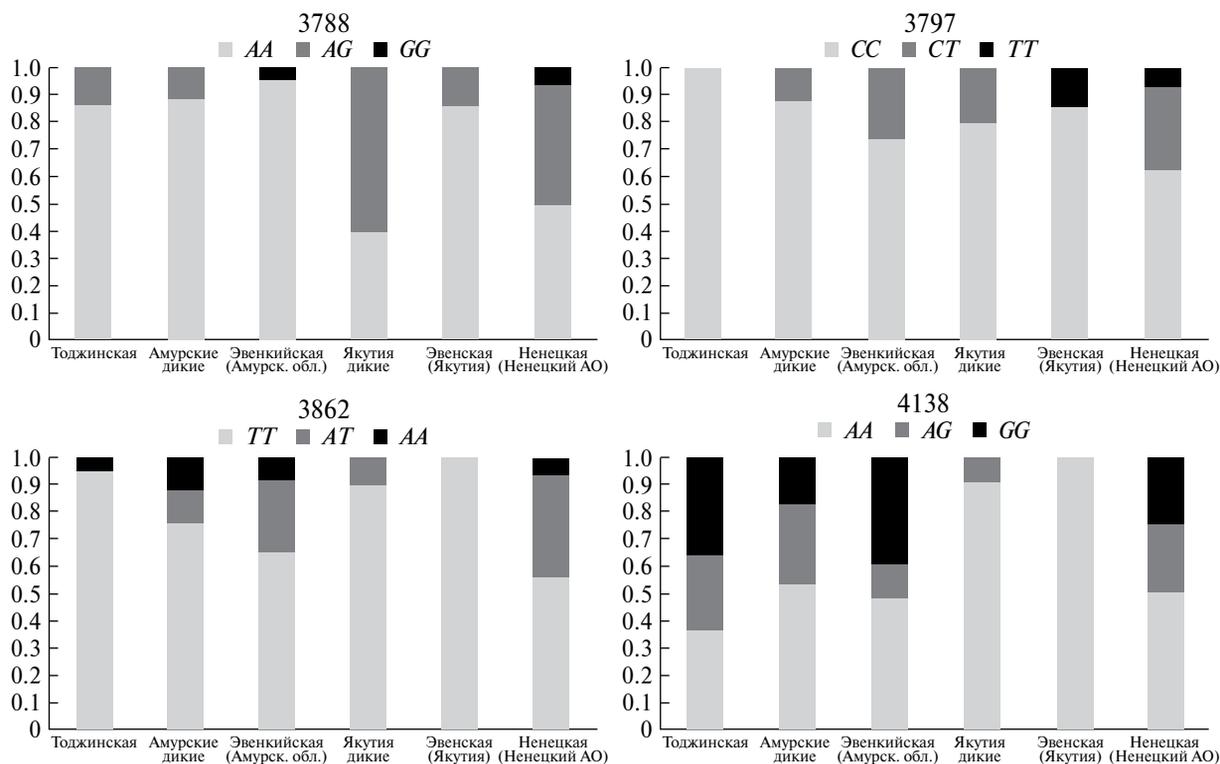


Рис. 1. Частоты генотипов для полиморфных сайтов гена *CAST* у особей *R. tarandus*, изученных в данной работе.

– NM_174003.2: 3788, 3797, 3862 и 4138. Данные позиции локализованы в регионе 32 экзона кальпастатина *Bos taurus*. Ни в одной выборке не было значимым отклонение от равновесия Харди–Вайнберга для каждого из полиморфных сайтов (табл. 2, рис. 1). Анализ главных компонент (рис. 2) показывает, что ненецкая порода оленей и тоджинский экотип отличаются от остальных выборок по

полиморфизмам в сайтах 3788 и 3797 (коэф. корреляции $r(C) = -0,91$, $p = 0.012$), у ненецкой породы в данных позициях доли минорного аллеля превышают 0.2, в то время как у тоджинских оленей минорный вариант *T* в позиции 3797 отсутствует. По второй главной компоненте, объясняющей 41.3% дисперсии, обособливаются от остальных домашние эвенские и дикие олени из Якутии. Их

Таблица 3. Показатели аллельного и генетического разнообразия выборок *R. tarandus*, основанные на полиморфизме микросателлитов в интроне андрогенового рецептора

Популяции, порода	<i>n</i>	N_A	N_E	H_O	$H_{E(u)}$	<i>F</i>
Тоджинская	14	8.7 ± 1.76	6.4 ± 1.62	0.81 ± 0.104	0.85 ± 0.038	0.004 ± 0.166
Дикие, Амурская обл.	15	10.7 ± 1.429	8.3 ± 0.7	0.76 ± 0.044	0.91 ± 0.012	0.14 ± 0.04
Эвенкийская порода (Амурская обл.)	18	9 ± 0.58	6.3 ± 0.42	0.85 ± 0.067	0.86 ± 0.038	-0.015 ± 0.079
Эвенская порода (Якутия)	4	4.7 ± 0.33	3.8 ± 0.49	0.83 ± 0.083	0.83 ± 0.043	-0.14 ± 0.081
Дикие, Якутия	5	6 ± 0.58	5.1 ± 0.46	0.67 ± 0.067	0.89 ± 0.022	0.17 ± 0.074
Ненецкие	14	10 ± 1	10 ± 1	0.64 ± 0.071	0.89 ± 0.014	0.26 ± 0.075

Примечание. N_A – среднее число аллелей на локус, N_E – число эффективных аллелей на локус, H_O – наблюдаемая гетерозиготность, $H_{E(u)}$ – несмещенная ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга.

Таблица 4. Показатели аллельного и генетического разнообразия для микросателлитных локусов интрона андрогенового рецептора *AR*

	N_A	N_E	H_O	$H_{E(u)}$	F_{IS}
AR10INTTG1	8.8 ± 1.14	6.6 ± 0.86	0.88 ± 0.049	0.89 ± 0.019	-0.059 ± 0.082
AR10INTAG2	7.7 ± 1.01	5.7 ± 0.73	0.72 ± 0.059	0.86 ± 0.013	-0.11 ± 0.072
AR10INTTG3	8 ± 1.13	6.4 ± 0.89	0.68 ± 0.023	0.87 ± 0.026	0.16 ± 0.064

Примечание. N_A – среднее число аллелей на локус, N_E – число эффективных аллелей на локус, H_O – наблюдаемая гетерозиготность, $H_{E(u)}$ – несмещенная ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга.

Анализ главных компонент

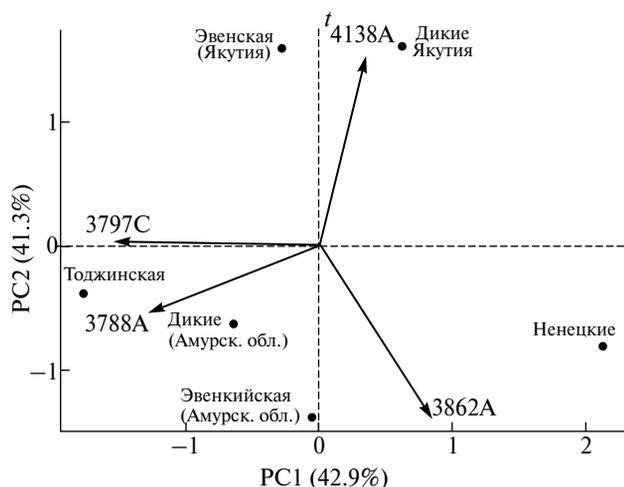


Рис. 2. Результаты анализа главных компонент на основании частот аллелей гена *CAST* для изученных выборок северного оленя.

Анализ главных компонент

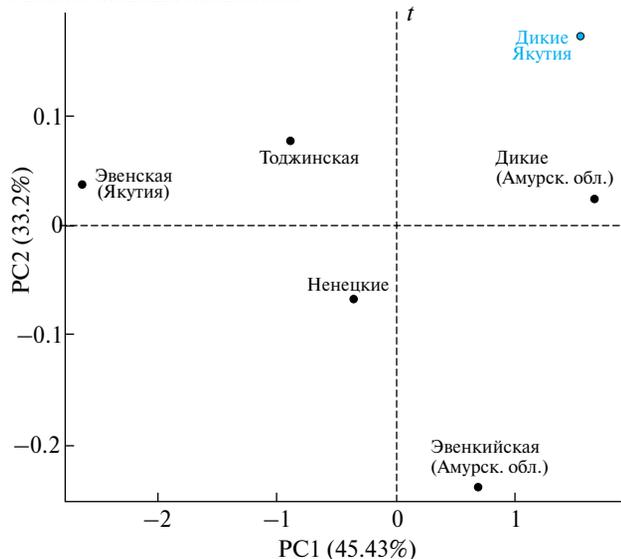


Рис. 3. Результаты анализа главных компонент на основании частот аллелей микросателлитных локусов гена андрогенового рецептора *AR* для изученных выборок северного оленя.

объединяет отсутствие минорных гомозигот и низкая частота минорного аллеля в позициях 3862 ($r(A) = 0.83, p = 0.044$) и 4138 ($r(A) = -0.92, p = 0.008$).

В ходе анализа последовательности участка гена андрогенового рецептора не было обнаружено полиморфных сайтов, однако были найдены три последовательно расположенных микросателлитных локуса $(GA)_n(GT)_n(GA)_n$. По результатам анализа генетического и аллельного разнообразия у диких оленей Якутии и Амурской обл., а также у ненецкой породы обнаружился дефицит гетерозигот по данным микросателлитным локусам, при этом среднее число аллелей на локус в данных выборках было высоким (табл. 3 и 4).

Нами был проведен подсчет повторов для каждого из них и проведен анализ главных компонент, по результатам которого наблюдается обособление диких оленей от домашних (рис. 3). При этом для второго локуса наиболее длинные аллели $G(AG)_{23}$ и $G(AG)_{20}$ встречаются чаще у диких особей по сравнению с домашними, что согласуется с их дифференциацией согласно анализу главных компонент (рис. 3, табл. 5). При сравнении средних длин аллелей локуса *AR10INTAG2* с помощью двустороннего t-теста обнаруживаются значимые отличия между дикими и домашними оленями, при этом для двух других аллелей не наблюдается значимых различий.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаруженный нами полиморфизм в регионе последних факультативных экзонов гена *CAST* представляет интерес, поскольку многие исследования генов-кандидатов ограничиваются кодирующим регионом (например, [16]). В некоторых предыдущих исследованиях было показано, что ассоциированы с признаками мясной продуктивности могут быть SNP в интронах [17] и в 3' UTR-регионах мРНК [5]. В нашем случае полиморфизм располагается в некодирующих регуляторных экзонах. Полиморфизм в них вносит вклад в дивергенцию якутских диких и домашних северных оленей от остальных популяций. Это согласуется с данными, полученными на тех же образцах в результате анализа ядерных микросателлитных локусов [18].

Таблица 5. Аллели микросателлитных локусов андрогенового рецептора *AR*, коррелирующие с диверсификацией изученных выборок северного оленя, выявленной в ходе анализа главных компонент

	Коэф. корреляции <i>r</i>	<i>p</i> -значение	Какая главная компонента коррелирует, (%)
AR10INTAG2_35	0.90	0.013	PC1 (45.43)
AR10INTTG3_31	0.88	0.021	PC1 (45.43)
AR10INTTG3_23	-0.82	0.048	PC1 (45.43)
AR10INTTG1_28	-0.86	0.028	PC1 (45.43)
AR10INTAG2_41	-0.89	0.018	PC1 (45.43)
AR10INTAG2_27	-0.91	0.013	PC1 (45.43)
AR10INTTG3_17	-0.94	0.005	PC1 (45.43)
AR10INTTG1_44	-0.94	0.005	PC1 (45.43)
AR10INTAG2_47	-0.96	0.002	PC1 (45.43)
AR10INTTG3_43	-0.84	0.037	PC2 (33.2)
AR10INTTG1_26	-0.82	0.045	PC3 (13.16)
AR10INTAG2_39	0.87	0.026	PC3 (13.16)

Недавно в ходе анализа изменчивости гена *AR* у КРС были обнаружены индели в интронах, которые ассоциированы с признаками роста и продуктивности [19]. Повторяющиеся последовательности $(GA)_n(GT)_n(GA)_n$, полиморфизм в которых был нами обнаружен в данном исследовании, также могут иметь влияние на транскрипцию и экспрессию андрогенового рецептора, а также обуславливать различия между дикими и домашними особями северных оленей. Нами было обнаружено, что в среднем у диких оленей чаще встречаются более длинные аллели данных микросателлитных локусов, и длина повторов в некодирующих регионах часто коррелирует с экспрессией гена [20].

В ходе настоящего исследования нами была обнаружена дивергенция между оленями из Якутии и остальными выборками по гену *CAST*, а также между дикими и домашними оленями по микросателлитным локусам в интроне гена *AR*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 22-16-00062).

Исследование одобрено Этическим комитетом Института Общей Генетики им. Н.И. Вавилова РАН 09.11.2023, № 1.

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. *Trakooljul N.* Molecular and association analyses of the androgen receptor gene as a candidate for production and reproduction traits in pigs. Göttingen: Cuvillier Verlag, 2004. 127 p.
2. *Трухачев В.И., Криворучко А.Ю., Скрипкин В.С. и др.* Новые однонуклеотидные замены (SNP) в гене андрогенового рецептора (*AR*) у российской породы овец Джалгинский меринос // Генетика. 2016. Т. 52. № 10. С. 1169–1175. <https://doi.org/10.7868/S0016675816100131>
3. *Xiong J., Yang F., Hua G. et al.* Identification of genetic variants within androgen receptor gene of Sika deer and its association with antler production // J. of Animal and Veterinary Advances. 2012. V. 11. № 12. P. 2059–2063.
4. *Ramadevi B., Kumari B. P., Sudhakar K. et al.* Polymorphism of the Ovine Calpastatin (*CAST*) gene and its association with productive traits in Nellore sheep // J. of Animal Res. 2020. V. 10. № 6. P. 881–887. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/613/1/012130>
5. *Corva P., Soria L., Schor A. et al.* Association of *CAPN1* and *CAST* gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina // Genet. Mol. Biol. 2007. V. 30. P. 1064–1069. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000600006>
6. *Li X., Ekerljung M., Lundström K., Lundén A.* Association of polymorphisms at *DGAT1*, leptin, *SCD1*, *CAPN1* and *CAST* genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden // Meat Science. 2013. V. 94. № 2. P. 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.01.010>
7. *Ropka-Molik K., Bereta A., Tyra M. et al.* Association of calpastatin gene polymorphisms and meat quality traits in pig // Meat Science. 2014. V. 97. № 2. P. 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.01.021>
8. *Kholodova M.V., Baranova A.I., Mizin I.A. et al.* A genetic predisposition to chronic wasting disease

- in the reindeer *Rangifer tarandus* in the Northern European part of Russia // *Biology Bulletin*. 2019. V. 46. P. 555–561.
<https://doi.org/10.1134/S1062359019060074>
9. Курбаков К.А., Коноров Е.А., Семина М.Т., Столповский Ю.А. Распространение ассоциированных с болезнью хронического изнурения аллелей гена *PRNP* у диких и домашних северных оленей *Rangifer tarandus* на территории России // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 2. С. 163–168.
<https://doi.org/10.31857/S0016675822020102>
 10. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics*. 2012. V. 13. № 1. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
 11. Kluesner M.G., Nedveck D.A., Lahr W.S. et al. EditR: A method to quantify base editing from Sanger sequencing // *The CRISPR J*. 2018. V. 1. № 3. P. 239–250. <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0014>
 12. Edgar R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucl. Ac. Res*. 2004. V. 32. № 5. P. 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
 13. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol*. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 14. Peakall R.O.D., Smouse P.E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. V. 6. № 1. P. 288–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
 15. Lê S., Josse J., Husson F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis // *J. Stat. Software*. 2008. V. 25. P. 1–18.
<https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
 16. Suleman M., Khan S.U., Riaz M.N. et al. Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds // *African J. Biotechnology*. 2012. V. 11. № 47. P. 10655–10660.
<https://doi.org/10.5897/AJB11.2478>
 17. Calvo J.H., Iguácel L.P., Kirinus J.K. et al. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness // *Meat Science*. 2014. V. 96. № 2. P. 775–782.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.003>
 18. Svishcheva G., Babayan O., Sipko T. et al. Genetic differentiation between coexisting wild and domestic Reindeer (*Rangifer tarandus* L. 1758) in Northern Eurasia // *Genetic Res*. 2022. V. 3. № 6. P. 1–14.
<https://doi.org/10.46265/genresj.UYML5006>
 19. Zhao H., Wu M., Wang S. et al. Identification of a novel 24 bp insertion–deletion (indel) of the androgen receptor gene and its association with growth traits in four indigenous cattle breeds // *Archives Animal Breeding*. 2018. V. 61. № 1. P. 71–78.
<https://doi.org/10.5194/aab-61-71-2018>
 20. Li Y.C., Korol A.B., Fahima T. et al. Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review // *Mol. Ecology*. 2002. V. 11. № 12. P. 2453–2465.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x>

Calpastatin *CAST* and Androgen Receptor *AR* Gene Polymorphism Study as Meat Quality Predictors in Reindeer *Rangifer tarandus*

E. A. Konorov^{1, 2, *}, K. A. Kurbakov^{1, 2}, M. T. Semina¹, Yu. A. Stolpovsky¹, K. A. Layshev^{1, 3}

¹Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109316 Russia

³Center for Interdisciplinary Research of Food Security Problems, St. Petersburg, Pushkin, 196608 Russia

*e-mail: casqy@yandex.ru

Marker-based selection on reindeer meat productivity is in the early stages of development, which requires the study of variability in candidate genes for meat productivity. We chose the calpastatin and androgen receptor genes as such genes to study. Polymorphisms and indels in the androgen receptor gene have been associated with height and weight characteristics in different domesticated animal species. Variation in the region of the calpastatin *CAST* gene, according to the results of many studies, has been associated with meat quality and meat productivity of livestock. Principal component analysis of *CAST* variability has grouped together wild and domestic deer from Yakutia, as well as wild and domestic deer from the Amur region, which implies gene flow between local breeds of domesticated deer and wild populations. Moreover, in the case of three microsatellite loci found in this study in the intron of the androgen receptor, principal component analysis separated wild and domestic deer.

Keywords: *Rangifer tarandus*, meat quality markers, calpastatin, androgen receptor.