

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СУЮНДУКСКОГО  
И БИРЛИКСКОГО ВНУТРИПОРОДНЫХ ТИПОВ  
ЭДИЛЬБАЕВСКОЙ ПОРОДЫ ОВЕЦ

И.А. ЕЛЬСУКОВА<sup>1</sup>, А.В. ФЕОФИЛОВ<sup>2</sup>, Ю.А. ЮЛДАШБАЕВ<sup>1</sup>, В.И. ГЛАЗКО<sup>2</sup>

(\* Кафедра овцеводства и козоводства, <sup>2</sup> центр нанобиотехнологий  
РГАУ - МСХА имени КА. Тимирязева)

**Проанализированы спектры продуктов амплификации фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов, с использованием ди- и тринуклеотидных праймеров у представителей бирликского и суюндукского внутрипородных типов эдильбаевской породы овец. У животных обнаружены выраженные отличия генетических структур между внутрипородными типами, а также дифференциация по полу.**

**Ключевые слова:** ISSR-PCR, инвертированные повторы, эдильбаевская порода овец, внутрипородные типы.

Информация по генетическому разнообразию животных существенна для разработки стратегий по оптимизации сохранения и использования генетических ресурсов животных, а также разработке методов, позволяющих контролировать и корректировать динамику генетической структуры групп животных в процессе селекционной работы. В этих целях используется широкий арсенал молекулярно-генетических маркеров, к которым, в частности, относятся полилокусные спектры фрагментов ДНК, получаемых в полимеразной цепной реакции (Polymerase Cycle Reaction — PCR) с использованием в качестве праймеров коротких участков микросателлитов (Inter — Simple Sequence Repeats — ISSR-PCR). Полилокусные геномные ISSR-PCR-спектры позволяют выполнять сравнения генофондов разных групп организмов и надежно выявлять межгрупповые генетические дифференциации одновременно по многим геномным участкам. Одно из важных направлений их использования в селекционной работе заключа-

ется в выявлении связей межгрупповых дифференциаций по таким полилокусным спектрам и по комплексам морфофизиологических характеристик. Полилокусность ISSR-PCR-маркеров позволяет рассчитывать на возможность выявления комбинаций таких маркеров, тесно связанных с особенностями происхождения, отбора и фенотипической дифференциацией групп животных. Использование ISSR-PCR-маркеров позволяет выявлять дифференциацию внутрипородных, межпородных и межвидовых генофондов, в частности, рода *Ovis* [1, 2, 4].

Ранее проведенные нами исследования овец эдильбаевской породы бирликского и суюндукского внутрипородного типа позволили выявить дифференциацию между этими типами по комплексу морфофизиологических характеристик, таких как уровень мясной продуктивности, морфологический состав шерсти, ультраструктура кутикулярного слоя [3, 5]. В настоящей работе выполнен сравнительный анализ генетических

структур этих двух групп овец с использованием ISSR-PCR-маркеров с целью оценки генетической дифференциации между ними по различным геномным участкам.

### Материалы и методы

Исследования выполняли на двух группах овец эдильбаевской породы, разводимых в ОАО «Эдильбай-Волгоград», в анализ включены представители бирликского (50 гол.) и суюндукского (50 гол.) внутривидовых типов.

В качестве маркеров полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов (ISSR-PCR-маркеры), использовали стандартный метод, разработанный Зиеткевичем и др. [6]. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) из образцов крови овец выделяли геномную ДНК, в качестве праймеров в реакционную смесь добавляли фрагменты ди- и тринуклеотидных микросателлитных локусов (AG)<sub>9</sub>C, (GA)<sub>9</sub>C, (CTC)<sub>6</sub>C, (GAG)<sub>6</sub>C. PCR проводили на амплификаторе «Терцик, ДНК Технология» (Россия) с применением набора сухих реагентов для PCR-амплификации ДНК GenePak™ PCR Core (Изоген, Москва). Для всех образцов собирали смеси PCR-амплификации, отдельно для каждого из указанных праймеров. Условия PCR: первоначальная дена-

турация 2 мин при 95°C; денатурация при 95°C — 30 с, отжиг при 55°C — 30 с, синтез при 72°C — 2 мин (37 циклов); завершающий синтез при 72°C — 7 мин. Фракционирование продуктов амплификации проводили в 2%-м агарозном геле с применением в качестве ДНК-маркера GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, USA) для оценки длины продуктов PCR-амплификации. Визуализацию продуктов PCR-амплификации проводили под ультрафиолетовым излучением на трансиллюминаторе после окрашивания гелей бромистым этидием. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью стандартных компьютерных программ «Генерор».

### Результаты и их обсуждение

Выполнен сравнительный анализ генофондов двух групп овец эдильбаевской породы бирликского и суюндукского внутривидовых типов с использованием ISSR-PCR-маркеров. В таблице 1 представлены общие характеристики полученных спектров продуктов амплификации фрагментов ДНК (ампликонов). Каждый ампликон рассматривали как отдельный локус генома, фланкированный инвертированными повторами микросателлитных участков, применяемых в качестве праймеров в PCR.

У исследованных групп животных в спектрах, полученных с ис-

Таблица 1

**Основные параметры спектров продуктов амплификации ISSR-PCR овец эдильбаевской породы**

Праймер	Количество ампликонов в спектре	Границы длин локусов спектра, п.о.	Количество внутривидовых полиморфных локусов	
			в абсолютном выражении	% от общего числа ампликонов
(AG) <sub>9</sub> C	10	1200-280	7	70
(GA) <sub>9</sub> C	5	600-200	4	80
(GAG) <sub>6</sub> C	8	850-400	3	37,5
(CTC) <sub>6</sub> C	17	1700-280	17	100

пользованием в PCR динуклеотидных праймеров, суммарно получено меньше ампликонов, чем при применении тринуклеотидных: в спектрах (AG)9C — 10 локусов, (GA)9C — 5, (GAG)6C — 8; наибольшее количество ампликонов получено с праймером (CTC)6C — 17.

Распределение частоты встречаемости аллелей у овец бирликского и суюндукского внутривидового типа при анализе геномов методом ISSR-PCR с использованием праймера (AG)9C представлено в таблице 2. В полученных спектрах полиморфизм по наличию / отсутствию ампликона спектра выявлен по 6 из 10 локусов (60%) у суюндукского внутривидового типа и по 5 (50%) у овец бирликского внутривидового типа. Ампликоны длиной 1000, 650, 500 и 430 пар оснований (п.о.) мономорфны и встречаются у всех изученных нами животных. По полученным нами ранее данным, присутствие ампликонов размером 1000 и 650 п.о. характерно для спектров праймера (AG)9C овец породы асканийский многоплодный каракуль и таких аборигенных, выведенных народной селекцией, пород, как сокольская, кулундинская, романовская [2, 4]. Кроме того, ампликон длиной 1000 п.о. стабильно встречается

в спектре этого праймера у серой украинской породы крупного рогатого скота [1], что говорит о консервативности данного локуса.

У обоих внутривидовых типов овец эдильбаевской породы, несмотря на внутривидовый полиморфизм, с одинаковой частотой встречаются у бирликских и суюндукских овец ампликон длиной 500 п.о. и ампликон длиной 1200 п.о. Их присутствие может рассматриваться как породоспецифичная характеристика в связи с тем, что ампликоны подобной длины не были описаны ни у одной из пород овец в предыдущих исследованиях.

Интересно отметить, что ампликон размером 900 п.о., выявленный нами в 22-25% случаев у животных обоих внутривидовых типов эдильбаевской породы овец, в предыдущих исследованиях был обнаружен только у снежного барана и не наблюдался в генофондах ни у одной из описанных ранее по ISSR-полиморфизму пород домашних овец.

По локусу размером 780 п.о. был обнаружен не только внутривидовый полиморфизм, но и различная частота встречаемости этого фрагмента ДНК у изучаемых внутривидовых типов эдильбаевской овцы. Различие составляет 32%, что свидетельствует

Т а б л и ц а 2

**Распределение частоты встречаемости аллелей у овец эдильбаевской породы с использованием праймера (AG)9C**

Длина ампликона, п.о.	Внутривидовый тип				Уровень значимости	Стандартная ошибка
	бирликский		суюндукский			
	+	--	+	--		
1200	0,300	0,700	0,311	0,689	1	0
1000	1	0	1	0	1	0
950	0,233	0,767	0,204	0,796	0,6696	0,0046
900	0,220	0,780	0,258	0,742	0,6695	0,0054
780	1	0	0,776	0,224	0,1942	0,0041
650	1	0	1	0	1	0
500	1	0	1	0	1	0
430	1	0	1	0	1	0
320	0,539	0,461	0,592	0,408	0,7762	0,0023
280	0,250	0,750	0,329	0,671	0,3874	0,0057

о дифференциации этих типов по частоте встречаемости соответствующих аллельных вариантов. Локусы длиной 950 и 280 п.о. полиморфны, но частота присутствия ампликона не зависела от принадлежности животных к разным внутривидовым типам эдильбаевской овцы, однако их присутствие статистически достоверно ( $P < 0,01$ ) у обоих типов отличалось у ярок и баранов. По частотам встречаемости остальных ампликонов дифференциации между полами выявлено не была.

Данные о распределении частоты встречаемости аллелей у овец бирликского и сундукского внутривидового типа при анализе генетических структур по ISSR-PCR-спектров, полученных с использованием праймера (GA)9C, представлены в таблице 3.

Присутствие в спектрах продуктов амплификации этого праймера фрагмента ДНК длиной 600 п.о., стабильно встречающегося у овец эдильбаевской породы обоих внутривидовых типов, характерно не только для изучаемой породы, но ранее было выявлено у таких пород, как асканийский многоплодный каракуль, сокольская, кулундинская, романовская породы, а также у дикого близкородственного вида овец — снежного барана [2, 4]. Кроме того у обоих внутривидовых типов овец эдильбаевской породы встречается ампликон длиной 480-500 п.о., который в проанализированных нами исследованиях наблю-

дался только у снежного барана [2]. По фрагменту ДНК длиной 200 п.о. полиморфизм выявлен только у овец бирликского внутривидового типа. Этот вариант обнаруживается у всех сундукских овец, различия в частотах встречаемости аллелей между внутривидовыми типами достигает 32% и статистически достоверны ( $P < 0,05$ ).

Фрагмент ДНК длиной 290 п.о. у исследованных типов эдильбаевской овцы полиморфен по своему наличию / отсутствию. По ранее полученным нами данным, этот фрагмент полиморфен и в генофонде романовской породы овец. Однако романовские овцы из разных хозяйств [4] практически не отличались по частотам встречаемости этого фрагмента в отличие от внутривидовых типов эдильбаевских овец (см. табл. 3). Можно ожидать, что фрагмент ДНК длиной 290 п.о. ассоциирован с морфофункциональными отличиями этих двух внутривидовых типов.

По праймеру (GAG)6C полиморфизм выявлен только по трем локусам из восьми, что составляет 37,5%, однако ни по одному из них не обнаруживаются достоверных отличий по частоте встречаемости аллелей между внутривидовыми типами.

В спектре продуктов амплификации при применении праймера (CTC)6C выявлено 17 фрагментов ДНК. Все 17 фрагментов ДНК, фланкиро-

Таблица 3

**Распределение частоты встречаемости аллелей у овец эдильбаевской породы с использованием праймера (GA)9C**

Длина ампликона, п.о.	Внутривидовый тип				Уровень значимости	Стандартная ошибка
	бирликский		сундукский			
	+	--	+	--		
600	1	0	1	0	1	0
500	0,454	0,546	0,437	0,563	0,8218	0,0034
400	0,134	0,866	0,082	0,918	0,4207	0,0068
290	0,315	0,685	0,452	0,548	0,1374	0,0049
200	0,681	0,319	1	0	0,0503	0,0017

ванных инвертированным повтором этого микросателлита, оказались полиморфными у эдильбаевской породы, но ни по одному из них не наблюдается зависимость частоты встречаемости аллеля от принадлежности животных к определенному внутривидовому типу. В присутствии фрагментов ДНК длиной 740 и 680 п.о. с достоверностью  $P < 0,05$  и

0,001 соответственно обнаруживали отличия по частотам встречаемости у разных полов и чаще всего наблюдались в геномах ярок.

Данные о среднем уровне гетерозиготности и генетических расстояниях, рассчитанные по Nei, 1978 для бирликского и сундукского внутривидовых типов, представлены в таблице 4.

Т а б л и ц а 4

**Данные о среднем уровне гетерозиготности и генетических расстояниях для изучаемых внутривидовых типов эдильбаевской породы овец**

Праймер	Средний уровень гетерозиготности по внутривидовому типу		Генетическое расстояние между внутривидовыми типами
	бирликский	сундукский	
(AG)9C	0,200	0,285	0,0173
(GA)9C	0,435	0,228	0,0056
(GAG)6C	0,168	0,158	0,0009
(СТС)6C	0,384	0,385	0,0047

Средний уровень гетерозиготности изучаемых внутривидовых типов по спектрам праймеров (СТС)6C и (GAG)6C практически одинаков. Спектр ампликонов праймера (СТС)6C, несмотря на высокий уровень полиморфизма всех выявленных фрагментов ДНК, не отличался по распределению частот между внутривидовыми типами. По двум другим праймерам наблюдается преобладание частот встречаемости ампликонов одного внутривидового типа над другим: в спектре (AG)9C — сундукского, в спектре (GA)9C — бирликского. По частотам встречаемости продуктов амплификации, полученных с праймерами (AG)9C и (GAG)6C, животные бирликского внутривидового типа более выравнены. Можно ожидать, что более выраженная консолидированность этого типа по данным маркера обусловлена тем, что бирликский генофонд представляет меньшую часть биоразнообразия эдильбаевской породы по сравнению с сундукским типом, который остается более широким пред-

ставителем генофонда эдильбаевской породы. Средняя гетерозиготность спектра ампликонов, полученного с праймером (GA)9C у овец бирликского внутривидового типа, больше, чем у сундукских.

Можно ожидать, что выявленные нами фрагменты ДНК, по частотам встречаемости которых обнаруживается дифференциация между двумя внутривидовыми типами эдильбаевской овцы, в наибольшей степени подвергались селекционному давлению в процессе селекционной работы по их совершенствованию.

**Заключение**

Бирликский и сундукский внутривидовые типы овец эдильбаевской породы отличаются не только по уровню шерстной и мясной продуктивности, но и по спектрам продуктов амплификации ISSR-PCR, в частности, частотой встречаемости фрагментов ДНК длиной 780 п.о. в спектре продуктов амплификации ISSR-PCR, полученному с праймером (AG)9C, и фрагментам длиной

200 и 290 п.о. в спектрах праймера (GA)<sub>9</sub>C. Обнаружены статистически достоверные половые отличия по частотам встречаемости отдельных фрагментов ДНК в ISSR-PCR-спектрах, полученных с праймерами (AG)<sub>9</sub>C и (CTC)<sub>6</sub>C.

Уникальные особенности эдильбаевской породы овец подтверждаются вы-

раженными генофондными отличиями по ISSR-PCR-маркерам между эдильбаевской овцой и группой ранее исследованных пород овец по присутствию фрагментов ДНК, типичных для снежного барана, длиной 900 п.о. в спектре праймера (AG)<sub>9</sub>C и длиной 480-500 п.о. в спектре праймера (GA)<sub>9</sub>C.

### Библиографический список

1. Глазко В.И., Столповский Ю.А., Феофилов А.В., Кол Н.В. Распределение фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами ди- и тринуклеотидных микросателлитов, в геномах серого украинского скота // Известия ТСХА, 2009. № 1. С. 155-162.
2. Дымань Т.Н., Городная А.В., Тарасюк С.И., Сипко Т.П., Кушнир А.В., Глазко В.И. Участие маркеров структурных генов и анонимных последовательностей ДНК в генетической дифференциации у видов рода *Ovis aries hircus borealis* // Цитология и генетика, 2000. № 6. С. 49-59.
3. Ельсукова И.А., Юлдашбаев Ю.А., Сычева И.Н. Сравнительная характеристика мясной продуктивности баранчиков бирликского и суондукского внутрипородных типов эдильбаевской породы овец // Овцы, козы, шерстное дело, 2010. № 4. С. 44-51.
4. Столповский Ю.А., Кол Н.В., Лапшин А.В., Сулимова Г.Е., Глазко В.И. Полиморфизм молекулярно-генетических маркеров у овец романовской породы // Известия ТСХА, 2008. № 2. С. 48-54.
5. Юлдашбаев Ю.А., Магомадов Т.А., Двалишвили В.Г., Гишларкаев Е.И., Ельсукова И.А. Продуктивность эдильбаевских овец в условиях Нижнего Поволжья // Доклады ТСХА, 2010. Вып. 282. С. 919-922.
6. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, 1994. 20. P. 176-183.

Рецензент — д. б. н. А.Г. Маннапов

### SUMMARY

In this article amplification products' spectra of DNA fragments flanked by inverted microsatellite repeats by using of di- and trinucleotide primers were analysed. Data was obtained for birlik and suinduk intrabreed types of edilbay sheep. We found differences between genetic structures of two intrabreed types and also sex differences were revealed.

**Key words:** ISSR-PCR, inverted repeats, edilbay sheep, intrabreed types.

**Ельсукова Ирина Александровна** — аспирант кафедры овцеводства и козоводства РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Эл. почта: irina-els@rambler.ru.

**Феофилов Антон Владимирович** — аспирант центра нанобиотехнологий РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Эл. почта: foton87@yahoo.com.

**Юлдашбаев Юсуп Артыкович** — д. с.-х. н. Эл. почта: zoo@timacad.ru.

**Глазко Валерий Иванович** — д. с.-х. н. Эл. почта: vglazko@yahoo.com.