

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ РОССИЙСКИХ ПОРОД ОВЕЦ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ МАРКЕРАМ

Денискова Т.Е.¹, Гладырь Е.А.², Зиновьева Н.А.³©

¹Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук;

²ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук;

³директор, доктор биологических наук, профессор, академик РАН.

Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. Л.К. Эрнста

Аннотация

В работе дана генетическая характеристика трех российских пород (романовская, татарстанская, тувинская короткожирнохвостая) по 11 микросателлитным локусам. Исследование является одним из этапов ДНК-паспортизации пород овец России.

Ключевые слова: ДНК-маркеры, микросателлиты, аллельные профили, породы овец.

Keywords: DNA markers, microsatellites, allelic profiles, sheep breeds.

Для комплексной ДНК-паспортизации отечественных пород овец, которая, в свою очередь, является важным этапом для сохранения уникального генофонда и совершенствования продуктивных качеств, необходимо дать генетическую оценку каждой отдельной породе (или типа), изучить их аллелофонд, консолидированность и генетическое разнообразие. Для решения этих задач из всего спектра ДНК-маркеров особенно успешно зарекомендовали себя мультилокусные системы анализа на основе микросателлитов.

Микросателлиты известны с 1984 год [1,4130] и обладают такими важными особенностями, как менделевский характер наследования, равномерное распределение в геноме, высокая информативность на локус вследствие большого аллельного разнообразия и легкость автоматизации [2,234; 3, 4]. Благодаря этим преимуществам микросателлитный анализ нашел широкое применение в популяционно-генетических исследованиях овец как для оценки генетического разнообразия, установления филогенетических взаимосвязей между породами, подтверждения происхождения и породной принадлежности особей, так и для исследования структуры популяции. Кроме того, микросателлиты могут служить индивидуальной генетической характеристикой особи [2,234; 3, 4; 4,4399; 5,27; 6,46; 7,52; 8,395]

Романовская порода овец является одной из самых известных и многоплодных пород овец не только в России, но и в мире. По мнению профессора Д.Д. Арсеньева, [9,31], «романовскую породу нужно рассматривать как как продукт длительной эволюции, в результате которой у животных сложился неповторимый комплекс признаков, который необходим как источник генетического, а значит и экономического, потенциала». Овцы романовской породы характеризуются хорошей приспособляемостью к условиям разведения в разных климатических районах, высокой плодовитостью, полиэстричностью и скороспелостью. [9,27; 10,221]. Благодаря непревзойденному качеству овчины и особенностям шерстного покрова, романовская порода овец создавалась, прежде всего, как шубная. Но с падением спроса на овчины и шкуры, часть хозяйств также используют овец и на мясо. Кроме того, высочайшие воспроизводительные качества романовских овец позволяют использовать их для скрещивания с другими породами для повышения их плодовитости [11,4].

Особый интерес представляет татарстанская порода овец, до настоящего времени не изученная по микросателлитным маркерам. Татарстанская порода овец, утвержденная в 2012 году (авторы: П.П. Араев, И.Н. Шайдуллин и др.), была создана методом воспроизводительного скрещивания помесных маток (прекос и куйбышевская) с баранами

удмуртского типа советской мясошерстной породы с применением жесткого отбора. Животные желательного типа затем разводились в чистоте. По направлению продуктивности овцы являются полутонкорунными. Животные отличаются крепкой конституцией, комолые, хорошо приспособлены к длительному выгульному содержанию [10,214].

Тувинская короткожирнохвостая овца является уникальной аборигенной породой, выведенная племенами кочевников. В связи с этим тувинские овцы невероятны приспособлены к суровым климатическим и кормовым условия Республики Тыва. [12,34]. Животные характеризуются крепкой конституцией, крупным размером, высокой мясной продуктивностью и выраженными мясосальными формами тела. Тувинские овцы относятся по направлению продуктивности к грубошерстным [10,227].

Целью нашей работы явилось исследование аллелофонда и генетического разнообразия трех российских пород овец: тувинской короткожирнохвостой (TUV, n=15), татарстанской (TTR, n=15) и романовской, представленной выборкой из трех генофондных хозяйств Ярославской области: ROM1 (n=14), ROM2 (n=11) и ROM3 (n=13).

Выделение ДНК производилось с помощью набора «ДНК-Экстран» (ЗАО «Синтол», Россия) согласно стандартному протоколу производителя. Для характеристики трех пород овец были выбраны 11 микросателлитных локусов: OarCP49, INRA063, HSC, OarAE129, MAF214, OarFCB11, INRA005, SPS113, INRA23, MAF65 и McM527. ПЦР-амплификация проводилась согласно «Методическим рекомендациям...» [13,25]. Исследование полиморфизма микросателлитов осуществлялось на шестнадцати капиллярном генетическом анализаторе ABI 3131xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Длины фрагментов были получены с помощью программного обеспечения Gene Mapper 4.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ GenAIEx 6.5 [14,25], Structure 2.3.2 [15,945] и PAST [16,5]. С помощью GenAIEx 6.5 были рассчитаны следующие показатели: среднее число аллелей на локус (N_a), эффективное число аллелей (N_e), число информативных аллелей на локус ($N_a \text{ Freq.} \geq 5\%$) с частотой встречаемости 5% и более, количество приватных аллелей (No. Private Alleles), уровни ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности, значение информационного индекса Шеннона (I), показатели F-статистики, расчет генетических дистанций по М. Нею [17,583]. В программе Structure 2.3.2 по методу Pritchard J.K. с соавторами [15,945]. был рассчитан критерий Q, который характеризует принадлежность каждого отдельного животного к соответствующей породе. Значение Q равное 75% и выше подтверждает членство особи в своем кластере. В программе PAST выполнено построение филогенетического дерева на основе расчета генетических дистанций по Нею (1978).

На *рисунке 1* представлены аллельные профили трех изучаемых пород овец. Среднее число аллелей на локус варьировало от $5,55 \pm 0,68$, $5,36 \pm 0,61$ и $5,73 \pm 0,54$ у ROM1, ROM2 и ROM3, соответственно, до $8,55 \pm 0,74$ у TUV с промежуточным значением у TTR ($7,55 \pm 0,59$). По эффективному числу аллелей и числу информативных аллелей была отмечена та же тенденция в распределении пород: $3,28 \pm 0,32$ и $4,18 \pm 0,42$; $3,49 \pm 0,34$ и $4,00 \pm 0,41$; $3,52 \pm 0,40$ и $4,09 \pm 0,29$; $4,68 \pm 0,66$ и $5,23 \pm 0,45$; $5,55 \pm 0,42$ и $5,73 \pm 0,33$ для ROM1, ROM2 и ROM3, TTR, TUV, соответственно.

Интересным фактом было то, что овцы TUV по количеству приватных аллелей, т. е. встречающихся только у определенной породы или популяции, почти в два раза превышали аналогичный показатель у TTR: 3,45 аллеля у TUV против 1,45 аллеля у TTR. Возможно, такое высокое значение числа приватных аллелей TUV объясняется тем, что в выборке были представлены неродственные животные, а также тем, что данная порода является наиболее древней из трех приведенных пород, а также наиболее географически обособленной, что позволило накопить уникальные аллели.

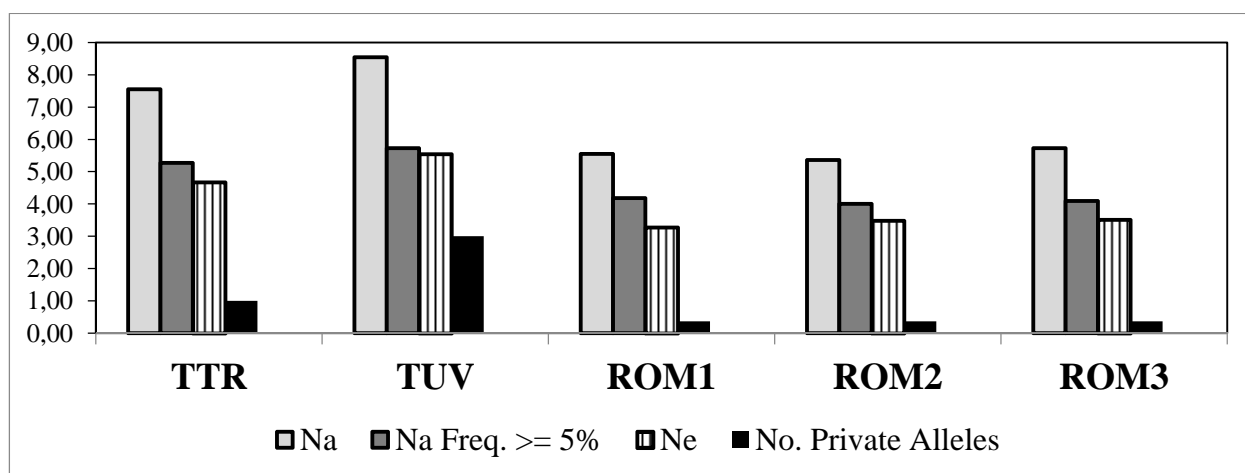


Рис. 1. Аллельные профили изучаемых пород овец. N_a – среднее число аллелей на локус; N_e – число эффективных аллелей на локус; $N_a \text{ Freq. } \geq 5\%$ – число информативных аллелей; N_o . Private Alleles – количество частных аллелей; ROM1 – романовская порода, хозяйство 1; ROM2 – романовская порода, хозяйство 2; ROM3 – романовская порода, хозяйство 3; TTR – татарстанская порода; TUV – тувинская короткожирнохвостая порода.

В *таблице 1* приведены основные параметры генетического разнообразия трех пород овец. Наибольшая степень наблюдаемой гетерозиготности была выявлена у TUV и TTR: $0,97 \pm 0,02$ и $0,91 \pm 0,03$, соответственно. Аналогичный показатель у ROM был ниже на 0,34 и 0,28, чем у двух выше обозначенных пород, соответственно. Умеренно высокий избыток гетерозигот был зафиксирован у TTR и TUV (15 и 16%, соответственно). Это подтверждалось высокими отрицательными значениями индекса фиксации F_{IS} . Группы романовских овец характеризовалась незначительным дефицитом гетерозигот в 4%. Значения F_{IS} колебались также в диапазоне от $0,06 \pm 0,09$ до $0,09 \pm 0,12$ у ROM1 и ROM3, соответственно.

В то же время значения информационного индекса Шеннона указывали на достаточно высокое генетическое разнообразие в двух из трех исследованных пород ($I \geq 1,5$) за исключением романовской породы: 1,33 и 1,36 для ROM1 и ROM3, соответственно.

Таблица 1

Генетико-популяционные параметры генетического разнообразия изучаемых пород овец

Порода	N_o	N_e	$N_o - N_e$	I	F_{IS}
TTR	$0,91 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,02$	0,15	$1,66 \pm 0,10$	$-0,21 \pm 0,04$
TUV	$0,97 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,02$	0,16	$1,86 \pm 0,09$	$-0,21 \pm 0,04$
ROM1	$0,62 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,04$	-0,04	$1,33 \pm 0,12$	$0,06 \pm 0,09$
ROM2	$0,62 \pm 0,08$	$0,66 \pm 0,06$	-0,04	$1,35 \pm 0,14$	$0,07 \pm 0,07$
ROM3	$0,64 \pm 0,09$	$0,66 \pm 0,05$	-0,04	$1,36 \pm 0,13$	$0,09 \pm 0,12$
В целом	$0,75 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,02$	0,04	$1,51 \pm 0,06$	$-0,04 \pm 0,04$

Примечание: N_o – наблюдаемая гетерозиготность; N_e – ожидаемая гетерозиготность; I – информационный индекс Шеннона; F_{IS} – индекс фиксации.

Анализ структуры филогенетического дерева, построенного на основании генетических дистанций по Нею (рис. 2), показал, что тувинские овцы, как и наиболее древние и географически изолированные, генетически далеки от других пород и формирует отдельную ветвь. В свою очередь, овцы романовской и татарстанской пород формируют общий кластер, внутри которого формируется кластер второго порядка, состоящий из групп

романовских овец. При этом ROM 2 и ROM 3 являются более генетически близкими, чем ROM1.

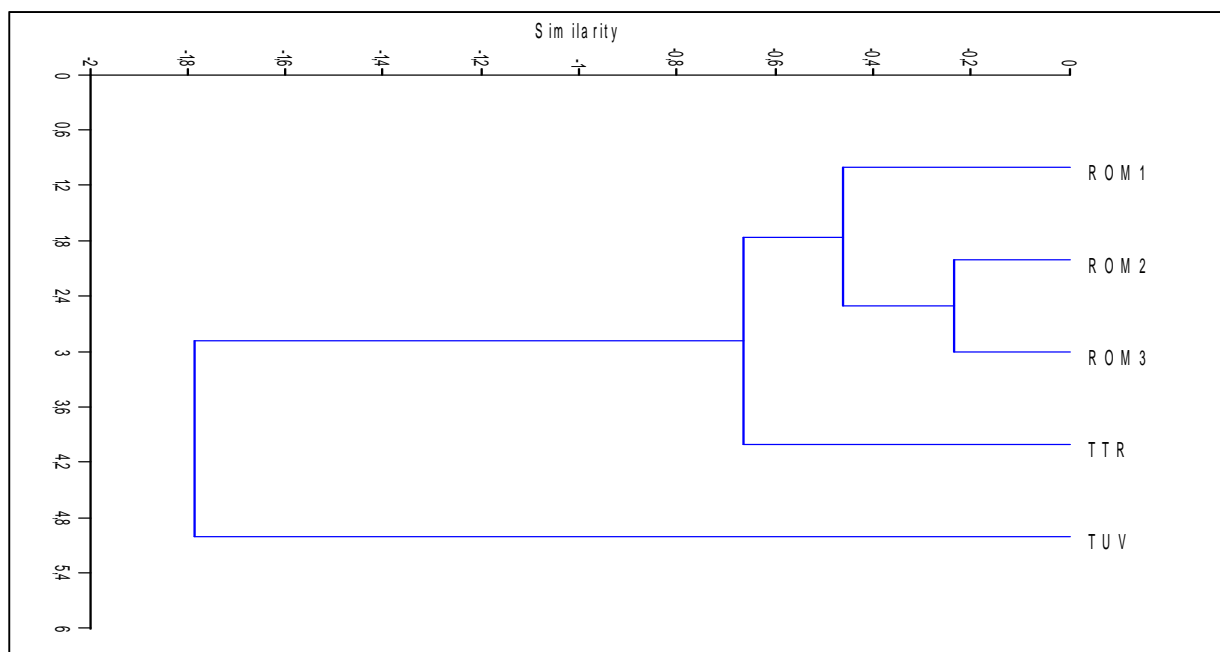


Рис. 1. Филогенетическое дерево на основе матрицы попарных генетических дистанций Nei M. [1978] между изучаемыми группами овец (метод UMPGA)

Кластерный анализ, выполненный для наиболее вероятного числа кластеров $k=3$ (рис. 3А), показал уникальность аллелофонда каждой из трех изучаемых пород овец: доля членства в собственном кластере составила $Q_{1/3}=0,951\pm 0,051$, $Q_{2/3}=0,962\pm 0,042$ и $Q_{3/3}=0,985\pm 0,006$ для татарстанской, романовской (по всем группам) и тувинской пород, соответственно.

При увеличении наиболее вероятного числа кластера до $k=4$ (рис.3Б) происходит разделение романовской породы овец на два кластера: четко отделяется группа ROM1 и группы ROM2 и ROM3 образуют смешанный кластер. Полученные данные соответствуют структуре филогенетического дерева.

При дальнейшем увеличении числа кластеров до $k=5$ (рис.3В), которое соответствует количеству изучаемых групп овец, группы ROM2 и ROM3, за исключением единичных особей, по-прежнему образуют один кластер. Кроме того, наблюдается расщепление кластера TTR, что может быть объяснено стратегией создания татарстанской породы с использованием целого ряда неродственных пород.

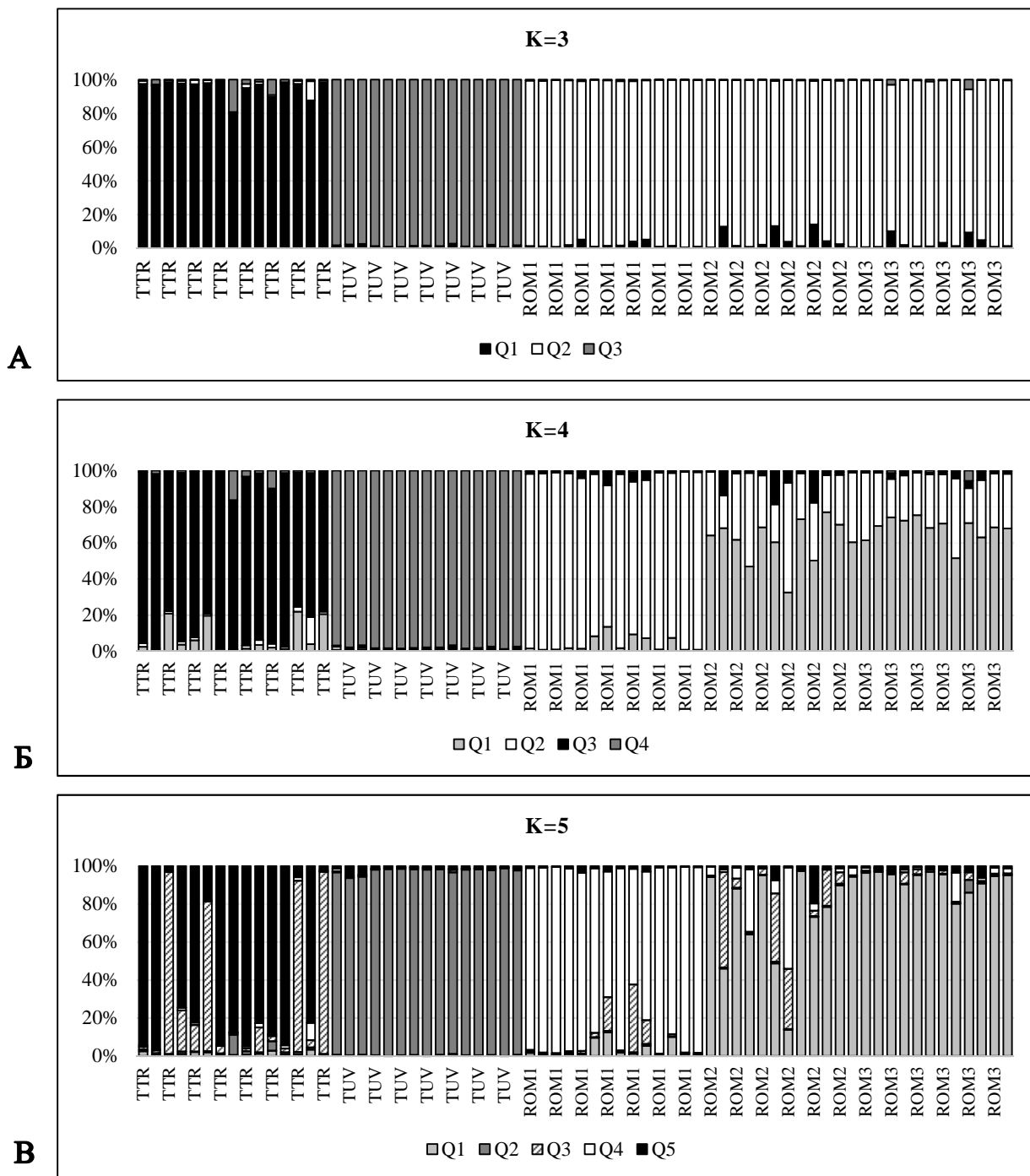


Рис. 4. Результаты анализа генетической структуры изучаемых пород для наиболее вероятного числа кластеров (k): А. k=3; Б. k=4; В. k=5. Примечание: ось X – изучаемая порода овец, ось Y – доля членства в соответствующем кластере Q1-Q5, значения Q рассчитаны по методу J.K. Pritchard с соавт. [15,945].

В заключении следует отметить, что умеренно невысокие показатели генетического разнообразия для романовской породы, выявленные в нашем исследовании, возможно являются характерными только для представленных в данном исследовании групп. Следует ожидать большей гетерогенности овец романовской породы в пределах России, вследствие разнообразия селекционных подходов в разведении одной из самых популярных российских пород овец, распространенной практически повсеместно по территории страны. Кроме того, исторически романовская порода была сформирована за счет нескольких отродий, выведенных на территории Ярославской области и отличающихся друг от друга генетически,

что, вероятно, объясняет разделение групп романовской породы на несколько кластеров в нашем исследовании.

В свою очередь, татарстанская порода была создана на основании многопородного скрещивания, что подтверждается расщеплением ее кластера при $k=5$. В будущем планируется расширение выборок изучаемых овец для получения данных, более полно и точно характеризующих породу в целом, а не только популяции, представленные в нашей работе.

Работа выполнена в рамках задания Федерального агентства научных организаций (тема 19. № 0600-2014-0004.3) в 2016 году.

Литература

1. D. Tautz, M. Renz – Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes // *Nucleic Acids Research*. – 1984. – № 12. – P. 4127 – 4138.
2. Эрнст Л.К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке /Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. – М.: РАСХН, 2008. – 508 с.
3. Ю.А. Столповский – Концепция и принципы генетического мониторинга для сохранения in situ пород domestцированных животных // *Сельскохозяйственная биология*. – 2010. – № 6. – С. 3 – 8.
4. A.I. Putman, I. Carbone – Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies // *Ecology Evolution*. – 2014. – № 4 (22). – P. 4399 – 4428.
5. Е.А. Гладырь, Н.А. Зиновьева, Г. Брем – Характеристика генофонда и выявление генеалогических связей между породами овец России с использованием ДНК-микросателлитов // *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. – 2004. – № 2. – С. 26 – 29.
6. C. Dalvit, E. Sacca, M. Cassandro, M. Gervaso, E. Pastore, E. Piasentier. – Genetic diversity and variability in Alpine sheep breeds // *Small Rum Res*. – 2008. – № 80. – P. 45–51.
7. S. Kusza, D. Dimov, I. Nagy, Z. Bősze, A. Jávör, S. Kukovics – Microsatellite analysis to estimate genetic relationships among five bulgarian sheep breeds // *Genet Mol Biol*. – 2010. – № 33(1). – P. 51–56.
8. N.A. Zinovieva, M.I. Selionova, E.A. Gladyr, M.P. Petrovic, V. Caro Petrovic, D. Ruzic Muslic et al – Investigation of gene pool and genealogical links between sheep breeds of southern Russia by blood groups and DNA microsatellites // *Genetika*. – 2015. – № 47 (2). – P. 395 – 404.
9. Д.Д. Арсеньев, В. Ю. Лобков – Проблемы и перспективы развития романовского овцеводства // *Вестник АПК Верхневолжья*. – 2013. – № 3 (23). – С. 27 – 31.
10. Дунин, И.М. Справочник пород и типов сельскохозяйственных животных, разводимых в российской федерации; словарь терминов по разведению, генетике, селекции и биотехнологии размножения сельскохозяйственных животных; перечень российских и международных организаций в сфере животноводства/И. М. Дунин [и др.] – Москва: Министерство сельского хозяйства РФ; ФГБНУ ВНИИПлем, 2013. – 560с.
11. Н.И. Кравченко – Повышение многоплодия мериносовых овец на основе их скрещивания с романовской породой // *Сборник научных трудов Северо-Кавказского научно-исследовательского института животноводства*. – 2014. – Т. 3. – С. 4 – 10.
12. Ю.А. Столповский, Л.В. Шимиит, Н. В. Кол, А. Н. Евсюков, М. П. Рузина, О. И. Чургуйоол, Г.Е. Сулимова – Анализ генетической изменчивости и филогенетических связей у популяций тувинской короткожирнохвостой овцы с использованием ISSR-маркеров // *Сельскохозяйственная биология*. – 2009. – № 6. – С. 34– 43.
13. Зиновьева Н.А. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве / Н.А. Зиновьева, Попов А.Н., Эрнст Л.К. – Дубровицы: ВИЖ, 1998. – 47 с.
14. R. Peakall, P.E. Smouse. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update // *Bioinformatics*. – 2012. – № 28. – P. 2537 – 2539.
15. J. K. Pritchard, Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. – 2000. – № 155. – P. 945–959
16. O. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan. – PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica*. – 2001. – P. 4 – 9.

17. M. Nei – Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals
// Genetics. –1978. –№89. – P. 583 – 590.