

## АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ D-ПЕТЛИ мтДНК У ОВЕЦ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ

**Н.Ф. БАКОЕВ, Л.В. ГЕТМАНЦЕВА, С.Ю. БАКОЕВ, О.В. КОСТЮНИНА**

ФГБНУ Федеральный научный центр животноводства –  
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста

*Получены данные о нуклеотидной последовательности D-петли мтДНК длиной 1179 п.н. (между позициями 15437 – 16616) у овец романовской породы.*

*Ключевые слова:* генетическое разнообразие, овцы, романовская порода, мтДНК, гаплогруппа.

На сегодняшний день в Российской Федерации доля агропромышленного комплекса в общем объеме ВВП страны составляет около 6 %. Ключевыми компонентами являются растениеводство, на долю которого приходится около 52 % и животноводство, доля которого составляет 48 %, при этом доля животноводства постепенно растет [1, 2]. Основными отраслями животноводства являются птицеводство, свиноводство, скотоводство и овцеводство. По разнообразию производимой продукции овцеводство является лидером относительно других отраслей продуктивного животноводства [2, 3]. Особый интерес представляют породы овец отечественной селекции, так как они являются не только культурным наследием зоотехнических достижений, но их сохранение и совершенствование тесно связано с развитием сельского хозяйства [4, 5]. Ключевыми моментами в данном случае являются исследования генетической структуры отечественных пород овец на основе молекулярно-генетических методов. В частности, исследование полиморфизма митохондриальной ДНК является одним из эффективных подходов к оценке генетического разнообразия [5, 6].

Митохондриальный геном представлен кольцевой молекулой ДНК (мтДНК). В начале репликации молекулы мтДНК образуется D-петля (от англ. displacement loop – петля смещения) – наиболее вариативный участок, на основании которого проводят многие классификационные анализы [6, 7, 8].

На сегодняшний день считается, что основной причиной разнообразия жизненных форм связано с мутациями генетического кода. Произвольный фрагмент любого участка ДНК, с учетом имеющихся нуклеотидных вариантов, можно представить как гаплотип. Набор родственных гаплотипов, происходящих от одного предка, называют гаплогруппой. На основании исследования различных пород у овец установлено пять гаплогрупп (А, В, С, D и E) [9, 10, 11].

Романовская порода была выведена в конце 17 века, в Романо-Борисоглебском уезде Ярослав-

ской области, методом народной селекции. Овцы отличаются высокой плодовитостью, полиэстричностью, а также овчиной очень высокого качества [12]. Благодаря своим особенностям, романовская порода представляет интерес для племенного овцеводства не только в России, но и за ее пределами.

Цель работы заключалась в изучении генетического полиморфизма овец романовской породы на основе исследования нуклеотидной последовательности D-петли митохондриальной ДНК, а также в определении их принадлежности к гаплогруппам.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проведены в лаборатории молекулярных основ селекции Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» в рамках выполнения задания Федерального агентства научных организаций (ФАНО) №АААА-А18-118021590138-1. Материалом для исследования служили пробы биологического материала (ушной выщип) овец романовской породы (n = 20). Подбор праймеров для амплификации фрагмента мтДНК области D-петли длиной 1352 пар оснований проводили в соответствии с последовательностью мтДНК овец, представленной в базе NCBI (NC\_001941.1). ПЦР продукты определяли в 1,5 % агарозном геле. Для очистки ПЦР фрагментов использовали набор Cleanup Mini (ООО «Синтол»). Нуклеотидную последовательность D-петли мтДНК определяли методом секвенирования (ООО «Евроген»). Редактирование и выравнивание последовательностей проводили при помощи программ BioEdit v7.2.6 и MEGA 7. В качестве референсной использовали последовательность NCBI Accession NC\_001941.1. Оценку генетического разнообразия исследуемых овец определяли по количеству гаплотипов (H), гаплотипическому (HD) и нуклеотидному ( $\pi$ ) разнообразию, среднему количеству нуклеотидных замен на сайт (k) с использованием программы DnaSP 5.10. Для определения принадлежности исследуемых овец к гаплогруппам из базы NCBI были выбраны последовательности D-петли мтДНК, относящиеся к гаплогруппам А (DQ852286), В (DQ852282), С (DQ852284), D (DQ852288) и E (DQ852280).

**Результаты исследования.** Для амплификации D-петли мтДНК длиной 1352 п.н. были использованы праймеры: F 5' - GGT CTT GTA AAC CAG AGA

	96	219	220	221	265	275	285	291	347	366	371	391	393	399	422	440	445	487	498	507	525	535	549	567	713	741	870	912	921	957	965	975	994	1009	1112	1167	
H 1	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	
H 2	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	
H 3	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	
H 4	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H 5	T	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	
H 6	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	
H 7	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	C	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.
H 8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	
H 9	.	.	A	.	C	T	.	C	.	C	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	
H 10	.	.	A	.	.	T	.	C	.	C	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	
H 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.

Рис. 1. Положения полиморфных нуклеотидов, определяющих 11 гаплотипов у овец романовской породы

AGGAG - 3' и R 3' - TGGAGT CAG TAGACT CAT CTA GG - 5' при температурном режиме: 94°C в течение 3 мин., далее 33 цикла при 94°C – 30 с, 58°C – 30 с и 72°C – 1,5 мин., заключительный этап 72°C в течение 5 мин. После секвенирования амплифицированных фрагментов и выравнивания последовательностей была определена первичная структура нуклеотидов D-петли мтДНК длиной 1179 п.н. (между позициями 15437 – 16616). По результатам анализа нуклеотидных последовательностей было определено 36 полиморфных сайтов, образующих 11 гаплотипов (рис.1). Гаплотипическое (HD) и нуклеотидное (π) разнообразие составило 0,842 и 0,00657 соответственно при среднем количестве нуклеотидных замен на сайт (k) 7,711.

Сравнительный анализ показал, что у всех исследуемых овец романовской породы, относитель-

но референсной последовательности, установлены одинаковые замены в 5 позициях (табл.1).

В трех позициях (15800, 15820 и 16128) у овец романовской породы определен нуклеотид Т, в то время как в референсной последовательности в этой позиции расположен нуклеотид С. В позиции 16343 наоборот, в изучаемой группе определен нуклеотид С, в референсной – Т и в позиции 16344-16345 в из-

Таблица 1

Полиморфные сайты у овец романовской породы

Позиция	Референсная последовательность	Исследуемая группа
15532	C	C9/11T
15721	T	T2/18C
15783	C	C3/17T
15800	C	T20
15820	C	T20
15881	G	G8/12A
15961	C	C9/11T
15971	T	T7/13C
16128	C	T20
16343	T	C20
16344-16345	-	C20
16401	G	G8/12A
16411	G	G7/13A
16473	T	T2/18-

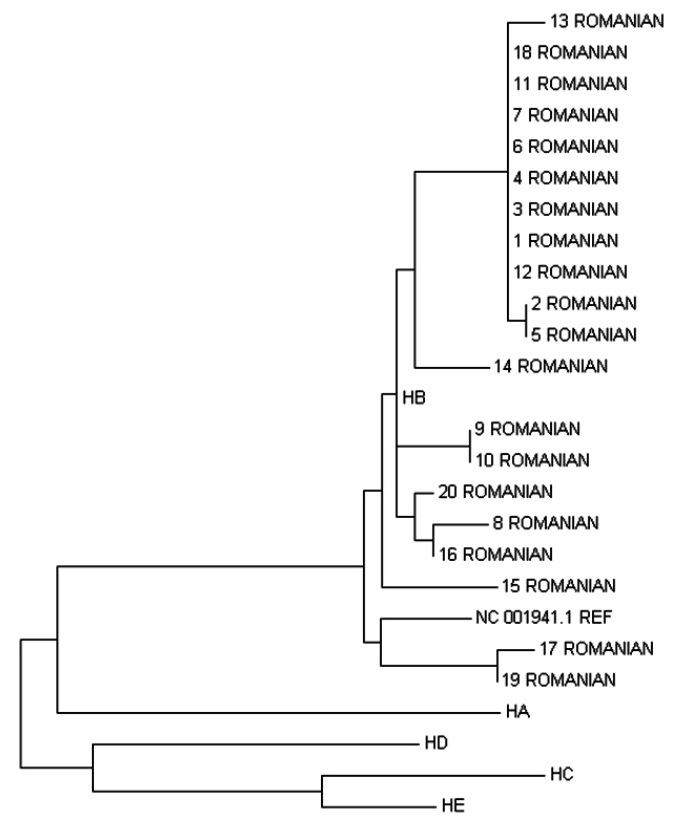


Рис. 2. Филогенетические отношения между исследуемыми овцами романовской породы и гаплогруппами А, В, С, D, Е построены с использованием метода максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней.

учаемой группе установлена вставка в виде одного нуклеотида С. Все остальные полиморфные сайты характеризуют внутривидовые различия исследуемого поголовья.

Результаты исследований показали, что все овцы исследуемой группы относятся к гаплогруппе В, что является характерным для европейских домашних овец и муфлона (рис. 2).

Согласно результатам исследований Hiendleder et al. [11], к гаплогруппе А в основном относятся породы овец азиатских стран, а также Австралии и Новой Зеландии. Гаплогруппа С встречается реже и обнаружена у домашних овец в Португалии, Турции, Китае и на Кавказе [9]. Гаплогруппа D установлена у овец в Румынии и на Кавказе. Наиболее редкая гаплогруппа Е определена у турецких пород овец [13].

**Выводы.** В результате проведенных исследований были получены данные о нуклеотидной последовательности D-петли митохондриальной ДНК у овец романовской породы. Все исследуемые животные принадлежали к гаплогруппе В. Сравнительный анализ с референсной последовательностью показал 5 сайтов, характерных только для овец исследуемой группы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ефимова, Н.И. Качественная оценка мясной продуктивности молодняка овец разного происхождения / Н.И. Ефимова, Г.В. Завгородняя, С.Н. Шумаенко, А.И. Штельмах // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2012. – № 2. – С. 45.

2. Колосов, Ю.А. Некоторые общие и частные проблемы отрасли (на примере овцеводства Ростовской области) Овцы, козы, шерстяное дело. – 2004. – № 4 – С. 5-7.

3. Гетманцева, В.В. Анализ влияния комбинирования материалов на форму и конструкцию меховой одежды / В.В. Гетманцева, Е.Г. Андреева, Н.В. Мурашова, М.А. Корячихина // В сб.: Актуальные вопросы научных исследований сборник научных трудов по материалам XI Международной научно-практической конференции. Научно-исследовательский центр «Диалог». 2017. – С. 5-8.

4. Kolosov, Yu. Sheep Breeding Resources in Rostov Region / Yu. Kolosov, L. Getmantseva, N. Shirockova // World Applied Sciences Journal. – 2013. – 23(10). – P. 1322-1324.

5. Марзанов, Н.С., Сохранение биоразнообразия. Генетические маркеры и селекция животных / Н.С. Марзанов, Ю.В. Саморуков, Г.В. Ескини // Сельскохозяйственная биология. – 2006. – № 4. – С.3-19.

6. Сулимова, Г.Е., Мониторинг генофондов популяций животных в связи с задачами селекции и изучения филогении / Г.Е. Сулимова, Ю.А. Столповский, М.Н. Рузина, И.А. Захаров-Гезехус // Биоразнообразие и динамика генофондов, Москва. – 2008. – С. 211-214.

7. Fan, H., Complete Mitochondrial Genome Sequences of Chinese Indigenous Sheep with Different Tail Types and an Analysis of Phylogenetic Evolution in Domestic Sheep / H. Fan, F. Zhao, C. Zhu, F. Li, J. Liu, L. Zhang, C. Wei, L. Du // Asian Australas. J. Anim. Sci. 2016. – 29 (5): 631-639.

8. Reicher, S. Ovine mitochondrial DNA sequence variation and its association with production and reproduction traits within an Afec-Assaf flock1 / S. Reicher, E. Seroussi, J.I. Weller, A. Rosov, E. Gootwine // J. Anim. Sci. 2012. 90: 2084-2091.

9. Tapio, M. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas / M. Tapio, N. Marzanov, M. Ozerov, M. Cinkulov, G. Gonzarenko, T. Kiselyova // Mol Biol Evol. 2006. 23: 1776-1783.

10. Meadows, J.R.S. Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. Heredity / J.R.S. Meadows, S. Hiendleder, J.W. Kijas. – 2011. 106: 700-706.

11. Hiendleder, S. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: NoEvidence for contributions from Urial and Argali sheep / S. Hiendleder, K. Mainz, Y. Plante, H. Lewalski // Journal of Heredity. 1998. 89: 113-120.

12. Ерохин, А.И. Романовская порода овец / А.И. Ерохин, Е.А. Карасев. – М.: Изд-во МГУП, 2001. – 119 с.

13. Gorkhali, N.A. Mitochondrial DNA Variation in Indigenous Sheep (Ovis aries) Breeds of Nepal Tropical / N.A. Gorkhali, J.L. Han, Y.H. Ma // Agricultural Research. 2015. 26 (4): 632-641.

*Data on the nucleotide sequence of the D-loop of mtDNA length 1179 bp were obtained (between positions 15437 - 16616) in the sheep of the Romanov breed.*

**Key words:** genetic diversity, sheep, Romanov breed, mtDNA, haplogroup.

**Бакоев Некруз Фарходович**, мл. науч. сотрудник, e-mail: nekruz82@bk.ru

**Гетманцева Любовь Владимировна**, канд. с.-х. наук, вед. науч. сотрудник, e-mail: ilonaluba@mail.ru

**Бакоев Сирождин Юсуфович**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, e-mail: siroj1@yandex.ru

**Костюнина Ольга Васильевна**, доктор биол. наук, зав. лабораторией, e-mail: kostolan@yandex.ru