

CZU 636.32/.38.082.11

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛДАВСКИХ ЦИГАЙСКИХ И КАРАКУЛЬСКИХ ОВЕЦ ПО ПОЛИМОРФИЗМУ БЕЛКОВ КРОВИ И МИКРОСАТЕЛЛИТАМ

П. ЛЮЦКАНОВ

Институт животноводства и ветеринарии

Abstract. The transferrin polymorphism is represented by 9 genotypes governed by TF^A, TF^B, TF^C, TF^D and TF^E genes. The analyses of the genes frequency which govern the transferrin polymorphism has demonstrated the highest TF^C genes frequency (0,4743) and the reduced waste of the TF^E genes. The spreading genes waste of hemoglobin is HB^B.

Two breeds were assessed by 20 microsatellites. Both demonstrated high level of genetic variability. A low level ($q = 3,4\%$) of between-breed differentiation was detected. The evidence of Tsygai introgression to Karakul was shown.

Key-words: Frequency, Hemoglobin, Karakul, Microsatellites, Polymorphism, Sheep, Tsygai, Transferrin.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из приоритетных задач международных программ ФАО и ЕАЖ является сохранение генетических ресурсов животных. Изучение и рациональное использование генофонда отечественных заводских и локальных пород имеет огромное значение в связи с их хорошей приспособленностью к местным природно-климатическим условиям, устойчивостью к заболеваниям, универсальными рабочими качествами и нередко уникальным аллелофондом. Мировой опыт показывает, что степень разнообразия полиморфных генов является на сегодняшний день наиболее объективным и информативным критерием оценки уровня генетической изменчивости в популяциях.

Информация о породных генетических особенностях аллелофонда по полиморфным системам крови позволит более обоснованно подойти к проблеме комплектования генофондных хозяйств типичными для породы животными с целью поддержания характерной генетической структуры и достаточно высокого уровня гетерозитности.

Микросателлиты применяются как генетические маркеры с целью проведения популяционно-генетических исследований, изучения эволюционных связей различных видов и пород овец, коз, крупного рогатого скота, лошадей, свиней, собак и картировании генома. Микросателлиты это короткие tandemные повторы или один из наиболее распространенных типов повторяющихся ДНК (D. Tautz, 1989). В настоящий момент накоплено много материала, доказывающего, что микросателлитные последовательности имеют определенную функциональную роль в геноме, в качестве кодирующих или регуляторных элементов (P. Kunzler et al., 1995; Y. Kashi et al., 1997). Микросателлиты можно использовать так же для установления времени появления той или иной породы (F. Buchanan et al., 1994).

Применение систематического генетического мониторинга в генофондных популяциях позволяет решить главную проблему - контроль за уровнем генетического разнообразия, а также использовать многие возможности маркерной селекции, включая оценку внутривидовой дифференциации, формирование оптимальной генеалогической структуры и селекцию на гетерозис, что особенно актуально при разведении малочисленных пород животных.

Целью наших исследований было проведение анализа полиморфизма локусов трансферрина и гемоглобина, а также генетического разнообразия по 20 микросателлитам цыгайской и каракульской породы овец.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 39 овцах цыгайской породы шерстно-мясо-молочного направления продуктивности и 30 каракульской породы смушково молочного типа. Полиморфизм белков гемоглобина и трансферрина определяли на 7,5% полиакриламидном геле по методике Gane V. et al. (1977). Подсчет частот аллелей и генотипов в локусах гемоглобина и трансферрина проводили по общепринятым методикам, описанных Н. Марзановым (1991).

Оценку цыгайской и каракульской пород овец микросателлитами, принадлежащих 20 локусам проводили, по описанной схеме M. Tapio et al. (2005). Для определения уровня генетической изменчивости по каждому локусу подсчитывали наблюдаемую и ожидаемую гетерозиготность, показатели f -коэффициент инбридинга по популяции и i – коэффициент, определяющий процент генетической изменчивости, обусловленный межпородным различием (B. Weir, C. Cockerham, 1984). Для оценки внутривидового разнообразия использовали показатели наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, полученные с помощью Microsatellite Toolkit (S. Park, 2001), а также показатель числа аллелей в локусе (El Mousadik A., Petit R., 1996). Эти значения для локусов и пород были подсчитаны с помощью FSTAT 2.9.3 (Goudet J., 1995). Эта же программа была использована для вычисления подразделенности каждой породы, выраженной через F_{IS} по всем локусам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основе проведенных исследований выявлено, что полиморфизм трансферрина представлен 9-ю генотипами, контролируемые генами TF^A , TF^B , TF^C , TF^D и TF^E . Сравнение частот генов, контролирующих полиморфизм трансферринов ясно показывает, что наибольшим распространением отличается ген TF^C (0,4743) и наименьшим – ген TF^E (табл.1).

Таблица 1

Частота встречаемости аллелей в локусе трансферрина

Время исследования	Частота встречаемости аллелей				
	TF^A	TF^B	TF^C	TF^D	TF^E
1976* (n=962)	0,2152	0,1793	0,5541	0,0431	0,0083
2005 (n=39)	0,0641	0,2435	0,4743	0,2051	0,0128

*Спиридонов В.И., Могоряну И.И. (1976)

Для сравнения изменения полиморфизма локуса трансферрина у цыгайской породы овец во временном аспекте были взяты данные полученные по данной породе в 1976 году. Как видно из табл. 1 наибольшее распространение в породе гена TFC осталось высоким по сравнению с остальными, но в численном выражении снизилось. Также осталось низким содержание гена TFE. Однако стоит отметить, что значительные изменения произошли с генами TFA и TFD, их частота встречаемости соответственно уменьшилась и увеличилась. Нарушение генетического равновесия в исследуемой породе по локусу трансферрина, наблюдаемое по данным 1976 года ($X^2=65,14$; $df=9$; $P<0,001$), также отмечалось и по полученным нами результатам проведенных исследований ($X^2=29,3$; $df=4$; $P<0,001$).

При анализе цыгайской породы овец по локусу гемоглобина было выявлено три его генотипа – HV^{AA} , HV^{AB} и HV^{BB} , обусловленные двумя аллелями – HV^A и HV^B (табл.2).

Таблица 2

Частота встречаемости аллелей в локусе гемоглобина

Годы исследований	Частота встречаемости аллелей	
	HV^A	HV^B
1976	0,1476	0,8524
2005	0,1125	0,8875

Наиболее распространенным аллелем гемоглобина является HV^B . При сравнении с более ранними результатами исследований Спиридонова В.И. и Могоряну И.И. (1976), мы так же видим, что тенденция преобладания данного гена не изменилась, его концентрация в исследуемой породе остается высокой.

Однако нужно отметить, что если при анализе цыгайской породы овец в 1976 году было установлено генетическое равновесие по гемоглобиновому локусу, то сейчас мы наблюдаем обратное. По данным полученным в результате наших исследований генетическое равновесие нарушено за счет избытка гомозиготы BB ($X^2=17,53$; $df=1$; $P<0,001$). Возможно, это связано с тем, что в последние годы в СПК «Элита-Александрфельд» Кагульского района интенсивно завозились бараны производители цыгайской породы, в частности Приазовского мясо-шерстного типа из Украины с целью создания молдавского шерстно-мясо-молочного типа цыгая.

Проведен анализ полиморфизма локуса гемоглобина и у каракульских овец. В результате исследований выявлено 2 аллеля (A и B) и 3 генотипа HV^{AA} , HV^{AB} и HV^{BB} . Наиболее часто встречающимся аллелем и генотипом гемоглобина является HV^B и HV^{BB} . По частотам генотипов и аллелей не установлена строгая зависимость в их концентрации от продуктивности. В отличие от цыгайской породы, у которой частота встречаемости аллеля HV^A – 0,1125, у каракульской в два раза выше и составила 0,225. Уровень гетерозиготности у данных пород достаточно низкий и составил: цыгайская - 0,175 и каракульская – 0,3.

Генетическое равновесие по локусу трансферрина отсутствовало у каракульской породы ($P<0,001$). Уровень гетерозиготности по исследованным породам составил: у цыгайской – 0,5 и каракульской – 0,725. Из проведенных исследований можно сделать вывод, что наименьшим полиморфизмом обладает каракульская порода, у нее наблюдается лишь 5 генотипов, а по уровню гетерозиготности - цыгайская порода – 0,5. Однако если сравнивать в целом состояние гетерозиготности, можно сказать, что он был высоким по локусам альбумина и трансферрина и низким по гемоглобину. Несмотря на невысокий уровень гетерозиготности гемоглобина, все три системы белков можно эффективно использовать при оценке аллелофонда пород, достоверности происхождения ягнят, оценке проверяемых баранов по качеству потомства, при оценке моно- и дизиготности ягнят.

При проведении исследований по микросателлитам у двух новых молдавских типов по 20 микросателлитным локусам у двух молдавских пород овец было обнаружено 214 аллелей (табл. 3). Количество аллелей в локусе варьировало от 6 (BM0757 и BM6506) до 17 (BM1818) при среднем значении 11. Показатели наблюдаемой гетерозиготности (H_o) изменялись от 0,55 (BM8125) до 0,91 (BM1314), со средним значением 0,76 по двум исследованным породам. Значения ожидаемой гетерозиготности (H_e) практически не отличались от наблюдаемой гетерозиготности (H_o). Значения f (коэффициент инбридинга) были близки нулю. Согласно значению 0,34% общей генетической изменчивости было обусловлено межпородным различием ($P < 0,05$).

Таблица 3

Характеристика пород овец по локусам микросателлитов

Локус	Chr	A _L	H _O	H _E	f	θ
BM0757	9	6	0,75	0,78	0,047	0,046
BM1314	22	14	0,91	0,89	-0,020	0,025
BM1818	20	17	0,81	0,87	0,061	0,018
BM4621	6	14	0,90	0,89	-0,002	0,027
BM6506	1	6	0,67	0,72	0,068	0,011
BM6526	26	10	0,81	0,79	-0,031	0,001
BM8125	17	7	0,55	0,60	0,084	0,047
CSSM31	23	15	0,81	0,81	0,002	0,019
INRA23	1	14	0,88	0,88	0,012	0,014
MAF36	22	13	0,80	0,79	0,051	-0,014
MAF48	X	9	0,70	0,74	0,068	0,01
MAF65	15	8	0,79	0,71	-0,119	0,067
McM527	5	11	0,78	0,84	0,068	0,009
OarCP20	21	9	0,66	0,66	0,011	0,039
OarCP34	3	7	0,72	0,74	0,024	0,028
OarFCB128	2	8	0,76	0,83	0,078	0,028
OarFCB304	19	14	0,71	0,69	-0,021	0,176
OarFCB48	17	13	0,72	0,76	0,057	0,016
OarHH47	18	12	0,75	0,83	0,092	0,022
OarVH72	25	7	0,77	0,74	-0,039	0,024
Среднее		11	0,76	0,78	0,021	0,034

Примечание: Chr - положение локуса микросателлита на хромосоме; A_L - общее число аллелей, выявленных в локусе; H_O и H_E - наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность; f - коэффициент инбридинга исследованной популяции и i - коэффициент, определяющий процент генетической изменчивости, обусловленный межпородным различием

В табл. 4 представлены популяционно-генетические параметры для каждой породы. По 20 локусам микросателлитов у цыгайской породы было обнаружено 191 аллель, а у каракуля - 163.

Таблица 4

Популяционно-генетическая характеристика пород овец

Порода	n	A _T	H _O	H _E	F _{IS}	r _k	X ²	df	P
Цыгайская	39	191	0,76	0,80	0,044	8,35	41,3	40	0,41
Каракульская	30	163	0,76	0,76	-0,008	7,69	31,0	40	0,85

Примечание: n - количество исследованных особей; A_T - общее количество аллелей для каждой породы; H_O - внутривидовая наблюдаемая и ожидаемая (H_E) гетерозиготность; F_{IS} - коэффициент подразделенности породы; r_k - показатель числа аллелей независимый от числа животных в выборке; (X², df, P) - показатели оценки отклонения от генетического равновесия по Харди-Вайнбергу

Ожидаемая гетерозиготность (H_O) была несколько выше наблюдаемой (H_E) у цыгая, а у каракульской породы эти значения были равны друг другу. По этим данным обе породы находились в состоянии генетического равновесия по Харди-Вайнбергу (P < 0,05). Значение показателя числа аллелей было выше у цыгайской породы. Полученные результаты по F_{IS} не отличались статистически достоверно от нуля.

Дендрограмма, построенная с использованием каждой особи в качестве таксономической единицы, представлена на рис. 1. Некоторые животные цыгайской породы были сгруппированы в один кластер с овцами каракульской породы.

Значения внутривидовой генетической изменчивости практически не отличались у обоих исследованных пород. Аналогичные результаты были получены ранее для культурных пород, и были несколько выше, чем у локальных популяций овец (Aranaz J.-J. et al., 2001; Alvarez I. et al., 2004; Tarió M. et al., 2003, 2005; М. Озеров и др., 2006). Показатель генетического различия (i)

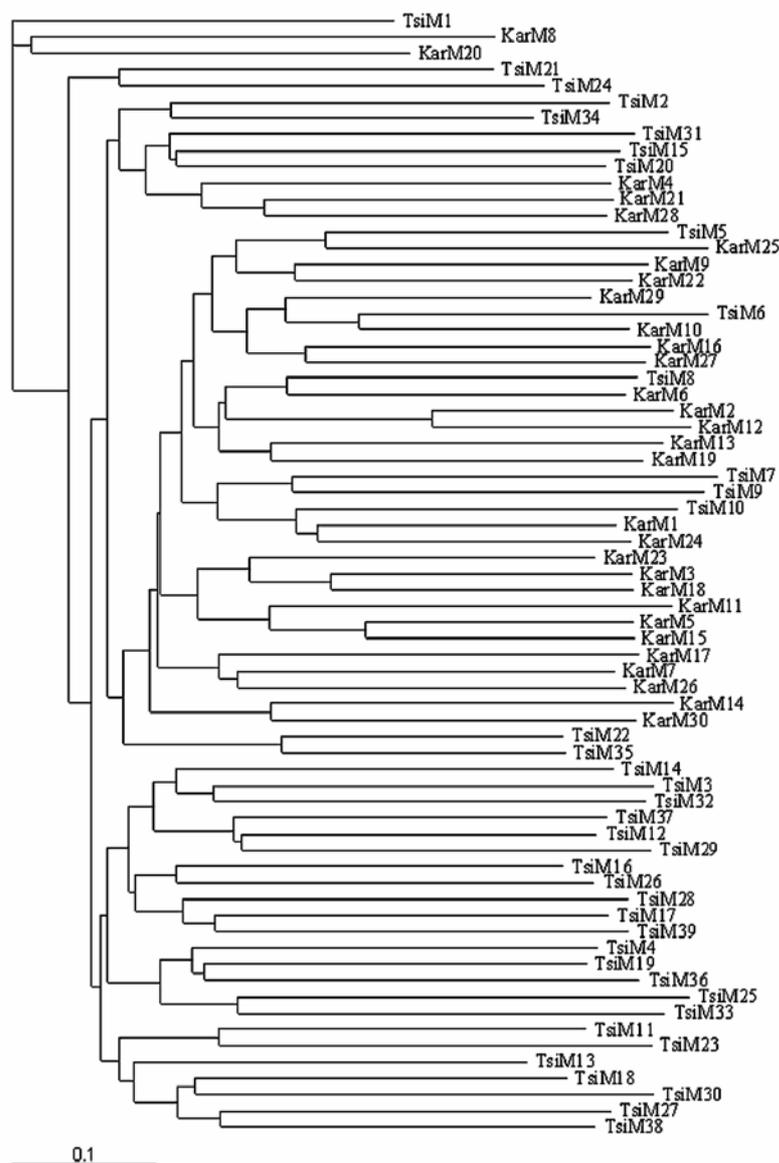


Рис. 1. Дендрограмма генетических связей по микросателлитам TsiM – цыгайских и KarM - каракульских овец.

между породами, составивший 3,4% означает, что 96,6% общей генетической изменчивости обусловлено внутривидовым различием особей. Однако, это значение было несколько ниже ранее полученных данных другими авторами при изучении пород домашних овец. (Aranaz J.-J. et al., 2001; Alvarez I. et al., 2004; Tapio M. et al., 2003, 2005; Tapio I. et al., 2005).

Установленный показатель межпородного генетического различия был также ниже, чем у других видов домашних животных. У крупного рогатого скота он составляет 11,4%, у коз - 14,3% (J. Kantanen, et al., 2000; Barker et al., 2001). Низкое значение и (3,4%) может быть обусловлено тремя причинами: высоким уровнем обмена генов между популяциями в настоящее время, а может быть в недавнем прошлом, возможно также, что исследуемые популяции имеют общее происхождение (Wright S., 1969). Мы считаем, что малое значение межпородного различия обусловлено тем, что в начале XIX века в южной части Молдавии имелись смушковые овцы, дающие ценные смушки и в процессе разведения этих двух пород овец имело место скрещивание между ними.

Для более глубокого понимания межпопуляционных связей, при построении дендрограммы,

исходили из того, что каждое животное рассматривали как таксономическую единицу (Diez-Tascon C. et al., 2000).

ВЫВОДЫ

1. Исходя из полученных данных следует, что мониторинг генетической структуры может и должен использоваться при работе с породами овец, как эффективный метод определения уровня генетического разнообразия во времени. Данные мониторинга, служат основанием проведения мероприятий, предотвращающих снижение генетического разнообразия или наоборот, определяют состояние популяции, а следовательно и общий уровень ее приспособленности к конкретным условиям окружающей среды.

2. Оценка по полиморфным белкам двух пород, разводимых в условиях Молдовы, показала, что уровень гетерозиготности по гемоглобину достаточно низкий и составил по цигаю 0,175 и каракулю 0,300, а по трансферрину соответственно 0,500 и 0,725.

3. Микросателлитный анализ подтвердил гипотезу, что смушковые овцы имелись в начале XIX столетия и в зоне цыгайского овцеводства Буджакской степи и участие цыгана в формировании стад каракульской популяции в Республике Молдова.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Марзанов, Н. Иммунология и иммуногенетика овец и коз. Кишинев: Штиинца, 1991, 238с.
2. Озеров, М. Микросателлитный анализ эволюционно-генетических связей у различных пород овец / Озеров М.Ю., Тапио М., Марзанов Н.С. и др. // Доклады РАСХН. - 2006. - №2. - С.30-33.
3. Спиридонов, В., Могоряну, И. Полиморфизм по типам трансферринов, гемоглобинов и уровня калия в эритроцитах цыгайских овец местной селекции. Кишинев: Штиинца, 1976, С. 27-29.
4. Alvarez, I. Genetic relationships and admixture among sheep breeds from northern Spain assessed using microsatellites / Alvarez I., Royo L.J., Fernandez I. et al. // Journal of Animal Science. - 2004. - V.83. - P.2246-2252.
5. Aranaz, J. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites / Aranaz J. J., Bayon Y., San Primitivo F. // Gen. Sel. Evol. - 2001. - V.33. - P.529-542.
6. Barker, J. Genetic variation within and relationships among populations of Asian goats (*Capra hircus*) / Barker J.S.F., Tan S.G., Moore S.S., // J. Anim. Breed. Genet. - 2001. - V.118. - P.213-233.
7. Buchanan, F. Ovine microsatellites at the OarFCB5, OarFCB19, OarFCB20, OarFCB48, OarFCB129 and OarFCB226 loci / Buchanan F.C., Galloway S.M., Crawford A.M. // Animal Genetics. - 1994. - Vol.25. - P.60.
8. Gane, B., Juneja, R., Grolmus, J. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the Simultaneous phenotyping of transferrin, posttransferrin, albumin and postalbumin in the blood plasma of cattle. Genet. 1977. v.8. P.127-137.
9. Gouder, J., FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics / Goudet J. // J. Heredity. - 1995. - V.86. - P.485-486.
10. Diez-Tascon, C. Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites / Diez-Tascon C., Littlejohn R.P., Almeida P.A.R., et al. // Animal Genetics. - 2000. - V.31. - P.243-251.
11. El Mousadik, A., Petit, R. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the arvan tree (*Arvania spinosa*) endemic to Morocco / El Mousadik A., Petit R.J. // Theoretical and Applied Genetics. - 1996. - V.92. - P.832-839.
12. Kantanen, J. Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds / Kantanen J., Olsaker I., Holm L.-E., et al. // J. of Heredity. - 2000. - V.91. - P. 446-457.
13. Kashi, Y. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation / Kashi Y., King D., Soller M. // Trends in Genetics. - 1997. - Vol.13. - P.74-78.
14. Kunzler, P. Pathological, physiological and evolutionary aspects of short unstable DNA repeats in the human genome / Kunzler P., Matsuo K., Schaffner W. // Biological Chemistry Hoppe Seyler-1995-Vol.376. - P.201-211.
15. Park, S. D. E. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection / Park S. D. E. // University of Dublin. (Ph.D. thesis). - 2001.
16. Tapio, M. Comparison of microsatellite and blood protein diversity in sheep: inconsistency in fragmented breeds / Tapio M., Miceikiene I., Vilkki J. et al. // Molecular Ecology. - 2003. - V.12. - P.2045-2056.
17. Tapio, M. Native breeds demonstrate high contributions to the molecular variation in northern European sheep / Tapio M., Grisliis Z., Holm L.-E., et al. // Molecular Ecology. - 2005. V.14. - N.13. - P.3951-3963.
18. Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers / Tautz D. // Nucleic Acids Research. - 1989. - Vol.17. - P.6463-6471.
19. Weir, B., Cockerham, C. Estimating F statistics for the analysis of population structure / Weir B.S., Cockerham C.C. // Evolution. - 1984. - V.38. - P.1358-1370.
20. Wright, S. Evolution and Genetics of Populations. The Theory of Gene Frequencies / Wright S. // Univ. Chicago Press. Chicago. Illinois. - 1969. - V.2.

Data prezentării articolului – 07.11.2007