

УДК 636.082.12:636.933.2

ПОЛИМОРФИЗМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ У ОВЕЦ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ

Ю.А. СТОЛПОВСКИЙ*, А.В. ЛАПШИН, Н.В. КОЛ, Г.Е. СУЛИМОВА*, В.И. ГЛАЗКО

С использованием оценок полиморфизма различных участков ДНК (электрофоретических вариантов белков, ISSR-PCR маркеров) выполнены исследования генетической структуры овец романовской породы. Суммарно обнаружен высокий уровень гетерозиготности, оцениваемый по разным типам молекулярно-генетических маркеров.

Романовская овца относится к породам мясо-шубного направления продуктивности, к группе короткостебельных пород. Романовская порода выведена народной селекцией в бывшем Романово-Борисоглебском уезде Ярославской губернии (теперь Тутаевский район Ярославской обл.) в конце XVII века [1].

В этой уникальной отечественной породе совмещаются самая высокая среди пород овец плодовитость, хорошие мясные качества и скороспелость с высококачественной овчиной. Широкое распространение овцы романовской породы находят в странах с развитым овцеводством [4, 5]. Во Францию впервые они были завезены в 1962-1964 гг. [8], к 90-м годам порода была представлена около 2 тыс. чистопородных романовских овец. Одно из ведущих селекционных стад находится на опытной станции Национального института сельскохозяйственных исследований. Породу широко используют для скрещивания как повышающую плодовитость. С романовскими баранами скрещивают маток пород берришон-дюшер, шармауз, иль-де-франс. У полукровок плодовитость достигает 200%, у помесей $F_2 \{I/i\}$ крови романовской породы) — 148%-

В Испании работы по скрещиванию аррагонских маток с романовскими ба-

ранами ведутся с 1974-1975 гг. Помесные животные достигают половой зрелости к 5-месячному возрасту. Плодовитость помесей, допущенных к скрещиваниям в возрасте 5-6 мес, составляет при первом ягнении в возрасте 9-10 мес 145%, в возрасте 12-13 мес — 162, в 14-15 мес — 172, при втором ягнении — 174, при третьем — 219%. В Венгрию романовские овцы были завезены в 1973 г. Их используют при создании новых пород для повышения полиэстричности и плодовитости. Животные желательного типа с 18-25% крови романовской породы имеют достаточно густую и однородную шерсть толщиной 23-25 мкм. Живая масса их достигает 55-58 кг, настриг — 6,4 кг, плодовитость — 178-186%. В Чехию романовские овцы завезены в 1974 г. Их широко используют для скрещивания с местными овцами с целью повышения плодовитости. Разводят романовских овец в Голландии, Канаде.

Особый интерес к романовской породе обусловлен тем, что матки отличаются высокой плодовитостью (220-250 ягнят на 100 маток) и полиэстричностью. В связи с повышенной плодовитостью разведение романовских овец «в чистоте» и при скрещивании с другими породами оказывается экономически выгодным. Наряду с уве-

* Институт общей генетики РАН имени Н.И. Вавилова.

личением выхода ягнят скрещивание овец с романовскими баранами способствует раннему наступлению половой зрелости у потомства.

Большой экономической ущерб романовскому овцеводству наносят легочные заболевания ягнят. У взрослых овец заболевание выражается катаральной пневмонией и плевритом. Овцы романовской породы различаются по степени резистентности к легочным заболеваниям. Реже подвергались заболеванию ягнята, которые имели белую пегость на шее.

Я.Л. Глембоцкий и Р.А. Гептнер установили, что интенсивная селекция на отсутствие пегости у романовских овец, то есть на элиминацию генов этой пегости, в силу плейотропного их действия или сцепления с генами, влияющими на резистентность к бронхоплевропневмонии, приводит к резкому ослаблению устойчивости романовских овец без «галстука» к этому заболеванию. Селекция на устранение пегости, которая осуществлялась в романовском овцеводстве, приводила к снижению резистентности животных и способствовала распространению пневмонии [2].

Несмотря на то, что романовская овца пользуется широкой популярностью в основных овцеводческих странах, в России численность овец этой породы постоянно снижается [4, 5]. Это приводит к очевидной необходимости особого внимания к генетической структуре отечественного поголовья овец романовской породы.

В целях исследования генетической структуры романовских овец в настоящей работе выполнен анализ животных этой породы с использованием молекулярно-генетических маркеров полиморфизма различных участков ДНК (электрофоретические варианты белков, фрагменты ДНК, фланкированные инвертированными повторами динуклеотидных микросателлитных локусов).

Материалы и методы

Исследования выполняли на 4 группах овец романовской породы хозяйств Ярославской обл. «Земледелец» (54 гол.), «Родина» (53 гол.) и хозяйств Ивановской обл. «Исхаково» (49 гол.) и «Нива» (53 гол.).

Полиморфизм электрофоретических вариантов белков рассматривался по таким транспортным белкам как трансферрин (ТФ), гемоглобин (НВВ); ферментам метаболизма экзогенных субстратов лейцинаминопептидазе (LAP), эстеразе (EST), регуляторному локусу лактатдегидрогеназы (LDR) и ферменту, участвующему в антиоксидантной системе, диафорезе (DP). В работе использовали стандартные условия выявления электрофоретических вариантов белков в полиакриламидных и крахмальных гелях и тестирования генотипов, описанные нами ранее [3].

В качестве маркеров полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов (ISSR-PCR маркеры), использовали стандартный метод, разработанный Зьеткевичем и др. [7]. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) из образцов крови овец выделяли геномную ДНК [3], в качестве праймеров в реакционную смесь добавляли фрагменты динуклеотидных микросателлитных локусов (GA)_nC и (AG)_nC. ПЦР проводили на амплификаторе «Перцик, ДНК Технология» (Россия) с использованием набора GenePak™ PCR Core (IsoGene, Москва). Реакцию проводили в следующем режиме: начальная денатурация — 2 мин при 94°C; 30 циклов: 30 с при 94°C, 30 с при 55°C, 2 мин при 72°C; терминальная элонгация — 10 мин при 72°C; охлаждение до 4°C.

Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 2%-м агарозном геле. Визуализацию результатов электрофореза проводили под ультрафиолетовым излучением на транс-

иллюминаторе после окрашивания гелей бромистым этидием. Для определения молекулярных масс продуктов амплификации был использован маркер молекулярных масс Gene Ruler ЮОбр™, DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, USA).

Результаты обрабатывали с использованием стандартных компьютерных программ «Genepop».

Результаты и их обсуждение

В результате выполненных исследований у овец романовской породы выявлено 5 аллельных вариантов по локусу трансферрина, среди которых преобладали аллельные варианты TfC и TfD (TfA — 0,038; TfB — 0,077; TfC — 0,593; TfD — 0,287; TfE — 0,005). По локусу гемоглобина с преобладающей частотой встречался аллельный вариант HbA (HbA — 0,703, HbB — 0,297), что, по полученным нами ранее данным, типично для овец с относительно повышенной плодовитостью [7].

У исследованной группы овец примерно с равной частотой встречались аллельные варианты H и L по регуляторному локусу лактатдегидрогеназы, детерминирующие высокую и низкую активность субъединицы A этого фермента (LdrH — 0,467; LdrL — 0,533). По локусу лейцинаминопептидазы с более высокой частотой встречался медленно мигрирующий аллельный вариант (LapA — 0,298; LapB — 0,702); по локусу диафоразы — наоборот, быстрый аллельный вариант (DpF — 0,800; DpS — 0,200). По локусу эстеразы обнаруживалась более высокая частота встречаемости аллельного варианта A (EstA — 0,670; EstB — 0,330), и это был единственный локус из 6 рассмотренных, по которому обнаруживалось статистически достоверное ($P < 0,05$) отклонение от равновесного состояния в сторону дефицита гетерозигот. По этим полиморфным локусам средний уровень гетерозиготности у исследованных овец романовской по-

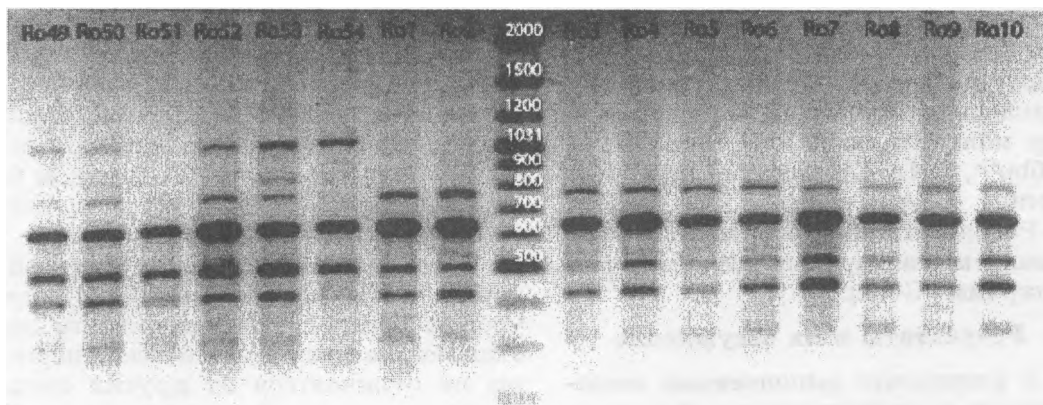
роды был 0,439 (S.E. 0,025). Следует отметить, что по полученным нами ранее данным, по тем же самым генетико-биохимическим системам уровень средней гетерозиготности у романовской овцы оказывается близким к наблюдаемому у таких пород овец, как сокольская 0,405 (S.E. 0,079), но несколько выше, чем у кулундинской породы 0,350 (S.E. 0,079) [3]. То есть по уровню средней гетерозиготности по этим локусам овцы романовской породы не отличаются от других овец аутохтонных пород, исследованных нами ранее.

Генетическая структура романовской овцы была исследована также с использованием оценок полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами фрагментов динуклеотидных микросателлитных локусов (GA)_n и (AG)_nC.

Использование в качестве праймеров динуклеотидных повторов позволило получать спектры продуктов амплификации (ампликонов), длина которых варьировала от 2200 до 200 пар оснований (п.о.) (рисунок).

Весь спектр продуктов амплификации условно можно было подразделить на три части: область «тяжелых» фрагментов, от 2200 до 1300 п.о., включавшая наиболее длинные фрагменты ДНК; далее от 600 до 200 п.о. — наиболее короткие фрагменты ДНК; и часть спектра, в которой были представлены промежуточные по размеру фрагменты ДНК, наиболее надежно воспроизводимые при разных условиях амплификации, и наиболее удобные для генотипирования животных. В дальнейшем в анализ не включали ампликоны, молекулярная масса которых была больше, чем 1300 п.о. в связи с тем, что в части спектра с длинными фрагментами ДНК наиболее велика вероятность ошибок генотипирования животных.

При сравнении спектров продуктов амплификации, полученных с исполь-



Пример спектров продуктов амплификации, полученных с использованием в качестве праймера последовательности (AG)₉C в полимеразной цепной реакции на геномной ДНК овец романовской породы.

Дорожка в центре - маркер молекулярных масс; цифрами указаны длины фрагментов ДНК в парах оснований. На каждой дорожке представлен спектр продуктов ампликации фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором последовательности (AG)₉C, полученный на геномной ДНК, выделенной из клеток крови индивидуальных овец хозяйства «Земледелец» Ярославской обл.

зованием в качестве праймеров последовательностей (GA)₉C и (AG)gC было обнаружено, что спектры ампликонов, фланкированных инвертированным повтором (AG)gC, преимущественно состоят из фрагментов ДНК «средних» длин (от 1300 до 600 п.о.), а полученные с использованием в качестве праймера последовательности (GA)gC — из «коротких» фрагментов ДНК (от 600 до 200 п.о.).

Среди продуктов амплификации, полученных при использовании в ПЦР в качестве праймера последовательности (AG)₉C, наиболее надежно выявлялись 13 ампликонов, каждый из которых в дальнейшем рассматривался как отдельный локус. В спектре продуктов амплификации, полученных при использовании в качестве праймера последовательности (GA)₉C, выполнялось гентотипирование животных по 8 фрагментам ДНК (локусам), длина которых варьировала от 600 до 200 п.о.

Выполнен расчет индекса PIC (polymorphic information contents) по формуле Botsteina et al. [6] для диаллельных локусов, для которых $PIC = -2f(1-f)$, где f — частота одного из двух аллелей. Поскольку маркеры ISSR-PCR имеют доминантный характер наследования по присутствию продукта амплификации, f рассчитывали по частоте рецессивного аллеля исходя из доли носителей рецессивных гомозигот среди исследованных животных соответственно по формуле V_{R^2} , где R — количество носителей рецессивных гомозигот, деленное на количество исследованных животных.

Индекс PIC характеризует уровень ожидаемой гетерозиготности локусов — продуктов амплификации, исходя из представлений о том, что по каждому локусу исследованная группа животных находится в равновесном состоянии, соответствующем закону Харди-Вайнберга. Полученные величины PIC для каждого локуса спектра

усредняли по всем ампликонам спектров одного праймера у исследованных групп животных.

Уровень средней гетерозиготности по 8 ампликонам, фланкированным инвертированным повтором последовательности (GA)₉C, практически не отличался у овец из разных хозяйств (0,355 — 0,359). Оказалось также, что у большинства животных в полученных спектрах присутствуют ампликоны длиной в 580-550 и 290 — 260 п.о. То есть по присутствию этих фрагментов исследованные животные из разных хозяйств были наименее изменчивы.

Интересно отметить, что фрагмент длиной около 600 п.о. был обнаружен нами как постоянно присутствовавший в спектрах ампликонов, полученных при использовании этого же праймера (GA)₉C у кулундинской овцы, снежного барана и асканийского многоплодного каракуля [3]. Следует подчеркнуть, что при формировании асканийского многоплодного каракуля использовался, в частности, генофонд и романовской овцы.

В спектрах продуктов амплификации, полученных с последовательностью праймера (AG)₉C, с высокой частотой присутствовали фрагменты ДНК длиной около 1000 п.о. (у овец хозяйства «Родина» — у 52 из 52, «Исхаково» — у 16 из 26; «Земледелец» — у 43 из 54; «Нива» — у 53 из 53 животных), а также фрагмент длиной около 600 п.о. (у овец хозяйства «Родина» — у 52 из 52, «Исхаково» — у 26 из 26; «Земледелец» — у 44 из 54; «Нива» — у 51 из 53 животных). Фрагменты такой же длины были выявлены нами ранее как общие и при исследовании спектров ампликонов, полученных с тем же праймером, у кулундинской овцы, снежного барана и асканийского многоплодного каракуля [3].

Расчет PIC по спектру продуктов амплификации, полученных с использованием в качестве праймера после-

довательности (AG)₉C, показал, что уровень ожидаемой средней гетерозиготности фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором этой последовательности, несколько ниже, чем при использовании в качестве праймера последовательности (GA)₉C. Так, расчетная гетерозиготность по спектрам, полученным с последовательностью (AG)₉C у овец хозяйства «Родина» была 0,267; «Исхаково» — 0,312; «Земледелец» — 0,264 и «Нива» — 0,374.

Известно, что романовские овцы и их помеси отличаются относительно высоким процентом гибели животных. В 1982 г. в стаде Национального института сельскохозяйственных исследований (Франция) отход и выбраковка животных составляли 33,8%. В дальнейшем этот показатель удалось снизить до 23%. Ежегодный падеж взрослых маток от болезней составляет 4,6%. Повсеместно отмечают восприимчивость романовских овец к легочным болезням и медленным инфекциям. Путем укрепления конституции и селекции на устойчивость к маэди-висна и скрепи во Франции удалось вывести устойчивые родственные группы (проводили поголовное заражение с последующим отбором устойчивых животных и разведением их в себе). Падеж в этих группах в первые 5 дней после рождения составляет 11,2%, а в остальной период выращивания — от 9,4 до 13,9% [2]. Следует отметить, что в первые дни после рождения 9% падежа обусловлены врожденными дефектами. Врожденные дефекты чаще встречаются в многоплодных пометах (5 ягнят и более) и могут быть следствием дефектов полости матки матерей. Французские исследователи отмечают, что на отход ягнят большое влияние оказывает возраст матерей. Самый низкий отход наблюдается у потомства матерей 2-4-летнего возраста.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что уровень внутри-

и межгрупповой генетической гетерогенности у исследованных групп достаточно высок как по доле полиморфных локусов, так и величинам средней гетерозиготности (наблюдаемой по электрофоретическим вариантам транспортных белков и ферментов; ожидаемой по полиморфизму фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов). Относительно высокий уровень генетической гетерогенности позволяет предполагать наличие возможностей для успешной селекции среди сохранившихся романовских овец для получения линий и групп животных с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды. Можно ожидать, что генотипирование животных с использованием молекулярно-генетических маркеров будет способствовать контролю, коррекции и, таким образом, ускорению селекционной работы в этом направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Васин Б.Н.* Генетика овец. В 4 кн. М., 1928-1932. — 2. *Дубинин Н.П., Глембоцкий Я.Л.* Генетика популяций и селекция. М.: Наука, 1967. — 3. *Дымить Т.Н., Городная А.В., Тарасюк С.И. и др.* Участие маркеров структурных генов и анонимных последовательностей ДНК в генетической дифференциации у видов рода *Ovis aries hircicola borealis* // Цитология и генетика, 2000. № 6. С. 49-59. — 4. *Ероосин А.И., Карасев Е.А., Ерохин С.А.* Романовская порода овец: состояние, совершенствование, использование генофонда. М.: Росинформагротех, 2005. — 5. *Эрнст Л.К., Дмитриев Н.Г., Паронян И.А.* Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных в России и сопредельных странах / ВНИИГРЖ, СПб, 1994. — 6. *Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W.* // *AmJ.Hum. Genet.*, 1980. Vol.32. P.314-331. — 7. *Glazko V.I., Owen J.B., Dewi Ap I., Ax ford R.F.* // *Animal Science*, 1997. V. 64. P. 279—282. — 8. *Hochereau-de Reuters MT, Perreau C, Pisselet C et al.* // *Domest Anim Endocrinol*, 1990. Vol.7. N1. P.63-73. — 9. *Zietkiewicz E., Rafals M A., Labuda D.* // *Genomics*, 1994. 20. P.176—183.

Рецензент — д. б. н. Г.Д. Афанасьев

SUMMARY

The investigation of genetic structure of Romanov's sheep with the use of molecular-genetic markers (electrophoretic protein variants, ISSR-PCR markers) was carried out. In summary, the comparative high level of average heterozygosity on the different type molecular-genetic markers was revealed.