Молекулярная структура генома

УДК 636.32/.38:575.1:577.2

doi: 10.15389/agrobiology.2021.2.279rus

ПОИСК ГЕНОМНЫХ ВАРИАНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЖИВОЙ МАССОЙ У ОВЕЦ, НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ВЫСОКОПЛОТНЫХ SNP ГЕНОТИПОВ*

Т.Е. ДЕНИСКОВА¹✉, С.Н. ПЕТРОВ¹, А.А. СЕРМЯГИН¹, А.В. ДОЦЕВ¹,
М.С. ФОРНАРА¹, Н. REYER², К. WIMMERS², В.А. БАГИРОВ¹,
G. BREM^{1, 3}, Н.А. ЗИНОВЬЕВА¹

Живая масса — один из важнейших экономически полезных признаков, характеризующийся сложным наследованием, поэтому поиск генетических механизмов, влияющих на ее формирование, вызывает повышенный научный интерес. В настоящей работе впервые представлены результаты анализа полногеномных ассоциаций в ресурсной популяции овец (*Ovis aries*) возвратных кроссов (романовская × катадин) × романовская, живая масса которых фиксировалась в возрастной динамике, а SNP-профили были получены с помощью высокоплотного ДНК-чипа. В результате были идентифицированы 38 SNP, достоверно ассоциированных с живой массой ($p < 0,00001$), и функциональные гены-кандидаты, влияющие на рост скелетных мышц, формирование костного каркаса, липидный и углеводный метаболизмы. Кроме того, показаны возрастные изменения в составе достоверно значимых SNP. Нашей целью был поиск геномных вариантов, оказывающих влияние на живую массу у овец возвратных кроссов (романовская × катадин) × романовская из ресурсной популяции в разные возрастные периоды. Исследования проводили на 95 овцах возвратных кроссов (романовская × катадин) × романовская из ресурсной (кроссбредной) популяции в 2018-2021 годах в ФГБНУ ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста. У животных возвратных кроссов были взяты ушные выщипы для экстракции геномной ДНК, которая проводилась с использованием наборов ДНК-Экстрен-2 (ООО «Синтол», Россия). Животные были генотипированы с применением ДНК-чипа высокой плотности Ovine Infinium® HD SNP BeadChip («Illumina, Inc.», США), содержащего ~ 600 тыс. SNP-маркеров. Живую массу измеряли в возрасте 6 (ЖМ6), 42 (ЖМ42), 90 (ЖМ90), 180 (ЖМ180) и 270 сут (ЖМ270). Для выявления геномных ассоциаций с живой массой применяли регрессионный анализ, реализованный в PLINK 1.90 (--assoc --adjust --qt-means). Для подтверждения достоверного влияния SNP и определения значимых регионов в геноме исследуемых овец был выполнен тест для проверки нулевых гипотез по Бонферрони при пороговом значении $p < 1,09 \times 10^{-7}$, $0,05/459868$. Поиск генов-кандидатов, локализованных в области идентифицированных SNP, осуществлялся с использованием инструмента VEP (Ensembl Variant Effect Predictor) Ensembl genome browser 103 (<https://www.ensembl.org/index.html>). После проведения контроля качества 459868 SNP были отобраны для полногеномных ассоциативных исследований (GWAS). Средние показатели живой массы в исследуемой выборке овец составили $3,28 \pm 0,07$, $8,03 \pm 0,21$, $13,74 \pm 0,39$, $20,19 \pm 0,51$ и $22,51 \pm 0,50$ кг соответственно в возрасте 6, 42, 90, 180 и 270 сут. Установлено, что в разные возрастные периоды набор SNP, ассоциированный с интегральным показателем скорости роста, живой массой животного, был неодинаковым. Так, из 38 идентифицированных SNP 18 SNP, расположенные на OAR2, OAR4, OAR9 и OAR15, были достоверно ассоциированы с ЖМ6 ($p < 0,00001$), 3 SNP на OAR6 и OAR11 — с ЖМ42 ($p < 0,00001$), 2 SNP на OAR10 и OAR19 — с ЖМ90 ($p < 0,00001$), 6 SNP на OAR1 и OAR13 — с ЖМ180 ($p < 0,00001$), 6 SNP на OAR1 — с ЖМ270 ($p < 0,00001$). На OAR1, OAR2, OAR4 и OAR5 были обнаружены блоки из 3-5 SNP. Уровни достоверности у шести SNP — oar3_OAR4_87887519 ($p < 7,13 \times 10^{-8}$), oar3_OAR4_87889243 ($p < 1,51 \times 10^{-7}$), oar3_OAR9_89145258 ($p < 4,95 \times 10^{-7}$), oar3_OAR1_192662599 ($p < 4,79 \times 10^{-7}$), OAR1_208070059.1 ($p < 4,79 \times 10^{-7}$) и oar3_OAR13_31446454 ($p < 6,84 \times 10^{-7}$) превышали пороговое значение для GWAS ($p < 1,09 \times 10^{-7}$). Помимо признанных генов-кандидатов, ассоциированных с живой массой у овец, нами были идентифицированы новые гены-кандидаты, о влиянии которых на этот показатель ранее не сообщалось. Функциональная аннотация идентифицированных кандидатов выявила наличие генов, влияющих на рост скелетных мышц, формирование костного каркаса, липидный и углеводный метаболизм. Полученные данные будут полезны для разработки программ маркерной и геномной селекции в овцеводстве.

Ключевые слова: домашние овцы, ресурсная популяция, SNP-маркеры, ДНК-чипы, GWAS, живая масса, гены-кандидаты.

* При проведении исследований использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Исследование проведено при поддержке РФФИ, проект № 17-29-08015.

Постнатальный рост организма животного — результат сложных взаимодействий между генетическими факторами, потреблением питательных веществ и функциями эндокринной системы (1). Углубление знаний о закономерностях роста и развития сельскохозяйственных животных имеет практическое значение для повышения их продуктивности (2, 3). Живая масса — один из важнейших экономически полезных признаков, характеризующийся сложным наследованием, поэтому поиск генетических механизмов, влияющих на ее формирование, вызывает повышенный научный интерес (4, 5).

Основываясь на результатах полногеномных ассоциативных исследований (genome-wide association study, GWAS) на мясных овцах с применением ДНК-чипа средней плотности Illumina OvineSNP50 («Illumina, Inc.», США), L. Zhang с соавт. (6) идентифицировали гены *GRM1*, *MBD5*, *UBR2*, *RPL7* и *SMC2* в качестве потенциальных кандидатов интенсивности роста ягнят в послеотъемный период. Поиск полногеномных ассоциаций на 1743 овцах выявил достоверно ассоциированный SNP (single nucleotide polymorphism) OAR6_41936490 на 6-й хромосоме OAR6 (7). В области, прилегающей к этому SNP, были локализованы три значимых гена-кандидата (*LAP3*, *NCAPG* и *LCORL*), ассоциированные с признаками роста, строением каркаса, размером тела и живой массой у овец.

O. Matika с соавт. (8) провели полногеномный анализ ассоциаций на 600 ягнятах породы шотландская черноголовая. Фенотипические показатели, включая плотность костей, количество мышечной и жировой ткани, были получены с помощью компьютерной томографии, а генотипирование проводилось с использованием ДНК-чипа средней плотности Illumina OvineSNP50. На OAR6 был выявлен геномный регион, достоверно ассоциированный с массой костей ($p < 5,55 \times 10^{-8}$) и влияющий на плотность мышечных волокон и содержание жира. Кроме того, были идентифицированы QTL на OAR1, OAR3 и OAR24, отвечающие за развитие мышечных, жировых и костных компонентов туловища у ягнят. M. Ghasemi с соавт. (9) проводили поиск геномных ассоциаций с живой массой при рождении у 130 овец породы лори-бахтиари (Lori-Bakhtiari) с использованием 41323 SNP и идентифицировали потенциальные гены-кандидаты *RAB6B*, *Tf serotransferrin* и *GIGYF2* на OAR1. Z. Lu с соавт. (10) на китайских тонкорунных овцах применили технологию ре-секвенирования для поиска ассоциаций с живой массой при рождении, при отъеме в возрасте 3,5 мес, в возрасте 12 и 30 мес.

В регионах, прилегающих к 113 SNP, которые достигают порогового уровня значимости полногеномных ассоциаций ($p < 0,05$), были идентифицированы и аннотированы гены *AADACL3*, *VGF*, *NPC1* и *SERPINA12*, влияющие на развитие скелетных мышц и метаболизм липидов. Четыре гена, в том числе вовлеченный в регуляцию роста скелетных мышц ген *MTPN*, были предложены в качестве потенциальных кандидатов, ассоциированных с живой массой овец породы балучи (Baluchi) в возрасте 8 мес (11). Y. Cao с соавт. (12) фиксировали живую массу при рождении, при отбивке от маток, в полугодовом и годовом возрасте в двух поколениях двух популяций овец породы Ху (Hu). GWAS, проведенный на основе SNP-профилей средней плотности, и верификация выявленных полиморфизмов показали, что два SNP (OARX_76354330.1 и s64890.1) достоверно ассоциированы с живой массой ($p < 0,05$). С использованием модели множественных признаков были идентифицированы восемь новых локусов, расположенных вблизи генов *FAM3C* и *WNT16*, которые ассоциированы с мясной продуктивностью овец (13).

Следует отметить, что исследования по картированию QTL могут приводить и к выявлению ложноположительных ассоциаций. Считается, что уменьшение частоты ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) и повышение точности картирования QTL может быть достигнуто при использовании специально созданных ресурсных популяций сельскохозяйственных животных (возвратные кроссы и F₂) (14), полученных от скрещивания родительских линий (или пород), которые имеют высокодигергентные фенотипы по интенсивности роста и живой массе. Кроме того, в ресурсной популяции возможно создать надежную базу фенотипов за счет понижения значимости человеческого фактора (в случае, если промеры или иные фенотипические показатели фиксирует один и тот же исполнитель).

В настоящей работе впервые представлены результаты анализа полногеномных ассоциаций в ресурсной популяции овец (*Ovis aries*) возвратных кроссов (романовская × катадин) × романовская, живая масса которых фиксировалась в возрастной динамике, а SNP-профили были получены с помощью высокоплотного ДНК-чипа. В результате идентифицированы 38 SNP, достоверно ассоциированных с живой массой ($p < 0,00001$), и функциональные гены-кандидаты, влияющие на рост скелетных мышц, формирование костного каркаса, липидный и углеводный метаболизм. Кроме того, показаны возрастные изменения в составе достоверно значимых SNP.

Нашей целью был поиск геномных вариантов, оказывающих влияние на живую массу у овец возвратных кроссов (романовская × катадин) × романовская из ресурсной популяции в разные возрастные периоды.

Методика. Исследования проводили на 95 овцах возвратных кроссов из ресурсной (кроссбредной) популяции в 2018-2021 годах. Ресурсная популяция овец входила в состав биоколлекции «Банк генетического материала домашних животных и птицы» (зарегистрирован Минобрнауки РФ, № 498808), созданной и поддерживаемой в ФГБНУ ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста.

Создание ресурсной популяции овец включало несколько этапов (15). На первом ярок романовской породы скрещивали с двумя баранами американской мясной породы катадин для получения F₁ кроссов. На втором этапе для получения возвратных кроссов (романовская × катадин) × романовская по одному баранчику F₁ от каждого барана-родоначальника скрещивали с романовскими матками, в результате чего было получено соответственно 36 и 32 потомков от каждого барана. F₁ ярок от каждого барана-родоначальника скрещивали с двумя баранами романовской породы, в результате чего получили 16 и 10 потомков. То есть все возвратные кроссы по своему происхождению имели 25 % крови породы катадин и 75 % крови романовской породы.

Для экстракции геномной ДНК животных возвратных кроссов использовали ушные выщипы. ДНК выделяли с помощью наборов ДНК-Экстран-2 (ООО «Синтол», Россия). Препараты ДНК проходили контроль качества по концентрации (от 15 нг/мкл и выше, флуориметр Qubit 4.0, «Invitrogen/Life Technologies», США) и чистоте по соотношению поглощения OD₂₆₀/OD₂₈₀ (от 1,8 и выше, спектрофотометр NanoDrop8000, «Thermo Fisher Scientific», США).

Исследуемых животных генотипировали с помощью ДНК-чипа высокой плотности Ovine Infinium® HD SNP BeadChip («Illumina, Inc.», США), содержащего ~ 600 тыс. SNP-маркеров. Фильтрацию SNP-маркеров осуществляли в программе PLINK v. 1.90 (<https://www.cog-genomics.org/plink/>)

(16). SNP, имеющие частоту минорного аллеля (MAF) ниже 3 % (maf 0.03), отклоняющиеся от равновесия по Харди-Вайнбергу при $p < 10^{-6}$ (hwe 1e-6), находящиеся в неравновесии по сцеплению (indep-pairwise 50 5 0.5) и локализованные на половых хромосомах, исключались из анализа.

Живую массу измеряли с помощью платформенных весов МП 300 ВЕДА Ф-1 (50/100; 1400×700) Живой вес 12 ПМ (Московский весовой завод «МИДЛ», Россия) в возрасте 6 (ЖМ6), 42 (ЖМ42), 90 (ЖМ90), 180 (ЖМ180) и 270 сут (ЖМ270). Результаты измерений заносили в электронную базу данных в программе Microsoft Excel 2017. Рассчитывали средние арифметические значения (M), стандартные ошибки средних ($\pm SEM$), средние квадратические отклонения ($\pm \sigma$) и коэффициенты вариации (C_v , %).

Для выявления геномных ассоциаций с живой массой применяли регрессионный анализ, реализованный в PLINK 1.90 (--assoc --adjust --qt-means). Для подтверждения достоверного влияния SNP и определения значимых регионов в геноме исследуемых овец был выполнен тест для проверки нулевых гипотез по Бонферрони при пороговом значении $p < 1,09 \times 10^{-7}$, $0,05/459868$. Данные визуализировали в пакете R qqman (<https://cran.r-project.org/web/packages/qqman/vignettes/qqman.html>) (17) в программной среде R (18).

Поиск генов-кандидатов, локализованных в области идентифицированных SNP, осуществлялся с использованием инструмента VEP (Ensembl Variant Effect Predictor) (19) Ensembl genome browser 103 (<https://www.ensembl.org/index.html>, дата обращения 12.01.2021) по версии сборки генома овцы Ovis_aries.Oar_v3.1. Онтология генов была проанализирована с помощью инструмента анализа микрочипов DAVID Functional Annotation Bioinformatics (20). Поиск вероятных совпадений с известными QTL проводился с использованием базы данных Sheep Quantitative Trait Locus Database (Sheep QTLdb) (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/OA/index>, дата обращения 12.01.2021) (21).

Результаты. Средние показатели живой массы в изучаемой выборке овец представлены в таблице 1. Для этого признака была выявлена довольно высокая вариация во все возрастные периоды ($C_v = 21,69\text{--}27,86\%$).

1. Живая масса (кг) и коэффициент ее изменчивости в разные возрастные периоды у овец (*Ovis aries*) возвратных кроссов (катадин × романовская) × романовская из ресурсной популяции ($n = 95$, ФГБНУ ФНЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Московская обл., 2019–2021 годы)

Возраст	$M \pm SEM$	Min-max	C_v , %
6 сут	3,28±0,07	1,60–4,83	21,69
42 сут	8,03±0,21	3,50–13,00	25,98
90 сут	13,74±0,39	3,50–22,10	27,86
180 сут	20,19±0,51	9,93–36,80	24,53
270 сут	22,51±0,50	12,37–37,80	21,78

В результате GWAS-анализа было установлено, что в разные возрастные периоды набор SNP, ассоциированный с интегральным показателем скорости роста — живой массой, был неодинаковым (рис., табл. 2). Так, из 38 идентифицированных SNP 18 SNP, расположенных на OAR2, OAR4, OAR9 и OAR15, были достоверно ассоциированы с ЖМ6 ($p < 0,00001$), 3 SNP на OAR6 и OAR11 — с ЖМ42 ($p < 0,00001$), 2 SNP на OAR10 и OAR19 — с ЖМ90 ($p < 0,00001$), 6 SNP на OAR1 и OAR13 — с ЖМ180 ($p < 0,00001$), 6 SNP на OAR1 — с ЖМ270 ($p < 0,00001$). Кроме того, для 5 SNP, локализованных на OAR1 и OAR3, мы выявили достоверные ассоциации как с ЖМ180, так и с ЖМ270. На OAR1, OAR2, OAR4 и OAR5

были обнаружены блоки из 3-5 SNP. Нами идентифицированы шесть SNP — oar3_OAR4_87887519, oar3_OAR4_87889243, oar3_OAR9_89145258, oar3_OAR1_192662599, oar3_OAR13_31446454 и OAR1_208070059.1, у которых достоверность ассоциации превышала пороговое значение для GWAS ($p < 1,09 \times 10^{-7}$).

Результаты GWAS анализа для показателя живой массы у овец (*Ovis aries*) возвратных кроссов (катадин × романовская) × романовская из ресурсной популяции в разные возрастные периоды: А — 6 сут; Б — 42 сут; В — 90 сут; Г — 180 сут; Д — 270 сут. Верхняя горизонтальная линия — порог достоверности для полногеномных ассоциаций $-\log_{10}(p) = 1,09 \times 10^{-7}$, нижняя горизонтальная линия — порог достоверности для суггестивных ассоциаций $-\log_{10}(p) = 1,02 \times 10^{-5}$ ($n = 95$, ФГБНУ ФНЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Московская обл., 2019–2021 годы).

В возрасте 6 сут были выявлены достоверные ассоциации живой массы с SNP, находящимися внутри гена *MBD5* и в непосредственной близости от генов *ORC4* и *ACVR2A* на OAR2, которые были предложены в качестве функциональных кандидатов для постнатального роста у овец (6). Ген *MBD5* участвует в регуляции многих эндокринных функций, включая

гомеостаз глюкозы (22). Исследование, проведенное на мышах с нокаутом *MBD5*, выявило серьезную задержку роста, уменьшенный размер туловища, гипогликемию и снижение количества жира (22). Делеции в человеческом ортологе вызывают задержку развития (23) и различные пороки формирования скелета (24). То есть исследования свидетельствуют о значительной роли гена *MBD5* в регуляции раннего постнатального роста у млекопитающих. Гены *ORC4* и *ACVR2A* также участвуют в процессах роста. Мутации в гене *ORC4* вызывают задержку роста и первичную остеодиспластическую карликовость (25, 26). Ген *ACVR2A* регулирует развитие костного аппарата (27).

2. Достоверно значимые ($p < 0,00001$) SNP, ассоциированные с живой массой у овец (*Ovis aries*) возвратных кроссов (катадин × романовская) × романовская из ресурсной популяции ($n = 95$, ФГБНУ ФНЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Московская обл., 2019–2021 годы)

Показатель	OAR	Число SNP	SNP	p	Позиция	Ген
ЖМ6	2-я	1	oar3_OAR2_19100665	$5,41 \times 10^{-6}$	19100665	<i>SMC2</i>
ЖМ6	2-я	1	oar3_OAR2_30932797	$5,52 \times 10^{-6}$	30932797	<i>PTCH1</i>
ЖМ6	2-я	1	oar3_OAR2_63406327	$8,59 \times 10^{-6}$	63406327	<i>ALDH1A1</i>
ЖМ6	2-я	1	oar3_OAR2_126584456	$6,05 \times 10^{-6}$	126584456	<i>PPP1R1C*</i> , <i>PDE1A</i>
ЖМ6	2-я	5	oar3_OAR2_160277567	$6,81 \times 10^{-6}$	160277567	<i>MBD5*</i> , <i>ORC4</i> ,
			oar3_OAR2_160295110	$1,75 \times 10^{-6}$	160295110	<i>ACVR2A</i>
			oar3_OAR2_160299881	$2,50 \times 10^{-6}$	160299881	
			oar3_OAR2_160313744	$1,75 \times 10^{-6}$	160313744	
			oar3_OAR2_160316296	$1,75 \times 10^{-6}$	160316296	
ЖМ6	4-я	1	oar3_OAR4_7542218	$7,57 \times 10^{-6}$	7542218	<i>ABCA13</i>
ЖМ6	4-я	2	OAR4_24289280.1	$1,63 \times 10^{-6}$	23180261	<i>DGKB*</i>
			oar3_OAR4_23286923	$7,32 \times 10^{-6}$	23286923	
ЖМ6	4-я	3	oar3_OAR4_87887519	$7,13 \times 10^{-8}$	87887519	<i>ASB15*</i>
			oar3_OAR4_87889243	$1,51 \times 10^{-7}$	87889243	
			oar3_OAR4_87932432	$6,71 \times 10^{-5}$	87932432	
ЖМ6	9-я	1	s19680.1	$4,46 \times 10^{-6}$	86619418	<i>RIPK2</i> , <i>MMP16</i>
ЖМ6	9-я	1	oar3_OAR9_89145258	$4,95 \times 10^{-7}$	89145258	<i>ATP6VOD2*</i>
ЖМ6	15-я	1	oar3_OAR15_74862644	$7,80 \times 10^{-6}$	74862644	<i>ARHGAP1</i> , <i>F2</i>
ЖМ42	6-я	1	oar3_OAR6_103115026	$4,87 \times 10^{-6}$	103115026	<i>EVC*</i> , <i>EVC2</i>
ЖМ42	11-я	2	s58053.1	$2,49 \times 10^{-6}$	47604624	<i>SCN4A*</i> , <i>ICAM2</i>
			oar3_OAR11_47604879	$2,49 \times 10^{-6}$	47604879	
ЖМ90	10-я	1	oar3_OAR10_12704497	$1,08 \times 10^{-6}$	12704497	<i>DGKH*</i> , <i>AKAP11</i>
ЖМ90	19-я	1	oar3_OAR19_7100087	$5,95 \times 10^{-6}$	7100087	<i>CCR4</i>
ЖМ180	1-я	1	oar3_OAR1_43484960	$1,03 \times 10^{-6}$	43484960	<i>WLS</i>
ЖМ180	1-я	2	oar3_OAR1_192662599	$4,79 \times 10^{-7}$	192662599	<i>MB21D2</i>
			OAR1_208070059.1	$4,79 \times 10^{-7}$	192689940	
ЖМ180, ЖМ270	1-я	4	oar3_OAR1_204348376	$4,68 \times 10^{-6}/3,85 \times 10^{-6}$	204348376	<i>FXR1*</i>
			OAR1_220691763.1	$4,68 \times 10^{-6}/3,85 \times 10^{-6}$	204351915	
			oar3_OAR1_204368368	$4,68 \times 10^{-6}/3,85 \times 10^{-6}$	204368368	
ЖМ180, ЖМ270	1-я	1	oar3_OAR1_14039930	$6,91 \times 10^{-6}/5,38 \times 10^{-6}$	14039930	<i>HEYL</i>
ЖМ180, ЖМ270	3-я	1	oar3_OAR3_220260675	$2,86 \times 10^{-6}/3,12 \times 10^{-6}$	220260675	<i>WNT7B</i>
ЖМ180	13-я	1	oar3_OAR13_31446454	$6,84 \times 10^{-7}$	31446454	<i>MRC1*</i>
ЖМ180	13-я	1	oar3_OAR13_61039017	$7,75 \times 10^{-6}$	61039017	<i>PLAGL2</i>
ЖМ180	13-я	1	oar3_OAR13_61305745	$7,17 \times 10^{-6}$	61305745	<i>DNMT3B</i>
ЖМ270	1-я	5	oar3_OAR1_185310940	$7,76 \times 10^{-6}$	185310940	<i>PARP14*</i>
			oar3_OAR1_185317664	$2,52 \times 10^{-6}$	185317664	
ЖМ270	1-я	1	oar3_OAR1_185977490	$6,28 \times 10^{-6}$	185977490	<i>ADCY5*</i>
ЖМ270	1-я	1	oar3_OAR1_186482253	$2,52 \times 10^{-6}$	186482253	<i>MYLK*</i>

Примечание. Звездочкой выделены гены, внутри которых локализованы идентифицированные SNP; расстояние от SNP, расположенных в межгенном пространстве, до ближайших генов составляло ± 400 Кб. ЖМ6, ЖМ42, ЖМ90, ЖМ180 и ЖМ270 — соответственно живая масса в возрасте 6, 42, 90, 180 и 270 сут. OAR — хромосома. Через косую указаны значения для 180 сут и 270 сут.

Мы идентифицировали и другие известные функциональные гены-кандидаты овец. Гены *SMC2* на OAR2 и *RIPK2* на OAR9 были предложены в качестве потенциальных кандидатов, ассоциированных с живой массой и мясными качествами (6). Ген *PARP14* влияет на состав жировой ткани (28).

Ген *CCR4* входит в состав сложного комплекса, регулирующего энергетический обмен и метаболизм жирных кислот в скелетных мышцах у овец мясного типа (29).

Кроме того, мы идентифицировали гены-кандидаты признаков роста и развития, чьи функции хорошо описаны у крупного рогатого скота, в том числе гены, отвечающие за размеры и рост туловища — *PTCH1* (30), *DGKH* (31), ассоциированные с формированием мышечной ткани — *PPP1R1C*, *PDE1A* (32), *PLAGL2* (33), *DNMT3B* (34), участвующие в регуляции секреции инсулина — *DGKB* (35), липидного метаболизма — *ALDH1A1* (36), *MRC1* (37). Мутации в гене *ABCA13* вызывают серьезные нарушения в остеогенезе у крупного рогатого скота, что, вероятно, подтверждает его значимость для формирования костного аппарата (38). Ген *MB21D2* влияет на массу внутренних органов (в том числе почек) у крупного рогатого скота симментальской породы мясного типа (39).

В дополнении были найдены гены, отвечающие за признаки, прямо или косвенно связанные с показателем живой массы у млекопитающих. Так, гены *MMP16* (40) и *EVC* (41) регулируют хондрогенез, а гены *AKAP11*, *ATP6V0D2* и *WNT7B* ассоциированы с остеогенезом у молодых активно растущих млекопитающих (42-44). Гены *HACD2*, *ADCY5* и *WLS* вовлечены в регуляцию липидного обмена (45-47). Гены *ASB15*, *FXR1*, *HEYL* и *MYLK* регулируют рост скелетных мышц (48-51).

В результате проведенного GWAS-анализа мы установили, что в разные возрастные периоды различные SNP были ассоциированы с показателем живой массы в исследованной популяции овец. В своей работе Y. Cao с соавт. (12) также обнаружили, что экспрессия гена *CAPN6* значительно отличается в двуглавой мышце бедра и в длиннейшей мышце спины у овец в возрасте 60 сут и 6 мес. Более половины идентифицированных нами ассоциаций приходилось на самый ранний период онтогенеза. Вероятно, это связано с биологическими особенностями активного роста в последнюю фазу беременности и ранний постнатальный период жизни жвачных, в том числе овец. Например, третья волна активного миогенеза приходится на поздний эмбриональный или ранний постнатальный период (52), а число преадипоцитов бурой жировой ткани увеличивается до и после рождения ягнят, что особенно важно для их неонатального выживания (53).

Некоторые SNP, идентифицированные в процессе GWAS, попадали в регионы QTL, которые были обнаружены ранее другими исследователями. Так, шесть SNP (160,2-160,3 и 191,0 Мб) на OAR2 и один SNP (86,6 Мб) на OAR9 были локализованы вблизи от геномных областей, ассоциированных со среднесуточным приростом у овец (6). SNP (oar3_OAR15_74862644) на OAR15 располагался на расстоянии 400 Кб от QTL, влияющего на массу тела (74,4-74,4 Мб) (7). Кроме того, некоторые SNP попадали в регионы QTL, которые были картированы на основе микросателлитных маркеров. В частности, SNP OAR4_24289280.1 и oar3_OAR4_23286923 локализовались внутри QTL, потенциально ассоциированного с живой массой у овец на OAR4 (54), а oar3_OAR1_204348376 на OAR1, ассоциированный с ЖМ180 и ЖМ270, находился внутри QTL, регулирующего глубину мышц над третьим поясничным позвонком (55).

Большинство SNP на OAR1 (за исключением oar3_OAR1_14039930) попадали внутрь или находились в непосредственной близости от QTL, ассоциированных как с живой, так и с мышечной массой, процентом выхода постного мяса, содержанием жира в туше и массой костей в туше.

Примечательно, что эти QTL были картированы с использованием 189 микросателлитных маркеров в популяции возвратных кроссов (авасси × меринос) × меринос, происходящих от одного барана-родоначальника (56). В связи с тем, что мы проводили GWAS-анализ с использованием ДНК-чипов высокой плотности в популяции возвратных кроссов, происходящих от двух баранов (обеспечивается большая изменчивость показателя живой массы), вероятно, результаты нашей работы подтверждают данные C.R. Cavanagh с соавт. (56), и соответствующие SNP потенциально могут быть предложены как функциональные кандидаты живой массы у овец.

Следует отметить, что выявленные нами различия в наборах SNP, ассоциированных с живой массой в разные возрастные периоды, — экспериментальный факт, требующий фундаментального исследования обнаруженной закономерности. В частности, возникает вопрос, можно ли прогнозировать живую массу и мясную продуктивность овец в раннем возрасте посредством анализа желательных генотипов в генах-кандидатах, ассоциированных с этими показателями в более поздних возрастах. Положительный ответ позволит повысить эффективность овцеводства: можно будет разводить меньшее число животных с повышенной мясной продуктивностью, а мелких и медленно растущих овец подвергать ранней элиминации, тем самым снижая затраты содержания и кормление. Кроме того, теоретически можно проводить отбор эмбрионов овец с желательным генотипами по генам, ответственным за усиленный ранний постнатальный рост (*MBD5*, *ORC4*, *ACVR2A*, *RIPK2* и *SMC2*), с последующим клонированием и пересадкой овцематкам-реципиентам. Кроме того, поскольку живая масса животного складывается из суммы масс скелетных мышц, костей с хрящевой тканью, жировой ткани, массы внутренних органов, направленное включение или, наоборот, нокаут генов, ответственных за формирование того или иного компонента живой массы, посредством геномного редактирования может быть использовано для повышения ориентированности овцеводческого производства в соответствии с потребительским спросом (например, более постное мясо или мясо с жировыми включениями).

Таким образом, GWAS-анализ полногеномных ассоциаций живой массы возвратных кроссов овец (романовская × катадин) × романовская позволил выявить 38 SNP, достоверно ассоциированных с живой массой ($p < 0,00001$), на OAR1, OAR2, OAR3, OAR4, OAR6, OAR9, OAR10, OAR11, OAR13, OAR15 и OAR19. Показано, что набор SNP, ассоциированный с живой массой, был неодинаковым в разные возрастные периоды. Наблюдаемый результат частично ожидаем, поскольку выявленная тенденция согласуется с биологической особенностью овец — активным ранним постнатальным ростом. Вероятно, это также объясняется неполным прекращением действия эмбриональных факторов роста. Мы идентифицировали SNP-маркеры и гены, которые могут быть разделены на три группы. Первая группа включала в себя функциональные гены-кандидаты, вовлеченные в регуляцию роста скелетных мышц, формирование костного каркаса, липидного и углеводного метаболизма. Эта группа генов после валидации на большем поголовье овец и выявлении желательных генотипов может быть рекомендована для включения в селекционный процесс в ближайшее время. Вторая группа состояла из SNP-маркеров и генов, попадающих внутрь известных QTL, ассоциированных с живой массой у овец. Эти геномные регионы следует подвергнуть более тонкому картированию посредством секвенирования, чтобы полнее понимать характер взаимодействий локализованных в них генов, совокупность которых может быть предложена

для разработки низкоплотных ДНК-чипов для анализа генетической предрасположенности к более активному росту и повышенной живой массе. Третья группа включала гены, о влиянии которых на живую массу у овец ранее не сообщалось. Изучение дополнительных SNP внутри и рядом с этими генами обеспечит лучшее понимание причинных мутаций, влияющих на живую массу у овец. Результаты нашей работы создают основу для отбора генов-кандидатов и SNP-маркеров для включения в программы маркерной и геномной селекции в овцеводстве.

¹ФГБНУ ФИЦ животноводства —

ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,

142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,

e-mail: horarka@yandex.ru ✉, citelekle@gmail.com,

alex_sermyagin85@mail.ru, asnd@mail.ru, margaretfornara@gmail.com,

vugarbagirov@mail.ru, n_zinovieva@mail.ru;

²Institute of Genome Biology,

Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN),

Mecklenburg-Vorpommern, 18196 Dummerstorf, Germany,

e-mail: reyer@fhn-dummerstorf.de, wimmers@fhn-dummerstorf.de;

³Institut für Tierzucht und Genetik,

University of Veterinary Medicine (VMU),

Veterinärplatz, A-1210, Vienna, Austria,

e-mail: gottfried.brem@agrobiogen.de

Поступила в редакцию

15 января 2021 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2021, V. 56, № 2, pp. 279–291

A SEARCH FOR GENOMIC VARIANTS ASSOCIATED WITH BODY WEIGHT IN SHEEP BASED ON HIGH DENSITY SNP GENOTYPES ANALYSIS

T.E. Deniskova¹ ✉, S.N. Petrov¹, A.A. Sermyagin¹, A.V. Dosev¹, M.S. Fornara¹, H. Reyer², K. Wimmers², V.A. Bagirov¹, G. Brem^{1, 3}, N.A. Zinovieva¹

¹Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail horarka@yandex.ru ✉ (corresponding author), citelekle@gmail.com, alex_sermyagin85@mail.ru, asnd@mail.ru, margaretfornara@gmail.com, vugarbagirov@mail.ru, n_zinovieva@mail.ru;

²Institute of Genome Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Mecklenburg-Vorpommern, 18196 Dummerstorf, Germany, e-mail reyer@fhn-dummerstorf.de, wimmers@fhn-dummerstorf.de;

³Institut für Tierzucht und Genetik, University of Veterinary Medicine (VMU), Veterinärplatz, A-1210, Vienna, Austria, e-mail gottfried.brem@agrobiogen.de

ORCID:

Deniskova T.E. orcid.org/0000-0002-5809-1262

Petrov S.N. orcid.org/0000-0001-5130-677X

Sermyagin A.A. orcid.org/0000-0002-1799-601

Dotsev A.V. orcid.org/0000-0003-3418-2511

Fornara M.S. orcid.org/0000-0002-8844-177X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The equipment of the Center for Biological Resources and Bioengineering of Agricultural Animals (Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry) was used in the research.

Supported financially from the Russian Foundation for Basic Research, project No. 17-29-08015.

Received January 15, 2021

Reyer H. orcid.org/0000-0001-6470-0434

Wimmers K. orcid.org/0000-0002-9523-6790

Bagirov V.A. orcid.org/0000-0001-5398-8815

Brem G. orcid.org/0000-0002-7522-0708

Zinovieva N.A. orcid.org/0000-0003-4017-6863

doi: 10.15389/agrobiology.2021.2.279eng

Abstract

Body weight is one of the most important economically useful traits, which is characterized by complex inheritance. Therefore, a search for genetic mechanisms affecting its formation is of increased scientific interest. This work presents for the first time the results of the genome-wide association studies in the resource population of sheep (*Ovis aries*) from backcross (Romanov × Katahdin) × Romanov family, whose body weight was recorded in age dynamics, and SNP profiles were obtained using a high-density DNA chip. We identified 38 SNPs significantly associated with body weight ($p < 0.00001$) and functional candidate genes which affect skeletal muscle growth, bone scaffold formation, lipid, and carbohydrate metabolism. In addition, age-related changes in the set of significantly significant SNPs are shown. Our aim was to search for genomic variants that affect the body weight of (Romanov × Katahdin) × Romanov backcrosses from the resource population at different age periods. The study was performed on 95 sheep from backcross (Romanov × Katahdin) × Romanov

family (Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 2018–2021). Ear notch samples were taken from backcrosses for extraction of genomic DNA, which isolated using DNA-Extran-2 kits (Syntol LLC, Russia). Animals were genotyped using a high-density DNA chip Ovine Infinium® HD SNP BeadChip (Illumina, Inc., USA) containing ~600 thousand SNP markers. The body weight was recorded at the ages of 6(BW6), 42(BW42), 90(BW90), 180(BW180) and 270 days (BW270). To study genome-wide associations with body weight, we used regression analysis implemented in PLINK 1.90 (--assoc --adjust --qt-means). To confirm the significant effect of SNP and to identify significant regions in the genome of the studied sheep, a test was performed to check null hypotheses according to Bonferroni at a threshold value of $p < 1.09 \times 10^{-7}$, $^{0.05/459868}$. The search for candidate genes located in the region of identified SNPs was performed using the VEP (Ensembl Variant Effect Predictor) tool of Ensembl genome browser 103 (<https://www.ensembl.org/index.html>). After quality control, 459,868 SNPs were used to perform genome-wide association studies (GWAS). Average body weights in the studied sample were 3.28 ± 0.07 , 8.03 ± 0.21 , 13.74 ± 0.39 , 20.19 ± 0.51 , and 22.51 ± 0.50 kg at the age of 6, 42, 90, 180, and 270 days, respectively. We found that in different age periods the set of SNPs associated with the integral indicator of the growth rate, the animal body weight, was different. Thus, out of 38 identified SNPs, 18 SNPs located on OAR2, OAR4, OAR9, and OAR15 were reliably associated with BW6 ($p < 0.00001$); 3 SNPs located on OAR6 and OAR11 with BW42 ($p < 0.00001$); 2 SNPs located on OAR10 and OAR19 with BW90 ($p < 0.00001$); 6 SNPs ($p < 0.00001$) located on OAR1 and OAR13 with BW180 ($p < 0.00001$) and 6 SNPs located on OAR1 with BW270 ($p < 0.00001$). Blocks of 3–5 SNPs were found on OAR1, OAR2, OAR4, and OAR5. Significance levels for six SNPs, including oar3_OAR4_87887519 ($p < 7.13 \times 10^{-8}$), oar3_OAR4_87889243 ($p < 1.51 \times 10^{-7}$), oar3_OAR9_89145258 ($p < 4.95 \times 10^{-7}$), oar3_OAR1_192662599 ($p < 4.79 \times 10^{-7}$), OAR1_208070059.1 ($p < 4.79 \times 10^{-7}$) and oar3_OAR13_31446454 ($p < 6.84 \times 10^{-7}$) exceeded the threshold for GWAS ($p < 1.09 \times 10^{-7}$). Along with known candidate genes associated with body weight in sheep, we found new candidate genes whose effects on this trait have not been previously reported. The functional annotation of the identified candidates showed the presence of genes affecting skeletal muscle growth, bone frame formation, lipid, and carbohydrate metabolism. The obtained data will be useful for the development of marker and genomic selection programs in sheep breeding.

Keywords: domestic sheep, resource population, SNP markers, DNA chips, GWAS, body weight, candidate genes.

REFERENCES

1. Jaquiere A.L., Oliver M.H., Bloomfield F.H., Harding J.E. Periconceptional events perturb post-natal growth regulation in sheep. *Pediatric Research*, 2011, 70(3): 261–266 (doi: 10.1203/PDR.0b013e3182242deb).
2. Khaitov A.Kh., Dzhusaeva U.Sh. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2017, 3(48): 72–80 (in Russ.).
3. Somova M.M., Mel'nikova E.E., Abramova M.V., Konovalov A.V., Nikitin S.A., Sermyagin A.A. *Zootekhniya*, 2020, 8: 12–16 (in Russ.).
4. Trukhachev V.I., Selionova M.I., Krivoruchko A.YU., Aibazov A.M.M. Genetic markers of meat productivity of sheep (*Ovis aries* L.). I. Myostatin, calpain, calpastatin (review). *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya]*, 2018, 53(6): 1107–1119 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.6.1107eng).
5. Sermyagin A.A., Belous A.A., Trebunskikh E.A., Zinov'eva N.A. Feeding behavior as the new breeding traits in pigs. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya]*, 2020, 55(6): 1126–1138 (doi: 10.15389/agrobiology.2020.6.1126eng).
6. Zhang L., Liu J., Zhao F., Ren H., Xu L., Lu J., Zhang S., Zhang X., Wei C., Lu G., Zheng Y., Du L. Genome-wide association studies for growth and meat production traits in sheep. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e66569 (doi: 10.1371/journal.pone.0066569).
7. Al-Mamun H.A., Kwan P., Clark S.A., Ferdosi M.H., Tellam R., Gondro C. Genome-wide association study of body weight in Australian Merino sheep reveals an orthologous region on OAR6 to human and bovine genomic regions affecting height and weight. *Genetics Selection Evolution*, 2015, 47(1): 66 (doi: 10.1186/s12711-015-0142-4).
8. Matika O., Riggio V., Anselme-Moizan M., Law A.S., Pong-Wong R., Archibald A.L., Bishop S.C. Genome-wide association reveals QTL for growth, bone and in vivo carcass traits as assessed by computed tomography in Scottish Blackface lambs. *Genetics Selection Evolution*, 2016, 48: 11 (doi: 10.1186/s12711-016-0191-3).
9. Ghasemi M., Zamani P., Vatankhah M., Abdoli R. Genome-wide association study of birth weight in sheep. *Animal*, 2019, 13(9): 1797–1803 (doi: 10.1017/S1751731118003610).
10. Lu Z., Yue Y., Yuan C., Liu J., Chen Z., Niu C., Sun X., Zhu S., Zhao H., Guo T., Yang B. Genome-wide association study of body weight traits in Chinese fine-wool sheep. *Animals*, 2020, 10(1): 170 (doi: 10.3390/ani10010170).

11. Pasandideh M., Gholizadeh M., Rahimi-Mianji G. A genome-wide association study revealed five SNP affecting 8-month weight in sheep. *Animal Genetics*, 2020, 51(6): 973-976 (doi: 10.1111/age.12996).
12. Cao Y., Song X., Shan H., Jiang J., Xiong P., Wu J., Shi F., Jiang Y. Genome-wide association study of body weights in Hu sheep and population verification of related single-nucleotide polymorphisms. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 588 (doi: 10.3389/fgene.2020.00588).
13. Zlobin A.S., Nikulin P.S., Volkova N.A., Zinovieva N.A., Iolchiev B.S., Bagirov V.A., Borodin P.M., Aksenovich T.I., Tsepilov Y.A. Multivariate analysis identifies eight novel loci associated with meat productivity traits in sheep. *Genes*, 2021, 12(3): 367 (doi: 10.3390/genes12030367).
14. Ledur M.C., Navarro N., Pérez-Enciso M. Large-scale SNP genotyping in crosses between outbred lines: how useful is it? *Heredity*, 2009, 105: 173-182 (doi: 10.1038/hdy.2009.149).
15. Deniskova T.E., Dotsev A.V., Petrov S.N., Fornara M.S., Reier K.H., Vimmers K., Bagirov V.A., Brem G., Zinov'eva N.A. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka*, 2019, 20(5): 498-507 (doi: 10.30766/2072-9081.2019.20.5.498-507) (in Russ.).
16. Chang C.C., Chow C.C., Tellier L.C., Vattikuti S., Purcell S.M., Lee J.J. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 2015, 4(7): 1-16 (doi: 10.1186/s13742-015-0047-8).
17. Turner S.D. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *bioRxiv* (doi: 10.1101/005165).
18. R Core Team (2018). *R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria*. Rezhim dostupa: <https://www.R-project.org/>. Bez daty.
19. McLaren W., Gil L., Hunt S.E., Riat H.S., Ritchie G.R., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 2016, 17(1): 122 (doi: 10.1186/s13059-016-0974-4).
20. Da Wei H., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 2009, 4(1): 44-57 (doi: 10.1038/nprot.2008.211).
21. Hu Z.L., Park C.A., Reecy J.M. Building a livestock genetic and genomic information knowledge-base through integrative developments of Animal QTLdb and CorrDB. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D701-D710 (doi: 10.1093/nar/gky1084).
22. Du Y., Liu B., Guo F., Xu G., Ding Y., Liu Y., Sun X., Xu G. The essential role of Mbd5 in the regulation of somatic growth and glucose homeostasis in mice. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e47358 (doi: 10.1371/journal.pone.0047358).
23. Chung B.H., Stavropoulos J., Marshall C.R., Weksberg R., Scherer, S.W., Yoon G. 2q23 de novo microdeletion involving the MBD5 gene in a patient with developmental delay, postnatal microcephaly and distinct facial features. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 2011, 155(2): 424-429 (doi: 10.1002/ajmg.a.33821).
24. Bravo-Oro A., Lurie I.W., Elizondo-Cárdenas G., Peña-Zepeda C., Salazar-Martínez A., Correa-González C., Castrillo J.L., Avila S., Esmer C. A novel interstitial deletion of 2q22.3 q23.3 in a patient with dysmorphic features, epilepsy, aganglionosis, pure red cell aplasia, and skeletal malformations. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 2015, 167(8): 1865-1871 (doi: 10.1002/ajmg.a.36806).
25. Klingseisen A., Jackson A.P. Mechanisms and pathways of growth failure in primordial dwarfism. *Genes & Development*, 2011, 25(19): 2011-2024 (doi: 10.1101/gad.169037).
26. de Munnik S.A., Hoefsloot E.H., Roukema J., Schoots J., Knoers N.V., Brunner H.G., Jackson A.P., Bongers E.M. Meier-Gorlin syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2015, 10: 114 (doi: 10.1186/s13023-015-0322-x).
27. Goh B.C., Singhal V., Herrera A.J., Tomlinson R.E., Kim S., Faugere M.C., Germain-Lee E.L., Clemens T.L., Lee S.J., DiGirolamo D.J. Activin receptor type 2A (ACVR2A) functions directly in osteoblasts as a negative regulator of bone mass. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(33): 13809-13822 (doi: 10.1074/jbc.M117.782128).
28. Rovadoscki G.A., Pertile S.F.N., Alvarenga A.B., Cesar A.S.M., Pértile F., Petrini J., Franzo V., Soares W.V.B., Morota G., Spangler M.L., Pinto L.F.B., Carvalho G.G.P., Lanna D.P.D., Coutinho L.L., Mourão G.B. Estimates of genomic heritability and genome-wide association study for fatty acids profile in Santa Inês sheep. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 375 (doi: 10.1186/s12864-018-4777-8).
29. Arora R., Kumar N.S., Sudarshan S., Fairuze M.N., Kaur M., Sharma A., Girdhar Y., Sreesujatha R.M., Devatkal S.K., Ahlawat S., Vijh R.K., Manjunatha S.S. Transcriptome profiling of longissimus thoracis muscles identifies highly connected differentially expressed genes in meat type sheep of India. *PLoS ONE*, 2019, 14(6): e0217461 (doi: 10.1371/journal.pone.0217461).
30. Randhawa I.A.S., Khatkar M.S., Thomson P.C., Raadsma H.W. Composite selection signals for complex traits exemplified through bovine stature using multibreed cohorts of European and African *Bos taurus*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 2015, 5(7): 1391-1401 (doi: 10.1534/g3.115.017772).
31. Widmann P., Reverter A., Fortes M.R.S., Weikard R., Suhre K., Hammon H., Albrecht E., Kuehn C. A systems biology approach using metabolomic data reveals genes and pathways interacting to modulate divergent growth in cattle. *BMC Genomics*, 2013, 14: 798 (doi: 10.1186/1471-

32. Doyle J.L., Berry D.P., Veerkamp R.F., Carthy T.R., Evans R.D., Walsh S.W., Purfield D.C. Genomic regions associated with muscularity in beef cattle differ in five contrasting cattle breeds. *Genetics Selection Evolution*, 2020, 52(1): 2 (doi: 10.1186/s12711-020-0523-1).
33. Grigoletto L., Ferraz J., Oliveira H.R., Eler J.P., Bussiman F.O., Abreu Silva B.C., Baldi F., Brito L.F. Genetic architecture of carcass and meat quality traits in Montana Tropical® composite beef cattle. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 123 (doi: 10.3389/fgene.2020.00123).
34. Liu X., Guo X.Y., Xu X.Z., Wu M., Zhang X., Li Q., Ma P.P., Zhang Y., Wang C.Y., Geng F.J., Qin C.H., Liu L., Shi W.H., Wang Y.C., Yu Y. Novel single nucleotide polymorphisms of the bovine methyltransferase 3b gene and their association with meat quality traits in beef cattle. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11(3): 2569-2577 (doi: 10.4238/2012.June.29.1).
35. Gan Q., Li Y., Liu Q., Lund M., Su G., Liang X. Genome-wide association studies for the concentrations of insulin, triiodothyronine, and thyroxine in Chinese Holstein cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 2020, 52(4): 1655-1660 (doi: 10.1007/s11250-019-02170-z).
36. Hu Z., Wu J., Qin L., Jin H., Lv Y., Zhang R., Xiao C., Cao Y., Zhao Y. *ALDH1A1* effect on Yan Yellow Cattle preadipocyte differentiation. *Animal Biotechnology*, 2019: 1-10 (doi: 10.1080/10495398.2019.1679824).
37. Clark D.L., Boler D.D., Kutzler L.W., Jones K.A., McKeith F.K., Killefer J., Carr T.R., Dilger A.C. Muscle gene expression associated with increased marbling in beef cattle. *Animal Biotechnology*, 2011, 22(2): 51-63 (doi: 10.1080/10495398.2011.552031).
38. Zhang X., Hirschfeld M., Beck J., Kupke A., Köhler K., Schütz E., Brenig B. Osteogenesis imperfecta in a male holstein calf associated with a possible oligogenic origin. *The Veterinary Quarterly*, 2020, 40(1): 58-67 (doi: 10.1080/01652176.2020.1721611).
39. An B., Xia J., Chang T., Wang X., Miao J., Xu L., Zhang L., Gao X., Chen Y., Li J., Gao H. Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for internal organ weights in Simmental beef cattle. *Physiological Genomics*, 2018, 50(7): 523-531 (doi: 10.1152/physiol-genomics.00022.2018).
40. Milner J.M., Rowan A.D., Cawston T.E., Young D.A. Metalloproteinase and inhibitor expression profiling of resorbing cartilage reveals pro-collagenase activation as a critical step for collagenolysis. *Arthritis Research & Therapy*, 2006, 8(5): R142 (doi: 10.1186/ar2034).
41. Zhang H., Takeda H., Tsuji T., Kamiya N., Rajderkar S., Louie K., Collier C., Scott G., Ray M., Mochida Y., Kaartinen V., Kunieda T., Mishina Y. Generation of *Evc2/Limbin* global and conditional KO mice and its roles during mineralized tissue formation. *Genesis*, 2015, 53(9): 612-626 (doi: 10.1002/dvg.22879).
42. Correa-Rodriguez M., Schmidt Rio-Valle J., Rueda-Medina B. *AKAP11* gene polymorphism is associated with bone mass measured by quantitative ultrasound in young adults. *International Journal of Medical Sciences*, 2018, 15(10): 999-1004 (doi: 10.7150/ijms.25369).
43. Oh J.H., Lee J.Y., Joung S.H., Oh Y.T., Kim H.S., Lee N.K. Insulin enhances RANKL-induced osteoclastogenesis via ERK1/2 activation and induction of NFATc1 and Atp6v0d2. *Cellular Signalling*, 2015, 27(12): 2325-2331 (doi: 10.1016/j.cellsig.2015.09.002).
44. Chen J., Tu X., Esen E., Joeng K.S., Lin C., Arbeit J.M., Ruegg M.A., Hall M.N., Ma L., Long F. WNT7B promotes bone formation in part through mTORC1. *PLoS Genetics*, 2014, 10(1): e1004145 (doi: 10.1371/journal.pgen.1004145).
45. Sawai M., Uchida Y., Ohno Y., Miyamoto M., Nishioka C., Itohara S., Sassa T., Kihara A. The 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases HACD1 and HACD2 exhibit functional redundancy and are active in a wide range of fatty acid elongation pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(37): 15538-15551 (doi: 10.1074/jbc.M117.803171).
46. Knigge A., Klötting N., Schön M.R., Dietrich A., Fasshauer M., Gärtner D., Lohmann T., Dreßler M., Stumvoll M., Kovacs P., Blüher M. *ADCY5* gene expression in adipose tissue is related to obesity in men and mice. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0120742 (doi: 10.1371/journal.pone.0120742).
47. Bagchi D.P., Li Z., Corsa C.A., Hardij J., Mori H., Learman B.S., Lewis K.T., Schill R.L., Romanelli S.M., MacDougald O.A. Wntless regulates lipogenic gene expression in adipocytes and protects against diet-induced metabolic dysfunction. *Molecular Metabolism*, 2020, 39: 100992 (doi: 10.1016/j.molmet.2020.100992).
48. McDaniel T.G., Hannon K., Moody D.E. Ankyrin repeat and SOCS box protein 15 regulates protein synthesis in skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2006, 290(6): R1672-R1682 (doi: 10.1152/ajpregu.00239.2005).
49. Smith J.A., Curry E.G., Blue R.E., Roden C., Dundon S., Rodríguez-Vargas A., Jordan D.C., Chen X., Lyons S.M., Crutchley J., Anderson P., Horb M.E., Gladfelder A.S., Giudice J. FXR1 splicing is important for muscle development and biomolecular condensates in muscle cells. *The Journal of Cell Biology*, 2020, 219(4): e201911129 (doi: 10.1083/jcb.201911129).
50. Fukuda S., Kaneshige A., Kaji T., Noguchi Y.T., Takemoto Y., Zhang L., Tsujikawa K., Kokubo H., Uezumi A., Maehara K., Harada A., Ohkawa Y., Fukada S.I. Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle. *eLife*, 2019, 8:

- e48284 (doi: 10.7554/eLife.48284).
51. Wadhwa R., Yaguchi T., Kaur K., Suyama E., Kawasaki H., Taira K., Kaul S.C. Use of a randomized hybrid ribozyme library for identification of genes involved in muscle differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(49): 51622-51629 (doi: 10.1074/jbc.M407428200).
 52. Picard B., Lefaucheur L., Berri C., Duclos M.J. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition Development*, 2002, 42(5): 415-431 (doi: 10.1051/rnd:2002035).
 53. Bonnet M., Cassar-Malek I., Chilliard Y., Picard B. Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. *Animal*, 2010, 4(7), 1093-1109 (doi: 10.1017/S1751731110000601).
 54. Roldan D.L., Dodero A.M., Bidinost F., Taddeo H.R., Allain D., Poli M.A., Elsen J.M. Merino sheep: a further look at quantitative trait loci for wool production. *Animal*, 2010, 4(8):1330-1340 (doi: 10.1017/S1751731110000315).
 55. Matika O., Sechi S., Pong-Wong R., Houston R.D., Clop A., Woolliams J.A., Bishop S.C. Characterization of OAR1 and OAR18 QTL associated with muscle depth in British commercial terminal sire sheep. *Animal Genetics*, 2011, 42(2): 172-180 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02121.x).
 56. Cavanagh C.R., Jonas E., Hobbs M., Thomson P.C., Tammen I., Raadsma H.W. Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) in sheep. III. QTL for carcass composition traits derived from CT scans and aligned with a meta-assembly for sheep and cattle carcass QTL. *Genetics Selection Evolution*, 2010, 42(1): 36 (doi: 10.1186/1297-9686-42-36).