

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ОВЕЦ (*Ovis aries* L.). Сообщение I. МИОСТАТИН, КАЛЬПАИН, КАЛЬПАСТАТИН (обзор)

В.И. ТРУХАЧЕВ¹, М.И. СЕЛИОНОВА², А.Ю. КРИВОРУЧКО¹,
А.М.М. АЙБАЗОВ²

Тестирование по генам, ассоциированным с количественными и качественными показателями говядины от специализированных пород мясного скота — кальпаин-кальпаинового каскада (*CAPN*, *CAST*), миостатина (*MSTN*), ростового дифференцирующего фактора (*GDF5*), тиреоглобулина (*TG5*), лептина (*LEP*), гена белка, связывающего жирные кислоты (*FABP4*), — включено в селекционные программы в странах Америки, Европы и в Австралии (A.V. Eepenaar, 2006; Y.F. Liu с соавт., 2010; U. Singha с соавт., 2014; A. Cierloch с соавт., 2017). С современным ростом производства баранины, который отмечается во всем мире, связано увеличение доли специализированных мясных пород и возрастающие требования к мясной продуктивности для мясошерстных и шерстных овец (А.М. Холманов с соавт., 2015; М.И. Селионова, 2015). Выявляющиеся ассоциированные с такими показателями гены-кандидаты для их применения в селекции (D.W. Pethick с соавт., 2014). В представленном обзоре обобщены результаты работ по изучению биологической активности, генетической структуры и влиянию гена миостатина на показатели мясной продуктивности овец. Ген расположен на 2-й хромосоме, состоит из трех экзонов, двух интронов и характеризуется высоким генетическим полиморфизмом (J.G. Hickford с соавт., 2010; M.R. Ansary, 2011; H. Nan с соавт., 2013). Мутации g+6723G>A и g+2449G>C положительно влияют на развитие мышц, что достоверно увеличивает содержание мякоти в туше при снижении количества жира (A. Clor с соавт., 2006; P.L. Johnson с соавт., 2009; I.A. Voman с соавт., 2010; A.Y. Masri с соавт., 2011; M. Hope с соавт., 2013; J. Wang с соавт., 2016). Другим фактором, определяющим реализацию признаков мясной продуктивности у овец, служит протеолитическая кальпаин-кальпастиновая система (CCS) (D.E. Goll с соавт., 2003; H.Y. Chung, 2003). Ген кальпастина расположен на 5-й хромосоме и включает четыре экзона и три интрона (B.R. Palmer, 1998). Гены кальпаина и кальпастина представлены множеством аллелей, которые встречаются в разных породах с неодинаковой частотой (F.E. Shahrودي с соавт., 2006; S.O. Vuyn с соавт., 2009; M.A. Azari с соавт., 2012; G. Shahabodin с соавт., 2012; R.R. Aroga с соавт., 2014; N. Shahram с соавт., 2014; N.S. Kshar с соавт., 2015). Показана связь точечных мутаций в гене *CAPN* с формированием жировой прослойки вокруг бедер, почек, сердца и достоверная ассоциация с меньшим содержанием жира в туше; в гене *CAST* — с интенсивностью роста молодняка овец, прежде всего за счет большего увеличения мышечной массы (M.R. Nassiry с соавт., 2006; A. Mahdavi Mamaghani с соавт., 2008; M. Tahmoorespur с соавт., 2012; Q. Fang с соавт., 2013). Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности проведения тестирования по генам миостатина, кальпаина и кальпастина с целью выявления желательных генотипов для селекции на увеличение мясной продуктивности.

Ключевые слова: *Ovis aries* L., овцы, мясная продуктивность, миостатин, *MSTN*, кальпаин, *CAPN*, кальпастин, *CAST*, генетический полиморфизм, SNP, геномное редактирование.

Исследования генетико-биохимических основ фенотипического полиморфизма признаков, определяющих мясную продуктивность, ведутся уже многие десятилетия. Известно, что большинство показателей продуктивности находится под совместным контролем значительного числа генов. Полиморфизм генов-кандидатов, участвующих в формировании определенных признаков продуктивности и желательных генотипов выявляют с использованием стандартных методов молекулярно-генетического анализа (AFLP — amplified fragment length polymorphism, полиморфизм в сайтах рестрикции, ISSR — inter simple sequence repeats, инвертированные повторы) (1). Наибольшие успехи достигнуты в молочном скотоводстве. Определены основные гены, определяющие количественные и качественные показатели молочной продуктивности. Маркер-ассоциированная селекция (MAS, marker assisted selection) во многих странах с развитым молочным животноводством стала неотъемлемой частью национальных селекционных программ (2).

Выявление генов, ассоциированных с мясной продуктивностью

животных, происходило несколько медленнее, однако и здесь есть успехи. Так, в странах Америки, Европы и в Австралии применяется тестирование по генам кальпастин-кальпаинового каскада (*CAPN1*, *CAST*), миостатина (*MSTN*), ростового дифференцирующего фактора (*GDF5*), тиреоглобулина (*TG5*), лептина (*LEP*), белка, связывающего жирные кислоты (*FABP4*) (3-6).

Основной тенденцией развития овцеводства в последние десятилетия во всем мире стал постоянный рост производства баранины, чем определяется увеличение доли специализированных мясных пород и возрастающие требования к мясной продуктивности для овец мясошерстных и шерстных пород (7, 8). Однако повышение мясной продуктивности овец на основе MAS пока что следует признать наименее разработанной темой. До настоящего времени применение молекулярно-генетических тестов в селекционных программах не привело к заметному улучшению экономически значимых показателей при производстве баранины. В то же время выявление соответствующих генов и прямая селекция по ним могут быть перспективными, поскольку признаки мясной продуктивности характеризуются невысокой наследуемостью. Так, для мериносовых пород и их помесей с мясными породами коэффициент наследуемости массы туши, ее выхода и содержания в ней мякоти составляет 0,20-0,40, для специализированных мясных пород — 0,38-0,54 (9-11).

Целью настоящего обзора стал анализ современного состояния исследований по выявлению генов, контролирующих мясную продуктивность овец, и рассмотрение основных направлений прикладного использования молекулярно-генетических тестов в овцеводстве для увеличения производства качественной баранины.

Чтобы понять механизм генетической вариабельности, оказывающей влияние на развитие скелетной мускулатуры овец, важно рассмотреть ее функционирование и особенности развития в норме. Известно, что мышечная ткань — одна из основных составляющих тела высших позвоночных (на нее приходится до 40 % массы), в ней протекает 25 % реакций белкового обмена (12). В мышечной ткани преобладают так называемые «медленные» мышечные волокна (тип I). Они характеризуются тем, что медленно устают, содержат большое количество митохондрий и миоглобина, который придает ткани красноватый цвет и определяет оксидативный тип метаболизма. Напротив, «быстрые» волокна (типы IIb и IIx) имеют гликолитический анаэробный тип метаболизма, содержат меньше миоглобина и митохондрий, чем обусловлен более светлый цвет этих волокон (13). Тип и число мышечных волокон закладываются на ранних и средних этапах развития плода. На поздних сроках эмбриогенеза и в первый период постнатального развития происходит гипертрофия всех мышечных волокон благодаря слиянию многоядерных миофибрилл с одноядерными сателлитными клетками (13). Эти структурные преобразования определяют максимальную схожесть скелетной мускулатуры новорожденных и взрослых, в том числе по типу мышечных волокон (14). При этом мутации, оказывающие влияние на развитие мышечной ткани, как правило, изменяют количество, состав мышечных волокон, а также степень их гипертрофии.

Ген миостатина (*myostatin*, *MSTN*) — один из наиболее изученных генов-кандидатов мясной продуктивности овец (15), коз (16) и крупного рогатого скота (17, 18). Интерес к *MSTN* появился при изучении механизма его действия у млекопитающих и рыб (19) и участия в обеспечении гоночной работоспособности собак (20). Миостатин известен также как фактор роста и дифференцировки 8 (*growth differentiation factor 8*, *GDF8*) (21, 22). A.C. McPherron с соавт. (23), исследуя геном мыши и кодирующие белки,

относящиеся к одному из наиболее важных семейств ростовых факторов (transforming growth factor β -family, *TGF- β*), провели одно из первых детальных исследований гена миостатина и механизмов, обеспечивающих его биологическую активность. Позже структура гена миостатина была установлена для других видов сельскохозяйственных животных (24, 25).

При изучении структуры гена *MSTN* овец Y.F. Gong с соавт. (26) установили, что он расположен на 2-й хромосоме и состоит из трех экзонов и двух интронов. В 1-м, 2-м и 3-м экзонах находится соответственно 508 (из них 373 кодирующих), 374 и 1893 (381 кодирующий) нуклеотидов, в 1-м и 2-м интронах — соответственно 1833 и 2030 нуклеотидов. Кодирующие области гена высококонсервативны. У пород овец новозеландский ромни, тексель, корридель, дорпер, перендейль, суффолк, полл дорсет, дорсет даун, мерино выявлены 28 нуклеотидных замен (данные NCBI GenBank, доступ DQ530260), в том числе хорошо описанная мутация с.*1232G<A (*MSTN* g+6227G<A). Из этих 28 замен только одна находится в 1-м экзоне (с.101G<A) и потенциально приводит к замене глутаминовой кислоты (Glu) на глициновую (Gly) в 34-м кодоне. Три SNPs располагаются в области промотора, три — в 5'-UTR участке, 11 — в 1-м интроне, пять — во 2-м интроне и пять — в 3'-UTR (27). У овец породы советский меринос также описаны 28 SNPs, причем две обнаружены впервые: с.940G>T в 3-м экзоне и с.*16C>A — в 3'-фланкирующей области гена. Мутация с.940G>T превращает 314-й кодон глутаминовой кислоты в стоп-кодон (GAA>TAA), что приводит к укорачиванию белкового продукта на 62 аминокислоты (28). Сообщается о дополнительных, но еще не охарактеризованных мутациях в районе промотора, 1-го и 2-го интронов и 3'-UTR области (29-31). Полученные данные свидетельствуют, что генетическая изменчивость миостатина, возможно, больше и необходимо более детальное изучение влияние выявленных SNPs на развитие скелетной мускулатуры овец.

У овец разных пород и животных других видов ген миостатина высокогомологичен. В промоторе *MSTN* у овец найдены участки, обладающие сродством к генам *MEF2* (myocyte enhancer factor-2, ключевой промиогенной фактор транскрипции) и *AR* (androgen, андроген), что указывает на возможность участия белковых продуктов этих генов в регуляции экспрессии миостатина (32). В регуляцию транскрипции гена *MSTN* также вовлечены факторы MyoD, Myf5, Mrf4, p21, Smad (33-35). Блокирование пути от гена миостатина к его продукту и далее к мышечным клеткам-мишеням, имеющим соответствующий трансмембранный рецептор, сопровождается выраженным позитивным действием на метаболизм клеток скелетной мускулатуры (36-38). Во время эмбрионального миогенеза предшественники миобластов активируются факторами MyoD. После взаимодействия с миостатином запускается фактор 21 (p21), ингибирующий активность белков циклина Cdk2 и ретинобластосомы Rb, что подавляет пролиферацию миобластов и сателлитных клеток в фазу G₁. Доказано уменьшение пролиферации миобластов *in vitro* под действием различных концентраций миостатина. В отсутствие миостатина белок Rb сохраняется в гиперфосфорилированной форме, что ведет к повышению степени пролиферации миобластов (39). Подтверждение описанного механизма получили С. Liu с соавт. (40). В их работе вектор со встроенным коротким участком РНК (short-hairpin, shRNA) использовали для блокирования экспрессии миостатина в клеточной культуре первичных миобластов овец. Это позволило снизить активность эндогенного *MSTN* на 73,3 %, увеличить пролиферацию первичных миобластов на 28,3 % и достоверно уменьшить экспрессию белков MyoD (на 37,6 %, $p = 0,025$), миогенина (на 33,1 %, $p = 0,025$),

$p = 0,049$), $p21$ (на 49,3 %, $p = 0,046$) и $Smad3$ (на 50,0 %, $p = 0,007$).

Отрицательная регуляторная роль миостатина в развитии скелетных мышц продемонстрирована в эксперименте по получению овец с выраженным фенотипическим эффектом «двойной мускулатуры». Использовался метод нокаута (knock-out, KO) посредством микроинъекции генетического вектора shRNA для блокирования экспрессии гена *MSTN* и технология переноса ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT). Из 429 KO-эмбрионов получили пять живых ягнят, из них трое достигли возраста продуктивного использования. У трансгенных животных с нокаутом гена миостатина диаметр миофибрилл (мышечных волокон) и живая масса в 6-месячном возрасте были достоверно выше (41).

Выявлена высокая эффективность одновременного использования нуклеазы, действующей как активатор транскрипции (transcription activator-like effector nucleases, TALENs), и одноцепочечной олигонуклеотидной последовательности ДНК (single-stranded DNA oligonucleotides, ssODN) для геномного редактирования у овец (42). Проверка на клеточной линии первичных фибробластов овец НЕК 293Т показала, что совместная трансфекция TALENs и ssODN индуцировала точное редактирование гена миостатина. Модифицированные по *MSTN* клетки успешно использовались в качестве доноров ядер для клонирования эмбрионов (42). С помощью TALENs и ssODN крупный рогатый скот и овец с KO-миостатином (knock-out *MSTN*) получали также в Великобритании и США. Авторы использовали конструкцию btGDF83.1L + 83.1NR (43) и транскрипционный вектор RCIscrip-GoldyTALEN (Addgene ID 38142, «Addgene», США). Из 26 отредактированных бластоцист овец получили 12 ягнят, из которых 9 оказались жизнеспособными и демонстрировали достоверно более высокую энергию роста из-за большего прироста миофибрилл (44). М. Crispo с соавт. (45) продемонстрировали высокую эффективность системы CRISPR/Cas9 для редактирования *MSTN* и получения нокаутных овец с увеличенной массой тела и выраженным развитием скелетных мышц. 53 *MSTN*-KO бластоцисты были пересажены 29 реципиентам, от них получили 22 жизнеспособных ягненка, у 10 из которых подтверждена генетическая мутация миостатина. У ягнят с отключенной экспрессией миостатина среднесуточный прирост мышечной массы был достоверно выше (45).

Генетические манипуляции, которые инактивируют *MSTN* у трансгенных мышей и рыб, вызывают тот же эффект: у нокаутных особей масса тела и ее прирост были достоверно выше, чем у контрольных (23, 46). Так, посредством микроинъекции вектора с бессмысловой РНК гена миостатина получили трансгенную рыбу с фенотипом «двойной мускулатуры» (47). У KO-гомозиготных трансгенных особей количество мРНК миостатина и белка составило соответственно 33 и 26 % от их содержания у нетрансгенных, при этом количество мРНК миогенных регулирующих факторов — *MyoD*, миогенина (*MyoG*), *Mrf4* и *Myf5* было значительно выше. Блокирование экспрессии миостатина при нокаутах вызывало увеличение площади мышечных волокон в 2 раза и массы тела на 45 % по сравнению с нетрансгенными особями (47). У трансгенных мышей нокаут *MSTN* привел к увеличению массы скелетных мышц почти в 4 раза, а избыточная экспрессия фоллистатина активировала рецепторы активина, регулирующие синтез волокон типа IIb, и приводила к гипертрофии миобластов при значительном увеличении пластичности скелетных мышц (48-51).

Выявленная биологическая роль миостатина и демонстрация перспективности геномного редактирования для получения животных с высокой мясной продуктивностью без встраивания рекомбинантной ДНК в

геном, определили интерес к этому белку и его гену как потенциальному генетическому маркеру. Первые исследования влияния гена миостатина на мясную продуктивность были выполнены на овцах породы тексель с более развитой мускулатурой, чем у других пород. Цель эксперимента заключалась в установление генетического механизма, контролирующего эту отличительную фенотипическую особенность породы (15). В 3'-области мРНК гена миостатина выявили значимый для формирования мышечных волокон SNP с.*1232G>A (ранее обозначался как g+6723G>A). Установлено, что он или мутация, приводящая к замене нуклеотида G на A (аллель A), создает лейтмотив распознавания для трех микроРНК (miR-1, miR-206 и miR-122), тем самым блокируется точка инициации трансляции мРНК и ингибируется ген миостатина. Это приводит к мышечной гипертрофии и увеличению количества мякоти в тушах. Аналогичные результаты получены на помесях породы тексель с породами полл дорсет и уэльская горная (52-54). Такое действие мутации подтверждено на других породах овец. Так, при генотипировании 338 ягнят шароле по двум SNPs в *GDF8* (g+2449G>C и g+6723G>A), сопоставлении SNP-генотипов, показателей продуктивности, а также фенотипических признаков у 56500 ягнят выявлена значимая связь SNPs с глубиной мышц ($p < 0,001$). Глубина мышц у животных с g.+6723AA по сравнению с имеющими генотипы g+6723GG и g+6723AG была больше с высокой достоверностью ($p < 0,002$). Аддитивный и доминантный эффекты аллеля g+6723A составили соответственно $1,20 \pm 0,30$ мм и $-0,73 \pm 0,36$ мм (55).

Сообщается о положительном влиянии мутации g+6723G>A гена миостатина в гомозиготном состоянии (56). Авторы выявили достоверное преимущество гомозигот AA по выходу туши и мякоти в поясничной области и задних конечностях. Не обнаружено различий в физико-химических показателях мышц *musculus longissimus lumborum* (LL) и *musculus semimembranosus* (SM) у овец разных генотипов. В то же время после кулинарной обработки стейки из SM от животных с генотипом AA получили значительно более высокую дегустационную оценку. Обнаружена связь однонуклеотидных замен, выявленных в ампликоне 304 п.н. из промоторной области овечьего *MSTN*, с признаками мясной продуктивности у овец породы новозеландский ромни (New Zealand Romney Sheep) (57). Общие линейные модели смешанного эффекта показали, что у осоей с генотипом с.-2449GC выше выход мякоти ($p = 0,032$) и соотношение мякоти и костей ($p = 0,028$), чем у генотипа с.-2449GG. Генотип с.-2379CC был связан с увеличением массы при рождении ($p = 0,003$) и при отбивке ($p = 0,028$), тогда как генотип с.-2379TC не ассоциирован со скоростью роста. Гаплотип H3 ассоциировался с уменьшением массы при рождении ($p = 0,002$) и при отбивке ($p = 0,011$), а гаплотип H2 был связан с увеличенным выходом мякоти в туше ($p = 0,012$). Авторы указывают на перспективность отбора носителей с.-2449GC для повышения мясной продуктивности овец (57).

В исследованиях на овцах породы норвежская белая (Norwegian White Sheep) описана новая мутация (с.960delG) в кодирующей области гена миостатина. Установлено, что она сдвигает рамку считывания в положении 320 и приводит к преждевременному стоп-кодону в положении 359, что обуславливает большее развитие мышц и меньшее содержание жира. Выявленная мутация имела больший фенотипический эффект, чем с.*1232G>A (g+6723G>A) (58). У макеевских овец (Makuei sheep), разводимых в Иране, в 1-м интроне гена миостатина описаны и зарегистрированы в NCBI GenBank под номером KJ526625 новые однонуклеотидные полиморфизмы, которые находятся в позициях 224 п.н., 226 п.н. и 242 п.н.

и приводят соответственно к заменам с.224С>Т, с.226А>G и с.242G>Т. Генетико-статистический анализ показал, что замена с.226А>G связана с величиной сердца и обхватом пясти, тогда как эта и другие описанные мутации не ассоциированы с показателями высоты в холке и крестце и с длиной тела (59). В породе балучи (Baluchi) мутация в 1-м интроне *MSTN* достоверно влияла на живую массу животных и выход мякоти в туше (60).

Обсуждая перспективы селекции по определенным аллелям и генотипам по *MSTN* для повышения мясной продуктивности овец, следует отметить и некоторые негативные аспекты. Получение животных с эффектом «двойной мускулатуры» сопровождалось уменьшением размеров жизненно важных органов (сердца, легких, почек) и хрупкостью костей задних конечностей. При этом животные оказались более восприимчивы к респираторным заболеваниям, мочекаменной болезни, альвеолярной гипоксии, гипоксемии и дистонии. Кроме того, быстрый рост мышц негативно влиял на показатели воспроизводства, повышалась эмбриональная смертность, число аборт и мертворождений (61). Авторы указывают, что необходим строгий генетический контроль при подборе родительских пар, чтобы избежать нежелательные эффекты (6, 62).

В реализации признаков мясной продуктивности овец участвует протеолитическая кальпаин-кальпастатиновая система (CCS). Она представлена семейством Ca^{2+} -зависимых нейтральных протеаз, которые присутствуют в большинстве тканей животных и участвуют в регуляции клеточных процессов, включая сигналинг и синтез цитоскелетных белков, и гомеостаз мышечной ткани. Увеличение скорости роста скелетных мышц регулируется понижением темпов деградации мышечного белка за счет уменьшения активности кальпаинового локуса (*calpain*, *CAPN*) и одновременного повышения активности белков кальпастатинового каскада (*calpastatin*, *CAST*). Кроме того, кальпаин-кальпастатиновый комплекс регулирует протеолитические и цитолитические реакции после убоя, определяя скорость разрушения Z-дисков скелетной мускулатуры и ослабления связей между мышечными волокнами, что играет ключевую роль в распаде тубулина и титина в период созревания и при формировании так называемой нежности мяса (63, 64). Биологическая роль кальпаин-кальпастатиновой системы в автолизе белков делает гены кальпаина и кальпастатина одними из важных кандидатов при разработке генетических подходов для получения мяса нежной текстуры (65, 66).

Первый белок семейства кальпаинов был изучен в 1976 году. Выявлено, что кальпаин представлен двумя гетеродимерными типами, каждый из которых содержит аналогичные и сильно различающиеся субъединицы — соответственно К30 и К80. Кальпаин А, или μ -кальпаин, максимально активируется *in vitro* при концентрации Ca^{2+} 50-100 мкМ, кальпаин В, или m -кальпаин, — при концентрации 1-2 мкМ. Однако при оптимальной концентрации Ca^{2+} активность кальпаина В выше, чем кальпаина А (65, 67). Активность кальпаинов и концентрация Ca^{2+} изменяется в зависимости от температуры и времени хранения мышц после убоя. Через 120 ч при 30 °С содержание свободного кальция в длиннейшей мышце спины было на 40 % больше, чем при 2 °С. При этом активность m -кальпаина снижалась медленнее, чем μ -кальпаина (68). Эндогенный ингибитор кальпаинов — кальпастатин связывается в присутствии Ca^{2+} только с гетеродимерными молекулами кальпаинов. Одноцепочечные кальпаины из-за отсутствия второго связывающего сайта не инактивируются кальпастином. Аминокислотные последовательности μ - и m -кальпаинов позвоночных животных высококонсервативны (гомология кальпаинов мле-

копитающих составляет более 90 %), при этом набор расщепляемых ими субстратов сходен, а иногда и идентичен (68). Полногеномное секвенирование гена кальпаина и изучение регуляторных и консервативных субъединиц этого белка позволили установить их высокое сходство у многих видов животных. Так, у овцы идентичность нуклеотидной последовательности размером 192 п.н. в гене кальпаина (5-й и 6-й экзоны с промежуточным интроном) с аналогичной последовательностью у козы, крупного рогатого скота, бизона и свиньи составила соответственно 99, 97, 97 и 89 % (69). Для амплификации участка гена кальпаина 3 крупного рогатого скота использовали праймеры, разработанные для его обнаружения в геноме овцы, и получили сопоставимые результаты (70).

На разных породах овец показано, что ген кальпаина полиморфен, при этом частота генотипов неодинакова. У иранской породы бандур (Bandur) выявлены три генотипа — *AA*, *AB* и *BB* с частотой соответственно 0,672; 0,295 и 0,033 (68). В породе далах (Dalagh) распределение этих генотипов, обозначенных как G1, G2 и G3, составило 0,082; 0,891 и 0,027 (71). Аналогичные результаты получены для курдючных и каракульских овец (72, 73). При исследовании генетической структуры 11 фенотипически несходных пород овец в Индии с разным географическим распространением по ряду генов-кандидатов мясной продуктивности (*CAPN4*, *CAST*, *FABP3* и *DGAT1*) установлена средняя гетерозиготность по ним и их гаплотипам — соответственно 0,328 и 0,545 (74).

Изучение влияния аллельного состояния в гене кальпаина на параметры мясной продуктивности овец позволило установить достоверные различия в содержании жира в тушах, полученных от животных разных генотипов. Так, обнаружена связь точечных мутаций в 10-м экзоне *CAPN3* с жировой прослойкой вокруг бедер, почек и сердца у животных с разными SNP (75). В экспериментах, выполненных на ягнятах породы ромни (New Zealand Romney) в Новой Зеландии, из четырех установленных генотипов в 10-м экзоне *CAPN3* выявлена достоверная ассоциация одного из генотипов с меньшим содержанием жира (при отсутствии связи с параметрами туш по массе и промерам), что определило более высокую сортность и цену. Полученные данные позволили авторам прийти к заключению о перспективности использования гена *CAPN3* в программе разведения этой породы для улучшения потребительских качеств баранины (76). В то же время Y. Muto с соавт. (77), оценивая биохимическое значение полиморфизма в гене *CAPN3* у овец, не установили достоверного влияния мутаций на изучаемые признаки. Ни одна из четырех выявленных однонуклеотидных замен, в том числе в 10-м экзоне, не вызывала изменений в аминокислотной последовательности белка *CAPN3*. Не установлено существенных различий в степени экспрессии мРНК и количестве белка *CAPN3* у животных разных генотипов (77).

Как уже отмечалось, кальпаастатин — специфический ингибитор m - и μ -кальпаинов в тканях млекопитающих, обуславливающий нежность мяса при созревании после убоя. Впервые структура гена кальпаастатина овец была изучена в 1998 году (78). Он локализован на 5-й хромосоме, включает 4 экзона и его размер составляет порядка 100 тыс. п.н. Секвенирование консенсусных последовательностей гена кальпаастатина овец показало высокую схожесть с таковыми у коз, крупного рогатого скота и свиней (соответственно 94-98, 92-93 и 82-83 %) (79). У овец породы дорсет хорн (Dorset Horn) выявлены два аллеля (*M* и *N*) гена кальпаастатина, которые встречаются с частотой соответственно 0,77 и 0,23 (78). В популяциях овец из Ирана и Пакистана также обнаружены два аллеля, при этом

частота генотипов *MM*, *MN*, *NN* в породах далах (Dalagh) — 0,082, 0,891, 0,027; лори (Lori) — 0,320, 0,630, 0,050; зел (Zel) — 0,620, 0,260, 0,120; лохи (Lohi) — 0,77, 0,20, 0,03; кайли (Kajli) — 0,68, 0,26, 0,06, талли (Thalli) — 0,80 (*MM*) и 0,20 (*MN*) (71, 80-82). В последующих работах было выявлено, что у овец ген кальпастина генетически разнообразнее и представлен множеством других аллелей. Исследование нуклеотидной последовательности 6-го экзона методом PCR-ISSR анализа и последующего секвенирования ДНК позволило установить пять новых аллелей, при этом один оказался миссенс-мутацией и приводил к замене глицина на лейцин (Gln/Leu), что потенциально могло отразиться на функции белка (83). В породе новозеландский ромни при изучении 6-го экзона и 5-го и 12-го интронов гена кальпастина, помимо описанных ранее, нашли четыре новых аллеля в 12-м экзоне. Обобщение результатов, полученных другими исследователями, и собственных данных позволило авторам выделить девять различных гаплотипов для гена кальпастина овец и сделать предположение об их большей информативности по сравнению с одиночными нуклеотидными заменами (SNP) для анализа связей между генами и таким полигенным фактором, как нежность мяса (84).

Анализ последовательности гена кальпастина у древнеиранских пород, различающихся по количеству и форме жировых отложений вдоль хвостовых позвонков (тощехвостые овцы — Zel, зел; курдючные породы — Lori-Bakhtiari, лори-бахтиари; Chall, шелл; помеси со средней выраженностью курдюка — Zel-Atabay, зел-атабай), выявил четыре SNP в 5-м интроне (C24T, G62A, G65T и T69-) и три — в 6-м экзоне (с.197A>T, с.282 G>T и с.296 C>G) (78). Все три полиморфизма в 6-м экзоне были миссенс-мутациями, которые приводили к замене глицина на лейцин (Gln/Leu в позиции 66), глутамина на аспарагин (Glu/Asp в позиции 94) и пролина на аргинин (Pro/Arg в позиции 99). Авторы предположили, что аминокислотные замены могут влиять на физико-химические свойства белка CAST, включая гидрофобность, амфифильность, суммарный заряд и активность Ca²⁺-каналов. В общей сложности выявлены восемь гаплотипов (*CAST-1*, *CAST-2*, *CAST-3*, *CAST-4*, *CAST-6*, *CAST-8*, *CAST-10*, *CAST-11*), при этом *CAST-1* и *CAST-2* встречались с частотой 0,365 и 0,295, ранее не описанный гаплотип *CAST-8* — с частотой 0,129. Наиболее высокая гетерозиготность (0,802) по исследованным гаплотипам установлена в породе лори-бахтиари. Различия по частоте *CAST-10* и *CAST-8* между курдючной породой лори-бахтиари и тощехвостой зел были высокодостоверны ($p < 0,001$), что указывает на возможность использования этих гаплотипов как генетических маркеров при изучении специфичности пород (79). Изучение полиморфизма 1-го экзона гена кальпастина овец курдючной породы (Kurdi) с применением PCR-ISSR позволило выявить генотипы *aa*, *ab* и *ac*, встречающиеся с частотой соответственно 0,55; 0,32 и 0,13. При этом среднесуточный прирост живой массы у ягнят с генотипом *ab* составил 215,2 г, что было достоверно больше, чем для генотипов *aa* (204,9 г, $p < 0,05$) и *ac* (172,6 г, $p < 0,01$) (85). Сообщается о связи генотипов по *CAST* с интенсивностью роста молодняка овец, прежде всего за счет большего увеличения мышечной массы (86-88).

Таким образом, объем выполняемых исследований указывает на возросший интерес к поиску генов-кандидатов, маркирующих мясную продуктивность у овец, и использованию методов геномного редактирования для получения животных с выраженным эффектом увеличения мышечной массы. В этой связи гены миостатина, кальпаина и кальпастина пер-

спективны для дальнейшего изучения у разных пород, разработки надежных ДНК-тестов и их применения для генотипирования животных как обязательного приема в селекционных программах.

¹ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет,

355017 Россия, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12,
e-mail: rector@stgau.ru, rcvm@yandex.ru;

²Всероссийский НИИ овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр,

355017 Россия, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 15,
e-mail: m_selin@mail.ru ✉, velikii-1@yandex.ru

Поступила в редакцию
25 июня 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 6, pp. 1107-1119

GENETIC MARKERS OF MEAT PRODUCTIVITY OF SHEEP (*Ovis aries* L.). I. MYOSTATIN, CALPAIN, CALPASTATIN (review)

V.I. Trukhachev¹, M.I. Selionova², A.Yu. Krivoruchko¹, A.M.M. Aibasov²

¹Stavropol State Agrarian University, 12, Zootechnicheskii per., Stavropol, 355017 Russia, e-mail rector@stgau.ru, rcvm@yandex.ru;

²All-Russian Research Institute of sheep and goat breeding – branch of the North Caucasus federal agricultural Research Center, 15, Zootechnicheskii per., Stavropol, 355017 Russia, e-mail m_selin@mail.ru (✉ corresponding author), velikii-1@yandex.ru

ORCID:

Trukhachev V.I. orcid.org/0000-0003-4676-5407

Krivoruchko A.Yu. orcid.org/0000-0003-0130-3639

Selionova M.I. orcid.org/0000-0002-9501-8080

Aibasov A.M.M. orcid.org/0000-0002-3704-3210

The authors declare no conflict of interests

Received June 25, 2017

doi: 10.15389/agrobiologia.2018.6.1107eng

Abstract

The study of genetic and biochemical bases of phenotypic polymorphism that determine meat productivity of agricultural animals is relevant for animal breeding. Breeders of USA, Europe and Australia use genes associated with quantitative and qualitative traits of meat cattle, such as *CAPN* and *CAST* (calpactin and calpain cascade), *MSTN* (myostatin), *GDF5* (growth differentiating factor), *TG5* (thyroglobulin), *LEP* (leptin), *FABP4* (protein binding fatty acids) in selection programs (A.V. Eenennaam, 2006; Y.F. Liu et al., 2010; U. Singha et al., 2014; A.Ciepłoch et al., 2017). The main trend in the development of sheep breeding in recent decades throughout the world is a steady growth in mutton production, which determines an increase in the proportion of specialized meat breeds and increasingly growing requirements to parameters of meat productivity of meat sheep and meat wool sheep (A.M. Holmanov et al., 2015; M.I. Selionova, 2015). In this regard, search for candidate genes associated with these parameters is given more attention (D.W. Pethick et al., 2014). The presented review summarizes data on several factors which affect meat productivity in sheep. First, myostatin biological activity, gene structure and effect on the indices of sheep meat productivity are under consideration. Myostatin gene located on chromosome 2 and includes three exons and two introns is highly polymorphic (J.G. Hickford et al., 2010; M.R. Ansary, 2011; H. Han et al., 2013). Its mutations g+6723G>A and g+2449G>C have positive effects on the development of muscles and lead to a significant increase in meat with a decrease in fat content in the carcass (A. Clop et al., 2006; P.L. Johnson et al., 2009; I.A. Boman et al., 2010; A.Y. Masri et al., 2011; M. Hope et al., 2013; J. Wang et al., 2016). Another factor determining meat productivity in sheep is a proteolytic calpain-calpastatin system (CCS) (D.E. Goll et al., 2003; H.Y. Chung, 2003). Calpastatin gene is located on chromosome 5 and includes 4 exons and 3 introns (B.R. Palmer, 1998). Calpain and calpastatin genes are presented by a variety of alleles, which differ in the frequency in different breeds (F.E. Shahroudi et al., 2006; S.O. Byun et al., 2009; M.A. Azari et al., 2012; G. Shahabodin et al., 2012; R.R. Arora et al., 2014; N. Shahram et al., 2014; N.S. Kumar et al., 2015). There is a relationship between point mutations in *CAPN* gene and fatty hips, kidneys, heart and a significant association of these mutations with lower fat deposition in the carcass. Intensity of growth rate in sheep young is primarily due to a greater increase in muscular weight which also correlates with *CAST* gene (M.R. Nassiry et al., 2006; A. Mahdavi Mamaghani et al., 2008; M. Tahmoorespur et al., 2012; Q. Fang et al., 2013). These results testify to expedience for myostatin, calpain and calpastatin genes typing in breeding genotypes with higher meat productivity.

Keywords: *Ovis aries* L., sheep, meat productivity, myostatin, *MSTN*, calpain, *CAPN*, cal-

REFERENCES

1. Zinov'eva N.A., Kostyunina O.V., Gladyr' E.A., Bannikova A.D., Kharzinova V.R., Larionova P.V., Shavyrina K.M., Ernst L.K. *Zootekhniya*, 2013, 9: 5-7 (in Russ.).
2. VanRaden P.M., Sullivan P.G. International genomic evaluation methods for dairy cattle. *Genet. Sel. Evol.*, 2010, 42: 7 (doi: 10.1186/1297-9686-42-7).
3. Eenennaam A.V. Marker-assisted selection in beef cattle. University of California department of animal science. 2006. Available https://www.agrireseau.net/bovinsboucherie/documents/Marker_Assisted_Selection_in_Beef_Cattle.pdf. Accessed January 16, 2017.
4. Liu Y.F., Zan L.S., Li K., Zhao S.P., Xin Y.P., Lin Q., Tian W.Q., Wang Z.W. A novel polymorphism of GDF5 gene and its association with body measurement traits in *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds. *Mol. Biol. Rep.*, 2010, 37(1): 429-434 (doi: 10.1007/s11033-009-9604-5).
5. Singha U., Deba R., Alythodia R.R., Alexa R., Kumara S., Chakraborty S., Dhamac K., Sharma A. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 2014, 6(2): 49-58 (doi: 10.1016/j.bgm.2014.03.001).
6. Bellinge R.H., Liberles D.A., Iaschi S.P., O'Brien P.A., Tay G.K. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Anim. Genet.*, 2005, 36(1): 1-6 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2004.01229.x).
7. Selionova M.I. *Informatsionnyi byulleten' Natsional'nogo soyuza ovtsevodov*, 2015, 2(10): 47-53 (in Russ.).
8. Kholmanov A.M., Dankvert S.A., Osadchaya O.Yu. *Ovtsy, kozy, sherstyanoe delo*, 2015, 4: 15-20 (in Russ.).
9. Mortimer S.I., Werf J.H.J., Jacob R.H., Hopkins D.L., Pannier L., Pearce K.L., Gardner G.E., Warner R.D., Geesink G.H., Edwards J.E.H., Ponnampalam E.N., Ball A.J., Gilmour A.R., Pethick D.W. Genetic parameters for meat quality traits of Australian lamb meat. *Meat Sci.*, 2014, 96(2): 1016-1024 (doi: 10.1016/j.meatsci.2013.09.007).
10. McRae A.F., Bishop S.C., Walling G.A., Wilson A.D., Visscher P.M. Mapping of multiple quantitative trait loci for growth and carcass traits in a complex commercial sheep pedigree. *Anim. Sci.*, 2005, 80(2): 135-141 (doi: 10.1079/ASC41040135).
11. Builov S.V., Erokhin A.I., Semenov S.I., U'lyanov A.N., Khamitsaev R.S. *Razvedenie polutontkorunnykh myasosherstnykh ovets* [Breeding of half-fine wool meat sheep]. Moscow, 1981 (in Russ.).
12. Yan J.X., Harry R.A., Wait R., Welson S.Y., Emery P.W., Preedy V.R., Dunn M.J. Separation and identification of rat skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2001, 1(3): 424-434 (doi: 10.1002/1615-9861(200103)1:3<424::AID-PROT424>3.0.CO;2-Y).
13. MacIntosh B.R., Gardiner P.F., McComas A.J. *Skeletal muscle. Form and function*. Human Kinetics, Champaign, 2006.
14. Byrne K., Vuocolo T., Gondro, C., White J.D., Cockett N.E., Hadfield T., Bidwell C.A., Waddell J.N., Tellam R.L. A gene network switch enhances the oxidative capacity of ovine skeletal muscle during late fetal development. *BMC Genomics*, 2010, 11: 378 (doi: 10.1186/1471-2164-11-378).
15. Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibe B., Bouix J., Caiment F., Elsen J.M., Eychenne F., Larzu, C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C., Georges M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.*, 2006, 38: 813-818 (doi: 10.1038/ng1810).
16. Zhang C., Liu Y., Xu D., Wen Q., Li X., Zhang W., Yang L. Polymorphisms of myostatin gene (MSTN) in four goat breeds and their effects on Boer goat growth performance. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, 39(3): 3081-3087 (doi: 10.1007/s11033-011-1071-0).
17. Grobet L., Martin L.J., Poncet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Menissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.*, 1997, 17: 71-74 (doi: 10.1038/ng0997-71).
18. McPherron A.C., Lee S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *PNAS USA*, 1997, 94(23): 12457-12461 (doi: 10.1073/pnas.94.23.12457).
19. Stinckens A., Georges M., Buys N. Mutations in the myostatin gene leading to hyper muscularity in mammals: indications for a similar mechanism in fish? *Anim. Genet.*, 2011, 42(3): 229-234 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02144.x).
20. Mosher D.S., Quignon P., Bustamante C.D., Sutter N.B., Mellersh C.S., Parker H.G., Osterander E.A. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.*, 2007, 3(5): e79 (doi: 10.1371/journal.pgen.0030079).
21. Miar Y., Salehi A., Kolbehdari D., Aleyasin S.A. Application of myostatin in sheep breeding

- programs: a review. *Molecular Biology Research Communications*, 2014, 3(1): 33-43.
22. Mirhoseini S., Zare J. The role of myostatin on growth and carcass traits and its application in animal breeding. *Life Sci. J.*, 2012, 9: 2353-2357.
 23. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 1997, 387: 83-90 (doi: 10.1038/387083a0).
 24. Kambadur R., Sharma M., Smith T.P.L., Bass J.J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue Cattle. *Genome Res.*, 1997, 7: 910-915 (doi: 10.1101/gr.7.9.910).
 25. Dall'Olivo S., Fontanesi L., Nanni Costa L., Tassinari M., Minieri L., Falaschini A. Analysis of horse myostatin gene and identification of single nucleotide polymorphisms in breeds of different morphological types. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 2010: Article ID 542945 (doi: 10.1155/2010/542945).
 26. Gong Y.F., Li X.L., Liu Z.Z., Jin X.M., Zhou R.Y., Li L.H., Zhang Q. SNP detection and haplotype analysis in partial sequence of MSTN gene in sheep. *Russian Journal of Genetics*, 2009, 45: 1454 (doi: 10.1134/S1022795409120084).
 27. Han J.R.H., Forrest J.G., Hickford H. Genetic variations in the myostatin gene (MSTN) in New Zealand sheep breeds. *Mol. Biol. Rep.*, 2013, 40(11): 6379-6384 (doi: 10.1007/s11033-013-2752-7).
 28. Trukhachev V.I., Krivoruchko A.Yu., Skripkin V.S., Yatsyk O.A. *Vestnik APK Stavropol'ya*, 2016, 2(22): 58-65 (in Russ.).
 29. Hickford J.G., Forrest R.H., Zhou H., Fang Q., Han J., Frampton C.M., Horrell A.L. Polymorphisms in the ovine myostatin gene (MSTN) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep. *Anim. Genet.*, 2010, 41(1): 64-72 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01965.x).
 30. Sahu A.R., Jeichitra V., Rajendran R., Raja A. Polymorphism in exon 3 of myostatin (MSTN) gene and its association with growth traits in Indian sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 2017, 149: 81-84 (doi: 10.1016/j.smallrumres.2017.01.009).
 31. Trukhachev V., Belyaev V., Kvochko A., Kulichenko A., Kovalev D., Pisarenko S., Volynkina A., Selionova M., Aybazov M., Shumaenko S., Omarov A., Mamontova T., Golovanova N., Yatsyk O., Krivoruchko A. Myostatin gene (MSTN) polymorphism with a negative effect on meat productivity in Dzhalginsky Merino sheep breed. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 2015, 4(2): 191-199.
 32. Lee S.J., McPherron A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS USA*, 2001, 98(16): 9306-9311 (doi: 10.1073/pnas.151270098).
 33. Casas E., Shackelford S.D., Keele J.W., Stone R.T., Kappes S.M., Koohmaraie M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.*, 2000, 78(3): 560-569.
 34. Jeanplong F., Sharma M., Somers W.G., Bass J.J., Kambadur R. Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. *Mol. Cell. Biochem.*, 2001, 220(1-2): 31-37 (doi: 10.1023/A:1010801511963).
 35. Shishkin S.S. *Uspekhi biologicheskoi khimii*, 2004, 44: 209-262 (in Russ.).
 36. Kijas J.W., McCulloch R., Edwards J.E.H., Oddy V.H., Lee S.H., Van der Werf J. Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the Ovine GDF8 locus. *BMC Genetics*, 2007, 8: 80 (doi: 10.1186/1471-2156-8-80).
 37. Tellam R.L., Noelle E., Cockett N.E., Vuocolo T., Bidwell C.A. Genes contributing to genetic variation of muscling in sheep. *Frontiers in Genetics*, 2012, 3: 164 (doi: 10.3389/fgene.2012.00164).
 38. Johnston SE., Beraldi D., McRae A.F., Pemberton J.M., Slate J. Horn type and horn length genes map to the same chromosomal region in Soay sheep. *Heredity*, 2010, 104: 196-205 (doi: 10.1038/hdy.2009.109).
 39. Hennebry A., Berry C., Siriett V., O'Callaghan P., Chau L., Watson T., Sharma M., Kambadur R. Myostatin regulates fiber type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *Am. J. Physiol.-Cell Ph.*, 2009, 296(3): C525-C534 (doi: 10.1152/ajpcell.00259.2007).
 40. Liu C., Li W., Zhang X., Zhang N., He S., Huang J., Ge Y., Liu M. Knockdown of endogenous myostatin promotes sheep myoblast proliferation. *In Vitro Cell. Dev.-An.*, 2014, 50(2): 94-102 (doi: 10.1007/s11626-013-9689-y).
 41. Hu S., Ni W., Sai W., Zi H., Qiao J., Wang P., Sheng J., Chen C. Knockdown of myostatin expression by RNAi enhances muscle growth in transgenic sheep. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e58521 (doi: 10.1371/journal.pone.0058521).
 42. Zhao X., Ni W., Chen C., Sai W., Qiao J., Sheng J., Zhang H., Li G., Wang D., Hu S. Targeted editing of myostatin gene in sheep by transcription activator-like effector nucleases. *Asian-Australas. J. Anim.*, 2016, 29(3): 413-418 (doi: 10.5713/ajas.15.0041).
 43. Carlson D.F., Tan W., Lillico S.G., Stverakova D., Proudfoot C., Christian M., Voytas D.F., Long C.R., Whitelaw C.B.A., Fahrenkrug S.C. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *PNAS*, 2012, 109: 17382-17387 (doi: 10.1073/pnas.1211446109).
 44. Proudfoot C., Carlson D.F., Huddart R., Long C.R., Pryor J.H., King T.J., Lillico S.G., Mileham A.J., McLaren D.G., Whitelaw C. Bruce A., Fahrenkrug S.C. Genome edited sheep

- and cattle. *Transgenic Res.*, 2015, 24(1): 147-153 (doi: 10.1007/s11248-014-9832-x).
45. Crispo M., Mulet A., Tesson L., Barrera N., Cuadro F., Santos-Neto P., Nguyen T., Cré-néguy A., Brussels L., Anegyn I., Menchaca A. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0136690 (doi: 10.1371/journal.pone.0136690).
 46. Sawatari E., Seki R., Adachi T., Hashimoto H.U.S., Wakamatsu Y., Nakata T., Kinoshita M. Overexpression of the dominant-negative form of myostatin results in doubling of muscle fiber number in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Comp. Biochem. Phys. A*, 2010, 155(2): 183-189 (doi: 10.1016/j.cbpa.2009.10.030).
 47. Lee C.Y., Hu S.Y., Gong H.Y., Chen M.H.C., Lu J.K., Wu J.L. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 2009, 387(4): 766-771 (doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.110).
 48. Lee S.J. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS ONE*, 2007, 2: e789 (doi: 10.1371/journal.pone.0000789).
 49. Haidet A., Rizo L., Handy C., Umapathi P., Eagle A., Shilling C., Boue D., Martin P., Sahenk Z., Mendell J., Kaspar B. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *PNAS USA*, 2008, 105(11): 4318-4322 (doi: 10.1073/pnas.0709144105).
 50. Lee S.J., McPherron A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS USA*, 2001, 98(16): 9306-9311 (doi: 10.1073/pnas.151270098).
 51. Nishi M., Yasue A., Nishimatu S., Nohno T., Yamaoka T., Itakura M., Moriyama K., Ohuchi H., Noji S. A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 2002, 293(1): 247-251 (doi: 10.1016/S0006-291X(02)00209-7).
 52. Johnson P.L., Dodds K.G., Bain W.E., Greer G.J., McLean N.J., McLaren R.J., Gallo-way S.M., Stijn T.C., McEwan J.C. Investigations into the GDF8 g+6723G-A polymorphism in New Zealand Texel sheep. *J. Anim. Sci.*, 2009, 87: 1856-1864 (doi: 10.2527/jas.2008-1508).
 53. Masri A.Y., Lambe N.R., Macfarlane J.M., Brotherstone S., Haresign W., Bunge L. Evaluating the effects of the c.*1232G>A mutation and TM-QTL in Texel x Welsh Mountain lambs using ultrasound and video image analyses. *Small Rumin. Res.*, 2011, 99(2-3): 99-109 (doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.03.047).
 54. Masri A.Y., Lamb N.R., Macfarlan J.M., Brotherston S., Haresi W., Bunge L. Evaluating the effects of a single copy of a mutation in the myostatin gene (c.*1232G>A) on carcass traits in crossbred lambs. *Meat Sci.*, 2011, 87(4): 412-418 (doi: 10.1016/j.meatsci.2010.11.019).
 55. Hadjipavlou G., Matika O., Clop A., Bishop S.C. Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (GDF8) gene have significant association with muscle depth of commercial Charol-lais sheep. *Anim. Genet.*, 2008, 39(4): 346-353 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2008.01734.x).
 56. Hope M., Haynes F., Oddy H., Koohmaraie M., Al-Owaimer A., Geesink G. The effects of the myostatin g+6723G>A mutation on carcass and meat quality of lamb. *Meat Sci.*, 2013, 95(1): 118-122 (doi: 10.1016/j.meatsci.2013.03.029).
 57. Wang J., Zhou H., Hu J., Li S., Luo Y., Hickford J.G. Two single nucleotide polymorphisms in the promoter of the ovine myostatin gene (MSTN) and their effect on growth and carcass muscle traits in New Zealand Romney sheep. *J. Anim. Breed. Genet.*, 2016, 133(3): 219-226 (doi: 10.1111/jbg.12171).
 58. Boman I.A., Klemetsdal G., Nafstad O., Blichfeldt T., Vage D.I. Impact of two myostatin (MSTN) mutations on weight gain and lamb carcass classification in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). *Genet. Sel. Evol.*, 2010, 42: 4 (doi: 10.1186/1297-9686-42-4).
 59. Farhadian M., Hashemi A. Molecular characterization and phylogeny based analysis of intron i sequence of myostatin (MSTN) gene in Iranian Makuei sheep breed. *Ann. Anim. Sci.*, 2016, 16(4): 1007-1018 (doi: 10.1515/aoas-2016-0013).
 60. Ansary M., Tahmoorespur M., Nassiry M., Taheri A., Valeh M. Polymorphism in intron-1 of myostatin gene and its association with estimated breeding values of growth traits in Baluchi sheep. *Indian J. Anim. Sci.*, 2011, 81(8): 849-852.
 61. Bouyer C., Forestier L., Renand G., Oulmouden A. Deep intronic mutation and pseudo exon activation as a novel muscular hypertrophy modifier in cattle. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e97399 (doi: 10.1371/journal.pone.0097399).
 62. Ciepluch A., Rutkowska K., Oprz dek J., Poławska E. Genetic disorders in beef cattle: a review. *Genes Genom.*, 2017, 39(5): 461-471 (doi: 10.1007/s13258-017-0525-8).
 63. Palmer B.R., Morton J.D., Roberts N., Ilian M.A., Bickerstaffe R. Marker-assisted selection for meat quality and the ovine calpastatin gene. *Proc. New Zeal. Soc. An.*, 1999, 59: 266-268.
 64. Sensky P.L., Parr T., Bardsley R.G., Buttery P.J. *Postmortem proteolysis in muscle and meat quality and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, variable activity of the calpain proteolytic system.* Meat and Livestock Commission, Loughborough, UK, 2000.
 65. Koohmaraie M. The role of Ca²⁺-dependent proteases (calpain) in post-mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 1992, 74(3): 239-245 (doi: 10.1016/0300-9084(92)90122-U).
 66. Ma H., Yang H.Q., Takano E., Hatanaka M., Maki M. Amino terminal conserved region in

- proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interaction with calmodulin-like domain of the proteinase. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269(39): 24430-24436.
67. Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. The calpain system. *Physiol. Rev.*, 2003, 83(3): 731-801 (doi: 10.1152/physrev.00029.2002).
 68. Pomponio L., Ertbjerg P. The effect of temperature on the activity of μ - and m-calpain and calpastatin during post-mortem storage of porcine longissimus muscle. *Meat Sci.*, 2012, 91(1): 50-55 (doi: 10.1016/j.meatsci.2011.12.005).
 69. Kumar N.S., Jayashankar M.R., Ramakrishnappa N., Nagaraja C.S., Fairuze N., Satyanarayana K. Genetic polymorphism of ovine calpain gene in bandur sheep. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 2015, 4(3): 804-812.
 70. Chung H.Y., Davis M.E., Hines H.C. A DNA polymorphism of the bovine calpastatin gene detected by SSCP analysis. *Anim. Genet.*, 1999, 30(1): 80-81 (doi: 10.1046/j.1365-2052.1999.00323-20.x).
 71. Azari M.A., Dehnavi E., Yousefi S., Shahmohamdi L. Polymorphism of Calpastatin, Calpain and myostatin genes in native Dalagh sheep in Iran. *Slovak Journal of Animal Science*, 2012, 45(1): 1-6.
 72. Shahroudi F.E., Nassiry M.R., Valizadh R., Moussavi A.H., Tahmoorespour M., Ghiasi H. Genetic polymorphism at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2006, 4(2): 117-122.
 73. Nassiry M.R., Shahroudi F.E., Tahmoorespour M., Javadmanesh A. Genetic variability and population structure in beta-lactoglobulin, calpastatin and calpain loci in Iranian Kurdi sheep. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, 10(7): 1062-1067 (doi: 10.3923/pjbs.2007.1062.1067).
 74. Arora R.R., Yadav H.S., Yadav D.K. Identification of novel single nucleotide polymorphisms in candidate genes for mutton quality in Indian sheep. *Animal Molecular Breeding*, 2014, 4(1): 1-5 (doi: 10.5376/amb.2014.04.0001).
 75. Lonergan S.M., Ernst C.W., Bishop M.D., Calkins C.R., Koohmaraie M. Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. *J. Anim. Sci.*, 1995, 73(12): 3608-3612 (doi: 10.2527/1995.73123608x).
 76. Fang Q., Forrest R.H., Zhou H., Frampton C.M., Hickford J.G.H. Variation in exon 10 of the ovine calpain 3 gene (CAPN3) and its association with meat yield in New Zealand Romney sheep. *Meat Sci.*, 2013, 94(3): 388-390 (doi: 10.1016/j.meatsci.2013.03.015).
 77. Muto Y., Morton J., Palmer D. Investigation of biochemical changes of the ovine calpain 3 exon-10 polymorphism. *Mol. Cell. Probes.*, 2015, 29(6): 382-388 (doi: 10.1016/j.mcp.2015.09.002).
 78. Palmer B.R., Roberts N., Hickford J.G.H., Staffe R. Rapid communication: PCR-RFLP of MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. *J. Anim. Sci.*, 1998, 76(5): 1499-1500 (doi: 10.2527/1998.7651499x).
 79. Aali M., Moradi-Shahrabak M., Moradi-Shahrabak H., Sadeghi M. Detecting novel SNPs and breed-specific haplotypes at calpastatin gene in Iranian fat- and thin-tailed sheep breeds and their effects on protein structure. *Gene*, 2014, 537(1): 132-139 (doi: 10.1016/j.gene.2013.12.023).
 80. Shahram N., Goodarzi M. Polymorphism of candidate genes for meat production in Lori sheep. *IERI Procedia*, 2014, 8: 18-23 (doi: 10.1016/j.ieri.2014.09.004).
 81. Shahabodin G., Abbasi H.A., Irani M., Abdollahpour R., Mirhabibi S. Polymorphism investigation of calpastatin gene in Zel sheep population of Iran by PCR-RFLP method. *Afr. J. Biotechnol.*, 2012, 11(13): 3211-3214 (doi: 10.5897/AJB11.3256).
 82. Suleman M., Khan S.U., Riaz M.N., Yousaf M., Shah A., Ishaq R., Ghafoor A. Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds. *Afr. J. Biotechnol.*, 2012, 11(47): 10655-10660 (doi: 10.5897/AJB11.2478).
 83. Zhou H., Hickford J.G., Gong H. Polymorphism of the ovine calpastatin gene. *Mol. Cell. Probes.*, 2007, 21(3): 242-244 (doi: 10.1016/j.mcp.2006.10.004).
 84. Byun S.O., Zhou H., Hickford J.G.H. Haplotypic diversity within the ovine calpastatin (CAST) gene. *Mol. Biotechnol.*, 2009, 41(2): 133-137 (doi: 10.1007/s12033-008-9103-2).
 85. Nassiry M.R., Tahmoorespour M., Javadmanesh A., Soltani M., Foroutani Far S. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. *Iran. J. Biotechnol.*, 2006, 4(3): 188-192.
 86. Mahdavi Mamaghani A., Shoja J., Pirani N., Elyasi Gh. Comparing polymorphism of calpastatin gene using PCR-SSCP method in Ghezel sheep and Sarabi Cows. *Animal Science Research Journal*, 2008, 19(1): 2-10.
 87. Tahmoorespur M., Ahmadi H. A neural network model to describe weight gain of sheep from genes polymorphism, birth weight and birth type. *Livest. Sci.*, 2012, 148(3): 221-226 (doi: 10.1016/j.livsci.2012.06.008).
 88. Pethick D.W., Ball A.J., Banks R.G., Gardner G.E., Rowe J.B., Jacob R.H. Translating science into the next generation meat quality program for Australian lamb. *Meat Sci.*, 2014, 96(2): 1013-1015 (doi: 10.1016/j.meatsci.2013.09.011).