

УДК 636.32/38.033.082:575.113

DOI: <https://doi.org/10.31073/abg.70.17>

ЗМІНИ ЧАСТОТИ АЛЕЛІВ ГЕНУ КАЛЬПАСТАТИНУ В ПОПУЛЯЦІЇ ОВЕЦЬ ПРИДНІПРОВСЬКОЇ М'ЯСНОЇ ПОРОДИ

І. А. ПОМІТУН¹, Ю. В. ЛЯШЕНКО¹, О. А. БОЙКО², Л. І. ПОМІТУН¹¹Інститут тваринництва НААН (Харків, Україна)²Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна (Харків, Україна)<https://orcid.org/0000-0002-7743-3600> – І. А. Помітун<https://orcid.org/0000-0003-2747-476X> – Ю. В. Ляшенко<https://orcid.org/0000-0003-3065-0461> – О. А. Бойко<https://orcid.org/0000-0001-5264-1898> – Л. І. Помітун

pomitun@ukr.net

В роботі відображено дослідження зміни частоти алелів гену кальпастатину (CAST), пов'язаного з м'ясною продуктивністю овець, у популяції придніпровської м'ясної породи, яка перебувала у стані панміксичного розмноження з 2020 р. ДНК-дослідження поліморфізму гену CAST овець було здійснено попередньо у 2019 р. та повторно у 2024 р. з використанням метода PCR-RFLP з ендонуклеазою рестрикції MspI.

Дослідженнями, що були виконані нами на 47 вівцях придніпровської м'ясної породи (рандомізована вибірка 2019 року), які належали фермерському господарству «Дослідне» Полтавської області ДНК-типунням було виявлено наступні частоти алелів гену CAST: M – 0,83 і N – 0,17. Розмноження овець в період 2020–2024 рр. здійснювалося панміксично без використання прямого селекційного відбору за генотипом. Частоти алелів гена CAST визначали у 30 тварин, відібраних у 2024 році шляхом випадкової вибірки. В результаті досліджень виявлено тенденцію до збільшення частоти алеля N в популяції порівняно з попереднім періодом (M–0,75; N–0,25). Встановлено статистично значущу різницю в генетичній структурі популяції овець за порівнювані періоди її оцінки (критерій $\chi^2 = 9,653$, що значно перевищує критичний рівень – 5,99 за $p = 0,008$). За п'ять років значно збільшилася частка гетерозиготних тварин MN – від 12,8% до 43,3%, а емпірично визначена структура популяції наблизилася до теоретично розрахованого стану генетичної рівноваги.

Ключові слова: алелі, ген кальпастатину, вівці, поліморфізм, придніпровська м'ясна порода, структура популяції, селекція

CHANGES IN THE FREQUENCY OF CALPASTATIN GENE ALLELES IN THE POPULATION OF PRYDNIPROVSKA MEAT BREED SHEEP

І. А. Pomitun¹, Yu. V. Lyashenko¹, O. A. Boyko², L. I. Pomitun¹¹Livestock farming institute of NAAS (Kharkiv, Ukraine)²V. N. Karazin Kharkiv National University (Kharkiv, Ukraine)

The paper reflects the study of changes in the frequency of alleles of the calpastatin (CAST) gene associated with meat productivity in sheep in the population of the Prydniprovsk meat breed, which has been in a state of panmixic reproduction since 2020. DNA research on the polymorphism of the CAST gene in sheep was conducted previously in 2019 and repeated in 2024 using the PCR-RFLP method with the MspI restriction endonuclease.

Our research was conducted on 47 Prydniprovsk meat breed sheep (randomised sample from 2019) belonging to the Doslidne farm in the Poltava region, DNA typing revealed the following frequencies of CAST gene alleles: M–0.83 and N–0.17. Sheep breeding in the period 2020–2024 was carried out panmixically without the use of direct selection by genotype. The frequencies of CAST gene alleles were determined in 30 animals selected in 2024 by random

sampling. The studies revealed a tendency towards an increase in the frequency of the N allele in the population compared to the previous period ($M=0.75$; $N=0.25$). A statistically significant difference in the genetic structure of the sheep population was established for the compared periods of its assessment (χ^2 criterion $n = 9.653$, which significantly exceeds the critical level – 5.99 at $p = 0.008$). Over five years, the proportion of heterozygous MN animals increased significantly – from 12.8% to 43.3%, and the empirically determined population structure approached the theoretically calculated state of genetic equilibrium.

Keywords: alleles, calpastatin gene, sheep, polymorphism, Prydniprovsk meat breed, population structure, selection

Вступ. Останнім часом у тваринництві широко використовуються досягнення молекулярної генетики, які дали вченим можливість ідентифікувати гени, що безпосередньо, або опосередковано пов'язані з продуктивністю (Miles & Wayne, 2008; Tobar et al., 2020). Одним із найбільш відомих генів, пов'язаних із м'ясною продуктивністю сільськогосподарських тварин, є ген кальпастанину CAST (Jakaria, 2020; Rodriguez et al., 2022; Haren et al., 2022). Кальпастанін – є специфічним ендегенним інгібітором калпаїну. Відомо, що калпаїни беруть участь у посмертному руйнуванні білків м'язів і в синтезі міобластів у живій клітині (Goll et al., 1998; Wendt et al., 2004). У зв'язку з цим поліморфізм гена CAST, може позначатися як на деяких якісних характеристиках м'яса, так і на кількісних показниках м'ясної продуктивності тварин.

В Україні створюються нові породи овець, включаючи і спеціалізованого м'ясного напрямку продуктивності. Однак, їх спрямованої селекції з урахуванням можливостей застосування методів молекулярної генетики до цього часу не застосовувалося, що мотивувало авторів до проведення цих досліджень.

Дослідженнями різних джерел наукової інформації, нами було встановлено, що ген CAST (GeneID: 443364) у овець локалізовано на 5 хромосомі, і він складається з 29 екзонів та має розмір понад 89 тис. 553 п. н. Поліморфізм гена локалізовано у першому інтроні, і його можна визначити методом ПЛР-ПДРФ (полімеразно-ланцюгова реакція – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів), використовуючи ендонуклеазу MspI. При цьому виявляють 2 алелі цього гена: M і N (Palmer, 1998).

Згідно з даними Gorlov et al. (2016), Othman et al. (2016); Khederzadeh et al. (2016), виявлено перевищення частоти прояву у більшості вивчених порід овець алеля M над N. При цьому на різних породах показано, що гетерозиготи MN характеризувалися більш високим середньодобовим приростом маси молодняку від народження до 2 місяців (Gorlov et al., 2016), до 4 і 8 місяців (Khan et al., 2012), а також за показником середньодобового приросту і живої маси у віці 70 днів і показниками якості м'яса (Jawasreh et al., 2017). Наші попередні дослідження також засвідчують переваги молодняку придніпровської м'ясної породи з генотипом MN за інтенсивністю росту у віці від його народження до 120 діб над гомозиготними за алелем M ровесниками (Pomitun et al., 2019).

Разом з цим, також відомо, що високий рівень експресії гена CAST впливає на зниження показника "ніжності" м'яса ягнят (Bagatoli et al., 2013).

Все вищевказане свідчить про те, що вивчення гену CAST у зв'язку з м'ясними якостями овець є актуальним напрямком досліджень. Водночас у порід овець, створених в Україні, поліморфізм цього гена не вивчався, тому в 2019 році нами було розпочато дослідження на новоствореній придніпровській м'ясній породі, в результаті яких було виявлено поліморфізм гена CAST з частотами алелей M і N 0,83 і 0,17, відповідно. Також була показана тенденція до збільшення живої маси ягнят віком 4 місяці у носіїв алеля N, що свідчило про перспективність подальшої роботи зі збільшення чисельності овець-носіїв цього алеля в популяцію овець (Pomitun et al., 2019).

З урахуванням цього, попередньо тестована вказана популяція придніпровської м'ясної породи овець, стала вихідною для подальшого панміктичного розведення тварин, в генотипі яких було виявлено алель N (MN і NN) та тварин з мономорфним станом за алелем M.

Мета і методи досліджень. Цей етап роботи мав на меті дослідження динаміки популяції овець придніпровської м'ясної породи за геном *CAST* внаслідок панміктичного розмноження у продовж 2020–2024 рр. та розробка подальшої селекційної стратегії покращення м'ясних характеристик овець з урахуванням можливості збільшення чисельності овець носіїв алеля N вказаного гена.

Дослідження 2024 року проведено на 30 вівцях придніпровської м'ясної породи. Вказану вибірку було одержано шляхом добору кожної другої тварини зі списку, сформованого в порядку збільшення їх інвентарних номерів у популяції, що належить ФГ "Дослідне" Полтавської обл. Цю породу створено вченими Інституту тваринництва Національної академії аграрних наук України шляхом схрещування овець дніпровського внутрішньопородного типу асканійської м'ясо-вовнової породи (материнська форма) з породами олібс і меріноландшаф (батьківські форми) (Pomitu et al., 2016).

ДНК отримано із крові. Аналіз поліморфізму генів *CAST* здійснено методом ПЛР-ПДРФ. Локус-специфічну ампліфікацію фрагментів генів *CAST* проводили в автоматичному режимі на термоциклері AMPLY-4, використовуючи такі праймери: F: 5'-TGGGGCCCAATGACGACGCCATCGATG-3', R: 5'-GGGTGGAGCAGCACTTCTGATGATCACC-3'

Температурний режим проведення ПЛР для ампліфікації фрагментів генів: денатурація ДНК за 94°C – 5 хв, далі 35 циклів за схемою: денатурація ДНК за 94°C – 30 с, відпал праймерів за 63°C – 30 с, синтез ДНК за 72°C – 1 хв (в останньому циклі впродовж 10 хв).

Для проведення ампліфікації використовували ліофілізований готовий набір згідно з рекомендаціями виробника.

Рестрикцію отриманих ампліконів проводили в реакційній суміші з рестриктазою *MspI*, згідно з рекомендаціями виробника. Результати розщеплення продуктів ПЛР рестриктазами оцінювали електрофоретичним методом у 3% агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм за допомогою транслюмінатора в УФ світлі.

Достовірність різниці між вихідною та сучасною популяцією овець, а також між емпіричними та теоретично розрахованими (за законом Харді-Вайнберга) показниками оцінювали за використання критерію χ^2 .

Результати досліджень. Після рестрикції ампліконів (622 п. н.) ендонуклеазою *MspI*, що були проведені в лабораторії генетичного контролю Інституту тваринництва НААН, дослідженнями електрофореграм продуктів рестрикції фрагментів гена *CAST* (рис. 1) було виявлено 2 алелі M (336, 286 п. н.) та N (622 п. н.) і 3 генотипи овець: MM, MN та NN.

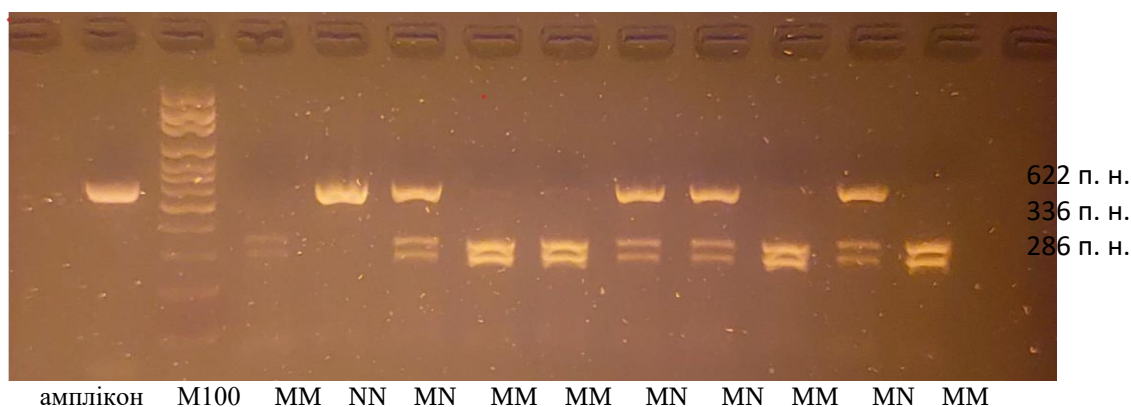


Рис. 1. Електрофореграма продуктів рестрикції фрагмента гена *CAST* у придніпровської м'ясної породи овець (2024 рік)

Примітка: амплікон – 622 п. н., генотип MM – 336, 286 п. н., MN – 622, 336, 286 п. н., NN – 622 п. н., маркер молекулярних мас M100

Аналізом встановлено, що популяція овець придніпровської м'ясної породи, за період оцінки зазнала істотних змін. Якщо в 2019 році частота генотипів складала відповідно: ММ – 0,77, MN – 0,13 і NN – 0,11 (Pomitu et al., 2019), то за оцінкою 2024 року, частка особин з генотипом ММ знизилася на 24 відсоткових пункти, за відносної їх чисельності у загальній структурі поголів'я 53%. Відбулося також істотне, майже в 3 рази, зниження у стаді частки гомозиготних за алелем N особин (табл. 1).

На тлі вказаного зниження звертає увагу збільшення частки гетерозиготних за алелями M і N гена CAST особин. Їх показник збільшився за період розвитку популяції більш ніж в тричі, та перевищив 43%.

1. Фактичні зміни частот генотипів за геном CAST у популяції овець

Генотип	2019 рік		2024 рік	
	кількість овець	частота генотипів	кількість овець	частота генотипів
ММ	36	0,766	16	0,533
MN	6	0,128	13	0,434
NN	5	0,106	1	0,033
Всього	47	1,000	30	1,000

З метою оцінки стану генетичної рівноваги в популяції було розраховано її структуру за частотою генотипів згідно з законом Харді – Вайнберга. Порівнюючи емпірично встановлені та теоретично визначені показники вихідної та сучасної популяції овець, виявлено також істотні зміни в її структурі (табл. 2).

2. Теоретично визначені зміни частот генотипів за геном CAST у популяції овець

Генотип	2019 рік		2024 рік	
	кількість овець	частота генотипів	кількість овець	частота генотипів
ММ	32,36	0,689	16,88	0,563
MN	13,28	0,282	11,25	0,375
NN	1,36	0,029	1,88	0,062
Всього	47	1,000	30	1,000

Перш за все звертає на себе увагу те, що вихідна популяція характеризувалася значними відмінностями між фактично встановленою структурою за частотою генотипів, порівняно з теоретично визначеними показниками. Тобто, вона за оцінки у 2019 році, не перебувала у стані генетичної рівноваги та характеризувалася значним перевищенням у її структурі кількості гомозигот (ММ та NN) за зниженої кількості гетерозиготних генотипів. Розраховане значення (табл. 3) критерія χ^2 становило 14,118, що істотно перевищувало критичний рівень та було вірогідним ($p < 0,001$).

3. Результати порівняння емпіричних та теоретичних оцінок популяції у різні роки з застосуванням критерія χ^2

Рік	Генотип	Фактично встановлена чисельність, гол.	Теоретично визначена чисельність, гол.	χ^2
2019	ММ	36	32,36	0,409
	MN	6	13,28	3,988
	NN	5	1,36	9,721
	Всього	47	47	14,118
2024	ММ	16	16,88	0,045
	MN	13	11,25	0,272
	NN	1	1,88	0,408
	Всього	30	30	0,726

Дослідженнями ж 2024 року нами не було виявлено істотних розбіжностей між фактично встановленим та теоретично визначеним розподілом генотипів у популяції. Тобто вона набула стану генетичної рівноваги. При цьому значення показника χ^2 склало 0,725 і за критичного рівня 3,83 вказувало на відсутність вірогідної різниці ($p > 0,05$).

Отже, можна стверджувати, що в процесі п'ятирічного розвитку, популяція набула врівноваженого стану. Якщо в попередній період її оцінки у структурі превалювали тварини з гомозиготним генотипом за алелем М, то за вказаний період значно, від 12,8% до 43,3%, збільшилася частка гетерозиготних тварин (генотипу MN). Зазначені генетичні зміни виявилися статистично значимими. Показник χ^2 склав 9,653 за критичного рівня 5,99 ($p = 0,008$).

Фактором невірноваженості вихідної популяції ймовірно виступила наявність у ній незначної кількості тварин-носіїв алелю N, який на етапі виведення породи слід розглядати як міграцію генів від однієї з трьох використаних при її створенні порід. За панміксичного ж наступного ізолюваного розведення частка таких тварин у структурі стада збільшувалася, що є наслідком прояву дрейфу генів. На ймовірності якого за відсутності відбору за алелями гену CAST наголошує також в своїй науковій роботі Lachance (2016). Це й визначило вищезазначені статистично значимі зміни та забезпечило генетичну рівновагу в популяції.

Розрахунками частот виявлених алелів в підконтрольній популяції в 2024 році виявлено наступний їх розподіл: 0,75 (М) та – 0,25 (N). Порівняно з 2019 роком аналогічні показники частоти алеля М були вищими, та складали 0,83, а алеля – нижчими (N – 0,17). Отже, виявлено помітну різницю щодо збільшення концентрації алеля N гена CAST.

Однак, для подальшого збільшення частоти прояву бажаного алеля N у популяції овець потрібно проводити індивідуальні підбори пар з урахуванням того, чи є дана тварина носієм потрібного алеля за геном CAST. При цьому при схрещуванні гетерозиготних особин (MN) між собою в наступному поколінні буде очікуватись розподіл генотипів з вірогідністю 1 MM:2 MN: 1 NN, згідно з законом Менделя (Miko, 2008) тобто у 75% потомства буде проявлятися потрібний алель. При використанні у підборах тварин з генотипами MM в MN, буде очікуватись 50% тварин з генотипом, який несе потрібний алель (MN), а 50% будуть мати генотип MM. На жаль, використання схрещування з генотипом NN за якого можливий максимальний результат щодо прояву алеля N у можливих потомків, обмежено виявленням у 2024 році лише однієї вівцематки з цим генотипом.

Висновки і пропозиції. 1. Виявлено, що сучасна популяція овець придніпровської м'ясної породи, на відміну від її попередньої оцінки, знаходиться у врівноваженому стані за геном CAST. При цьому у процесі ізолюваного розведення, фактори її динаміки діяли проти генотипу MM, що обумовлено дрейфом генів.

2. Встановлено, що за панміксичного розведення упродовж одного генераційного інтервалу, відбулося збільшення частки тварин-носіїв алеля N на тлі зменшення частки алеля М у популяції овець. При цьому частота прояву алеля М знизилась проти показника вихідної популяції з 0,83 до 0,75, а алеля N відповідно зросла до 0,25, проти 0,17.

3. ДНК типування за геном CAST овець разом з використанням індивідуальних підборів батьківських пар гетерозиготних за цим геном (MN x MN), а також застосуванням індивідуальних підборів гомозиготних особин MM з носіями алеля N може підвищити до 75% у цій популяції частку потомства, що несе алель N.

Подяки. Дякуємо власникові стада овець В. М. Мокляку за допомогу в організації відбору біоматеріалу (крові овець), який був використаний нами у дослідженнях.

Автори статті заявляють про відсутність конфлікту інтересів стосовно змісту цієї статті.

REFERENCES

- Bagatoli, A., Gasparino, E., Soares, M. A., Amaral, R. M., Macedo, F. A., Voltolini, D. M., & Del Vesco, A. P. (2013). Expression of calpastatin and myostatin genes associated with lamb meat quality. *Genet Mol Res.*, 12 (4), 6168–6175. <https://doi.org/10.4238/2013.December.4.3>.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., & Ouali, A. (1998). The calpain system and skeletal muscle growth. *Can. J. Anim. Sci.*, 78, 503–512. www.nrcresearchpress.com by 82.207.121.96 on 01/31/17

- Gorlov, I. F., Shirokova, N. V., & Randelin, A. V. (2016). CAST/MspI gene polymorphism and its impact on growth traits of Soviet Merino and Salsk sheep breeds in the South European part of Russia. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40, 399–405. <https://doi.org/10.3906/vet-1507-101>.
- Haren, H. I. H., Purwantini, D., Sumaryadi, M. Y., Setyaningrum, A., Susanto, A., & Pangestu, M. (2022). Genetic Variation in the Calpastatin Gene and its Association with Growth Traits in Batur Sheep. *3rd International Conference on Advance & Scientific Innovation*, 420–431. <https://doi.org/10.18502/cls.v0i0.11827>
- Jakaria, Ulum, M. F., Lestari, D., Akwila, S., Sihite, D. E., Priyanto, R., Muladno, Sumantri, C. (2020). Investigating new SNPs of CAST, CAPN and SCD genes in 5'UTR of Bali cattle. *Biodiversitas*, 21 (7), 2971–2976. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210713>
- Jawasreh, K. I., Jadallah, R., Al-Amareen, A. H., Abdullah, A. Y., Al-Qaisi, A., Al-rawashdeh, I. M., Al-Zghoul, M. B. F., Ahamed, M. K. A., & Obeidat, B. (2017). Association between MspIcalpastatin gene polymorphisms, growth performance, and meat characteristics of Awassi sheep. *Journal of Animal Sciences*, 87 (5), 635–639.
- Khan, S., Riaz, M. N., Ghaffar, A., & Khan, M. F. U. (2012) Calpastatin (CAST) gene polymorphism and its association with average daily weight gain in Balkini and Kajli sheep and Beetal goat breeds. *Pakistan J. Zool*, 44 (2), 337–382.
- Khederzadeh, S., Iranmanesh, M., & Motamedi-Mojdehi, R. (2016). Genetic diversity of myostatin and calpastatin genes in Zandi sheep. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 4 (1), 45–52. <http://lst.uk.ac.ir>
- Lachance, J. (2016). Hardy–Weinberg Equilibrium and Random Mating. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, 208–211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00022-6>
- Miko, I. (2008). Gregor Mendel and the principles of inheritance. *Nature Education*, 1(1), 134.
- Miles, C., Wayne, M. (2008). Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education*, 1 (1), 208.
- Othman, O. E., Darwish, H. R., Abou-Eisha, A., El-Din, A. E. (2016) Investigation of calpastatin genetic polymorphism in Egyptian sheep and goat breeds. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13 (4), 1879–1883. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2343>
- Palmer, B. R., Roberts, N., Hickford, J. G., & Bickerstaffe, R. (1998). Rapid communication: PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. *J Anim Sci.*, 76, 1499–1500. <https://doi.org/10.2527/1998.7651499x>
- Plokhinsky, N. A. (1970). *Biometrics*. 2nd edition. Moscow University. [in Russian]
- Pomitun, I. A., Kosova, A., Zolotareva, S. A., & Pan'kiv, L. P. (2016). Metodicheskiye podkhody k otsenke ovets miasnoho napravleniya produktyvnosti [Methodical approaches to the assessment of sheep meat productivity] *Zootekhnicheskaya nauka Belarusi – Animal science Belarus*, 51 (1), 147–154. <http://repository.vsau.org/getfile.php/17133.pdf>
- Pomitun, I. A., Rossokha, V. I., Boyko, Ye. A., Guzevatyi, O. E., Shpilka, M. V., & Kulibaba, R. O. (2019). Analysis of calpastatin and calpypge genes polymorphism in Prydniprovskaya meat sheep. *Agricultural Science and Practice*, 6 (2), 58–65. <https://doi.org/10.15407/agrisp6.02.058>
- Rodriguez, V. R., Maffioly, J. I., Zdanovicz, L. A., Fabre, R. M., Barrandeguy, M. E., García, M. V., & Lagadari, M. (2022). Genetic diversity of meat quality related genes in Argentinean pigs. *Veterinary and Animal Science*, 15, 100237. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100237>
- Tobar, C., Melissa, K., Alvarez, L., Alvarez Franco, D. C., Ángela, L. (2020). Genome-wide association studies in sheep from Latin America. Review. *Rev. Mex. Cienc. Pecu*, 11 (3), 859–883. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i3.5372>
- Wendt, A., Thompson, V. F., Goll, D. E. (2004). Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biological Chemistry*, 385 (6), 465–472. <https://doi.org/10.1515/BC.2004>

Одержано редколегією 10.07.2025 р.

Прийнято до друку 21.08.2025 р.