



*Романовская
порода овец, ISSR-
фингерпринтинг,
генетическое сходство,
породоспецифические
и видоспецифические
признаки*

*Romanov breed of sheep,
ISSR-fingerprinting,
genetical resemblance,
breed-specific
and species-specific
signs*

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ БАРАНОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА (ISSR-ФИНГЕРПРИТИНГА)

А.В. Ильина

к.с.-х.н., заведующая лабораторией иммуногенетики и биотехнологии ГНУ Ярославского НИИЖК Россельхозакадемии
Ю.В. Муштукова (фото)

аспирант кафедры зоотехнии ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА»
О.А. Хуртина

с.н.с. лаборатории иммуногенетики и биотехнологии
ГНУ Ярославского НИИЖК Россельхозакадемии

Генофонд овец романовской породы является носителем определенных признаков и свойств. Он формируется в процессе длительного эволюционного развития и его разнообразие далеко неслучайно. Даже частичное снижение этого разнообразия отрицательно отражается на состоянии популяции, последствия же этого для селекции будущего вряд ли можно сейчас представить [1].

Для принятия решений по вопросам сохранения и рационального использования генофонда сельскохозяйственных животных необходимым является использование ДНК-маркеров.

В генетико-селекционных исследованиях большое значение имеет анализ популяции, изучение их гетерогенности, дифференциация и идентификация пород. Использование молекулярных маркеров значительно расширяет возможности генетического анализа популяций, позволяет установить меж- и внутривидовую вариабельность отдельных участков генома и составить представление о генетической структуре породы.

Анализ межмикросателлитного полиморфизма – ISSR-анализ или, как его еще иногда называют, – ISSR-фингерпринтинг, позволяет определять генетический полиморфизм непосредственно на уровне гено-типа. Этот метод показывает, что разные типы ISSR-маркеров имеют разный уровень разрешающей способности и, соответственно, должны дифференцированно использоваться при оценке уровня межпопуляционного или внутривидового полиморфизма.

Целью нашей работы было изучение геномного профиля баранов-производителей романовской породы. Для достижения поставленной цели был определен уровень генетического разнообразия, основанный на проведении анализа спектров ISSR (Inter-

simplesequencerepeats) – полиморфизма. При использовании праймера $(GA)_9C$ охарактеризован геномный полиморфизм по частоте встречаемости фрагментов, рассчитан коэффициент генетического сходства внутри группы и внутри линий.

Методика

Материалом для проведения исследований послужили пробы биологического материала (кровь) 21 барана-производителя романовской породы, имеющих в 8 ведущих генофондных стадах и стадах племрепродукторов Угличского района Ярославской области: ООО «Агрофирма «Авангард», ООО «Агрофирма «Вперед», ООО «Родина», ООО «Дружба», ООО «Агрофирма «Заречье», ООО «Путь Ленина», ООО «Красный Перекоп», ООО «Агрофирма «Земледелец».

Исследовательские работы проводились согласно методике Л. А. Калашниковой и др. [2] и Н.А. Зиновьевой и др. [3]. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) из образцов крови выделяли лейкоциты (рабочим раствором ТЕ), затем выделяли геномную ДНК фенольно-альдегидным методом. ПЦР проводили на амплификаторе АМПЛИ-4 (Biokom, Москва) с применением набора сухих реагентов для ПЦР-амплификации ДНК GenePактmPCRCore («Изоген», Россия). Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле с применением в качестве маркера молекулярных масс GeneRuler™ 100bp DNA LadderPlus («МВІ Fermentas», США). Визуализацию результатов электрофореза проводили под УФ-излучением на трансиллюминаторе после окрашивания гелей бромистым этидием. Для определения размера продуктов амплификации использовали программу «UN-SCAN-IT gel 5.1 SilkScientific». Статистическую обработку результатов исследования проводили путем перевода изображения на геле в специальную матрицу, где

наличие полосы обозначается как «1», а отсутствие – как «0». Расчеты популяционно-генетических параметров проводились методом пермутации данных с помощью программы Gelstats™.

Результаты исследований

С помощью ISSR-маркера $(GA)_9C$ были выявлены спектры фрагментов ДНК с молекулярной массой: от 260 до 640 п.н. (8 аллелей). Выявленные сочетания аллелей структурных генов, полилокусных спектров последовательностей ДНК позволили дифференцировать породу, выделить породоспецифические признаки, характерные для романовской породы. Надо отметить, что чем больше полиморфных аллелей, тем генетическое разнообразие выше.

В процессе исследований рассчитан коэффициент генетического сходства внутри группы (табл. 1). Наиболее высокий коэффициент генетического сходства наблюдается в стадах ООО «Агрофирма «Вперед» (0,8), ООО «Агрофирма «Земледелец» (0,75), ООО «Агрофирма «Заречье» (0,62). Такой показатель говорит о соответствии породности среди тестируемых животных и генетической однородности стада.

Результаты частоты встречаемости фрагментов ДНК (праймер $(GA)_9C$) представлены в таблице 2. В некоторых случаях разница в частотах велика. Наиболее высокая частота (0,9) у фрагмента размером 580-550 п.н., наиболее низкая (0,19) у фрагмента размером 640-630 п.н.

На основании показателей средней частоты встречаемости фрагментов ДНК на рисунке 1 представлен геномный профиль баранов-производителей романовской породы.

Также в ходе исследования был подсчитан коэффициент генетического сходства (BS) по линиям. Эти данные представлены в таблице 3 и на рисунке 2. Наиболее высокие показатели одно-

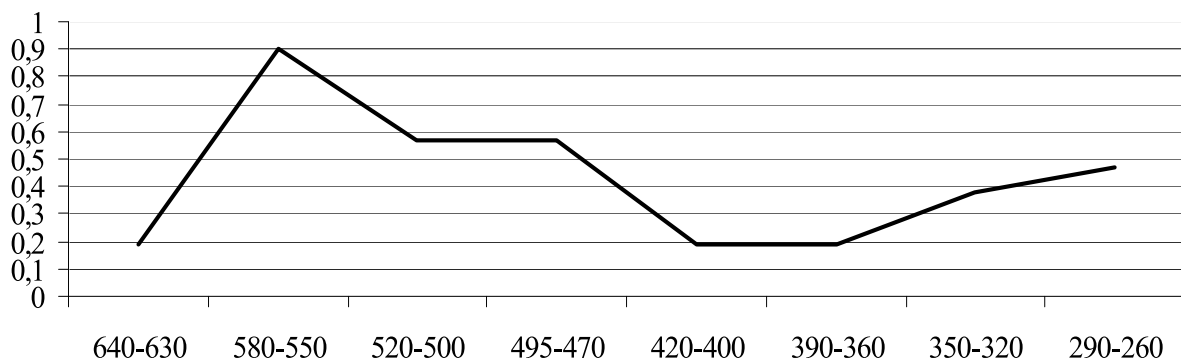


Рисунок 1 – Геномный профиль баранов-производителей романовской породы

Таблица 1 – Характеристика GA-ISSR-маркера в межмикросателлитном анализе полиморфизма ДНК

№ группы	№ животного	Генеалогическая группа	GA-ISSR-маркер	Коэффициент генетического сходства внутри группы (BS)	Хозяйство
I	31	508	G ₁ G ₂	0,5	ООО «Агрофирма «Авангард»
	65	115	G ₂ G ₃ G ₄		
	354	29	G ₂ G ₃ G ₅		
II	64	508	G ₂ G ₃ G ₆ G ₇ G ₈	0,8	ООО «АФ «Вперед»
	203	600	G ₂ G ₄ G ₇ G ₈		
III	52	25	G ₃	0	ООО «Путь Ленина»
	77	6	G ₂ G ₄ G ₅		
IV	11	3	G ₂ G ₆ G ₈	0,55	ООО «Красный Перекоп»
	43	18	G ₃ G ₄ G ₅ G ₈		
	56	34	G ₃ G ₄ G ₇ G ₈		
V	205	20	G ₃ G ₄ G ₇ G ₈	0,75	ООО «АФ Земледелец»
	240	20	G ₂ G ₄ G ₇ G ₈		
VI	37	541	G ₂ G ₄ G ₇ G ₈	0,62	ООО «Агрофирма «Заречье»
	140	600	G ₁ G ₂ G ₄ G ₇ G ₈		
	12	3	G ₂ G ₃ G ₄ G ₈		
VII	202	25	G ₁ G ₂ G ₃	0,54	ООО «Родина»
	108	29	G ₃ G ₄ G ₆ G ₈		
	2	18	G ₃ G ₄ G ₇ G ₈		
VIII	369	29	G ₂ G ₃ G ₄	0,55	ООО «Дружба»
	16	541	G ₂ G ₃ G ₄ G ₇		
	105	25	G ₂ G ₃ G ₅ G ₆		

родности у линии 600 (BS 0,8) и 20 (0,75), средние в линиях 3 (0,57) и 29, 25 (BS 0,5), низкий показатель у линии 508 (BS 0,3).

Выводы

При использовании молекулярно-генетического маркера (GA)₉C получена информация о генетическом статусе баранов-производителей романовской породы на геномном уровне. Эти

исследования позволяют поддерживать автономность разведения различающихся между собой структурных единиц и обеспечивать сложившуюся генетическую изменчивость при дальнейшем совершенствовании основных селекционируемых признаков.

Примененные нами статистические подходы могут использоваться для установления филогенетических связей, геномного профиля вида,

Таблица 2 – Частота встречаемости фрагментов ДНК (праймер(GA)₉C)

Размер фрагмента	Частота встречаемости
G ₁ =640-630	0,19
G ₂ =580-550	0,90
G ₃ =520-500	0,57
G ₄ =495-470	0,57
G ₅ =420-400	0,19
G ₆ =390-360	0,19
G ₇ =350-320	0,38
G ₈ =290-260	0,47

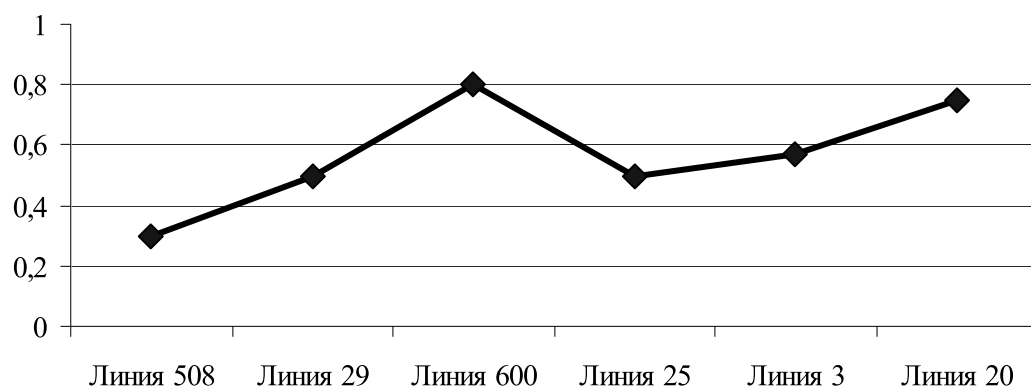


Рисунок 2 – Коэффициент генетического сходства линий

Таблица 3 – Коэффициент генетического сходства внутри линии

№ линии	№ животного	BS	Хозяйство
508	31	0,3	ООО «Агрофирма «Авангард»
	64		ООО «Агрофирма «Вперед»
29	354	0,5	ООО «Агрофирма «Авангард»
	108		ООО «Родина»
	369		ООО «Дружба»
600	203	0,8	ООО «Агрофирма «Вперед»
	140		ООО «Агрофирма «Заречье»
25	52	0,5	ООО «Путь Ленина»
	202		ООО «Родина»
	105		ООО «Дружба»
3	11	0,57	ООО «Красный Перекоп»
	12		ООО «Заречье»
20	205	0,75	ООО «Агрофирма «Земледелец»
	240		

породы, внутривидовой группы, а также мониторинга генетической структуры породы в целом для различных сельскохозяйственных животных.

Полученные данные подтверждают результативность использования ISSR-фингерпринтинга

при решении проблем филогении и генетического разнообразия. Следует отметить, что маркер на основе ПЦР с праймерами (GA)₉C имеет низкий полиморфизм и пригоден в основном для дифференциации пород.

Литература

1. Максименко, В.Ф. Модель генофондной фермы овец романовской породы [Текст] / В.Ф. Максименко, М.Н. Костылев, И.В. Михайлова. – Ярославль, 2009. – 53 с.
2. Калашникова, Л.А. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных [Текст] / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко, Н.В. Рыжова, Е.П. Голубина. – ВНИИплем, 1999. – 148 с.
3. Зиновьева, Н.А. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве [Текст] / Н.А. Зиновьева. – Дубровицы: ВИЖ, 1998. – 47 с.