

На правах рукописи

НЕСТЕРУК Любовь Викторовна

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ ОВЕЦ

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в лаборатории сравнительной генетики животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук,
СТОЛПОВСКИЙ Юрий Анатольевич
заведующий лабораторией сравнительной генетики животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
ХОЛОДОВА Марина Владимировна
главный научный сотрудник, руководитель кабинета методов молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук

кандидат биологических наук,
БЕКЕТОВ Сергей Валериевич
ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией биохимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина», г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Сохранение внутривидового и породного разнообразия сельскохозяйственных животных необходимо для обеспечения устойчивого развития сельского хозяйства, решения глобальных проблем продовольственной безопасности, уменьшения экологических проблем и т.д. Данная идеология поддерживается различными международными организациями, в том числе и ООН (FAO, 2007, 2010, 2015). Наиболее эффективным способом сохранения породного разнообразия является сохранение имеющихся генетических ресурсов и разработка селекционных стратегий разведения. Особое значение для животноводства России, его устойчивого развития, настоящей и будущей селекции имеют отечественные генофонды domestцированных видов животных. Объектом нашего исследования стала романовская породы овец, которая прошла периоды расцвета, забвения, но главное сохранила свое место в современном животноводстве.

Романовская порода обладает великолепными шубными качествами, самой высокой плодовитостью, полиэстричностью, скороспелостью и хорошими мясными качествами. Она является одной из древнейших пород овец в Центральной и Северо-Западной России, созданной с помощью методов народной селекции путем отбора по плодовитости и качеству овчин. К романовской породе на протяжении большого количества времени проявляют значительный интерес многие овцеводы мира, ее разводят как в «чистоте», так и скрещивают с другими породами (Жирыков, 1976; Мороз, 1978; Ковнерев, 1978; Ricordeau et al., 1990; Покатилова, 1992; Ерохин и др., 2005; Глазко и др., 2012; Макарова и др., 2012). Это одна из немногих пород российского происхождения, которая имеет по классификации пород FAO трансграничный статус и широкий ареал распространения (FAO, 2007, 2010). Однако в России численность овец романовской породы за последние десятилетия постоянно снижалась (Ерохин, 2001; Столповский и др., 2008). Попытки «улучшения породы» и резкое сокращение численности в конце XX века поставили породу на грань исчезновения. Резкое сокращение поголовья негативно сказалось на жизнеспособности и продуктивности романовских овец. В нашей работе для сохранения породы и нивелирования неблагоприятных последствий сокращения численности были предложены современные подходы для оценки ее генетической структуры и поддержания внутривидового генетического разнообразия.

Одними из наиболее доступных, эффективных и информативных генетических маркеров для популяционно-генетических исследований являются межмикросателлитные мультилокусные ДНК маркеры, которые позволяют изучать одновременно большое число локусов. Ранее генофонды отдельных пород овец, в том числе и нескольких популяций овец романовской породы, были анализированы с применением ISSR-PCR маркеров (Столповский и др., 2009б; Феофилов и др., 2013).

Важным направлением нашего исследований стало выяснение генетической детерминации плодовитости романовских овец, что позволило бы вести отбор на улучшение данного признака при чистопородном разведении и учитывать степень влияния многоплодия данной породы в различных типах скрещивания с другими породами. До настоящего времени информация об изменчивости большинства генов-кандидатов плодовитости, в том числе гена рецептора эстрогена *ESR1*, у отечественной многоплодной романовской породы овец в научной литературе отсутствует.

С учетом современного состояния генофонда романовской овцы, ее

уникальных качеств и относительно небольшой численности разработка генетико-селекционных программ, комплексная оценка генетического потенциала и внедрение новых методологий селекционной работы по сохранению и совершенствованию изучаемой породы остается весьма актуальной задачей.

Цель и задачи исследования. Основная цель работы заключалась в исследовании генетического разнообразия романовских овец на основе мультилокусного межмикросателлитного анализа ДНК и типирования полиморфизма гена эстрогенового рецептора.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить генетическое разнообразие, внутри- и межпопуляционную изменчивость с помощью AG- и GA-ISSR-PCR маркеров в генофондных хозяйствах романовской породы овец;
2. Провести анализ популяционной структуры романовской породы овец методом кластеризации в программе STRUCTURE с использованием данных межмикросателлитного анализа;
3. Изучить внутривидовое генетическое разнообразие романовской породы овец с использованием коэффициента генетической оригинальности (КГО) на основании данных ISSR-анализа;
4. Провести анализ влияния выявленной генетической структуры (AG- и GA-ISSR-фрагменты) на изменчивость хозяйственно-полезных признаков романовских овец и оценить взаимосвязи анализируемых признаков продуктивности овец романовской породы;
5. Провести сравнительный анализ ISSR-полиморфизма романовской породы с тувинской, эдильбаевской и другими породами овец, определить «протогенофонд» исследуемых овец и их генеалогические связи;
6. Изучить полиморфизм гена эстрогенового рецептора, оценить частоты аллелей и генотипов у романовской породы овец.

Научная новизна. В настоящей работе с помощью ISSR-PCR маркеров исследована генетическая структура и разнообразие романовской породы пяти выборок овец, полученных из пяти лучших генофондных хозяйств Ярославской области, которая является историческим местом выведения породы. С помощью молекулярно-генетических исследований в романовской породе выделены две внутривидовые группы.

Путем сравнительного анализа ISSR-спектров у 33-х популяций 9 пород овец выявлены породоспецифичные фрагменты ДНК. Впервые получена информация о генетическом разнообразии овец теленгитских и буубэй, установлена генетическая близость романовской и тувинской короткожирнохвостой пород овец. С помощью метода иерархического усреднения частот проведена реконструкция «протогенофонда» овец, которая показала, что наиболее древними из изученных пород являются эдильбаевские, тувинские и монгольские овцы.

Впервые для изучения генофонда романовской породы был использован метод, основанный на классификации внутривидового разнообразия с помощью подсчитанных коэффициентов генетической оригинальности (КГО). Полученные результаты позволили систематизировать генофонд романовских овец.

По результатам анализа ассоциаций впервые установлено влияние генетической структуры, представленной анонимными последовательностями, фланкированными инвертированными повторами микросателлитных локусов, на изменчивость хозяйственно-полезных признаков у романовской породы овец.

В настоящей работе впервые определены частоты аллелей и генотипов экзонов 1 и 4 гена эстрогенового рецептора (*ESR1*) у высоко плодовитой романовской породы овец. Для анализа генотипов локусов *ESR-ex1* и *ESR-ex4* гена рецептора эстрогена овец были применены метод аллель-специфичной ПЦР (с разработанными автором аллель-специфичными праймерами) и метод ПЦР–ПДРФ, которые могут быть использованы для проведения массовых исследований овец.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, имеют существенное теоретическое и практическое значение для мониторинга состояния генофондов, расширения возможностей при изучении генетического разнообразия популяций сельскохозяйственных животных. Полученные данные по ISSR-анализу и изменчивости гена *ESR1* и использованные способы оценок предлагается применять для контроля и сохранения существующего генетического разнообразия отечественных пород овец, для обоснования определенных путей оптимизации решения различных селекционных задач и, следовательно, повышения эффективности селекционно-племенной работы.

Положения, выносимые на защиту:

- Использование межмикросателлитного анализа позволило выявить в популяционно-генетической структуре романовских овец две внутривидовые группы;
- Предложена классификация внутривидового разнообразия с помощью коэффициентов генетической оригинальности (КГО). Определены наиболее типичные и оригинальные особи в генофонде породы;
- Выявлено влияние генетической структуры, представленной анонимными последовательностями, фланкированными инвертированными повторами микросателлитных локусов, на изменчивость хозяйственно-полезных признаков у романовской породы овец;
- Преобладание *B*-аллеля в 1 экзоне гена эстрогенового рецептора *ESR1* у романовских овец позволяет предположить существование связи данного локуса с повышенной плодовитостью породы.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность результатов обеспечена использованием современных молекулярных методов и статистической обработки результатов. Результаты, полученные в экспериментальных исследованиях, и данные бонитировок обработаны методами популяционно-генетического и биометрического анализа.

Результаты исследования доложены на Всероссийской с международным участием научной конференции «Научное наследие Н.И. Вавилова и современность» (Москва, 2012); The III international research and practice conference «European Science and Technology» (Munich, October 30th–31st, 2012); Молодёжной конференции «Популяционная генетика и геогеография: наука и практика» (Москва, 22 ноября 2013 года); VI съезде ВОГиС (15-20 июня 2014 г., Ростов-на-Дону); VI Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и системная биология» (16-21 ноября 2014 г., Звенигород, Россия); Отчётной конференции «Живая природа: современное состояние и проблемы развития. Динамика и сохранение генофондов» (Москва, ИОГен, 2014); V Ежегодной итоговой международной научно-практической конференции «Научные итоги 2015 года: достижения, проекты, гипотезы» (Новосибирск, 2015).

Публикация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, входящих в

перечень рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Структура и объём и работы. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, предложения производству, список используемых сокращений, список литературы, приложение. Работа содержит 21 таблицу и 18 рисунков. Список литературы включает 307 источников, в том числе 168 - на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Исходным материалом для исследований послужили образцы крови или ДНК от 1840 животных 11 российских и зарубежных пород овец. В работе были изучены 35 сельскохозяйственных популяций, среди них пять выборок основного объекта исследования – овец романовской породы из генофондных хозяйств Ярославской области.

Выделение ДНК. Геномную ДНК выделяли из образцов крови овец, используя наборы Diatom™ DNA Prep200 и Magna™ DNA Prep200 («Лаборатория Изоген», Москва) согласно инструкции изготовителя.

Проведение ПЦР. ПЦР проводили на амплификаторе Терцик («ДНК Технология», Россия) и термоциклере DNA Engine Dyed (BioRad, США) с применением набора для амплификации ДНК GenePak™ PCR Core («Лаборатория Изоген», Москва).

ISSR-анализ. Исследование полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов (ISSR-PCR маркеры), выполняли стандартным методом, разработанным Зьеткевич и соавт. (Zietkiewicz et al., 1994). В качестве праймеров использовали олигонуклеотиды (AG)₉C и (GA)₉C, комплементарные к микросателлитным локусам (TC)_n, (GT)_n соответственно. Амплификацию проводили в следующих условиях: первоначальная денатурация 2 мин при 95°C; денатурация при 95°C – 30 сек, отжиг при 55°C – 30 сек, синтез при 72°C – 2 мин (37 циклов); завершающий синтез при 72°C – 7 мин. Документацию продуктов амплификации после горизонтального электрофореза проводили с помощью программы Vitran v.1.0 под коротковолновым УФ-излучением на трансиллюминаторе «UVT 1» («Биоком», Россия) после окрашивания гелей бромистым этидием. Размер и количество фрагментов в ISSR-спектрах определяли с использованием программ «Onedscan» и «GelPro» v3.1. Каждый ампликон рассматривался как один локус ДНК. С помощью программы Microsoft Excel были созданы бинарные матрицы, в которых наличие/отсутствие каждого фрагмента в спектре отмечалось цифрами 1 и 0 соответственно.

Секвенирование экзона 4 гена рецептора эстрогена ESR1. Для амплификации фрагмента 4 экзона эстрогенового рецептора использовали праймеры: ESR-Ex4-F: 5'-GAGGGAGAATGTTGAAGC-3' and ESR-Ex4-R: 5'-GCCCAGTTGATCATGTGTA-3' (Ozmen et al., 2012). Условия ПЦР были следующими: 94°C – 5 мин, далее 34 цикла: 94 °C – 1 мин, 62 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин, и дополнительно 10 мин при 72 °C.

Продукты ПЦР были очищены с использованием набора Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Epigenetics, США) согласно протоколу фирмы изготовителя. Определение нуклеотидной последовательности в исследуемом фрагменте проводили методом автоматического секвенирования на ДНК-анализаторе ABI Prism 3130xl

(Applied Biosystems, США). Длина амплифицированного участка составляет 301 п.н. (в области 75550971-75551271 п.н. скаффолда 8 хромосомы Oar_v3.1 OAR8). Размер фрагментов, использовавшихся для анализа, составил 258 п.н. (в области 75551012-75551269 п.н.). Поиск сходства между анализируемой последовательностью и последовательностями, представленными в базе данных GenBank, проводили посредством программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли методом Clustal W. В качестве образцов для сравнения использованы последовательности ДНК, депонированные в базе данных GenBank под номерами JF262030-JF262035.

Анализ полиморфизма в экзоне 1 гена рецептора эстрогена *ESR1*. Генотипирование по 1 экзону гена *ESR1* проводили с помощью двух методов: ПЦР-ПДРФ и аллель-специфичная ПЦР.

Типирование А- и В-аллелей в экзоне 1 гена рецептора эстрогена методом ПЦР-ПДРФ проводили с помощью эндонуклеазы рестрикции *MhI* («СибЭнзим», Россия) в стандартных условиях (37°C в течение 16 часов). Для этого амплифицировали фрагмент экзона 1 размером 419 п.н. с использованием праймеров ESR-Ex1-F: 5'-TGCACCAGATCCAAGCCAACGA-3' и ESR-Ex1-R: 5'-CGGGTACSTGTAGAAGGCGGGAG-3' (Xiao-Dan et al., 2005). ПЦР осуществляли в следующих условиях: первоначальная денатурация 4 мин при 95°C; денатурация при 94°C – 1 мин, отжиг при 66,5°C – 1 мин, синтез при 72°C – 1 мин (34 цикла); завершающий синтез при 72°C – 7 мин. Обнаружение фрагментов рестрикции длиной 276, 73 и 70 п.н. соответствовало генотипу *AA*, 276, 143, 73 и 70 п.н. – генотипу *AB*, 276 и 143 п.н. – генотипу *BB*. Схема и электрофореграмма рестрикционного анализа представлена на рисунке 1.

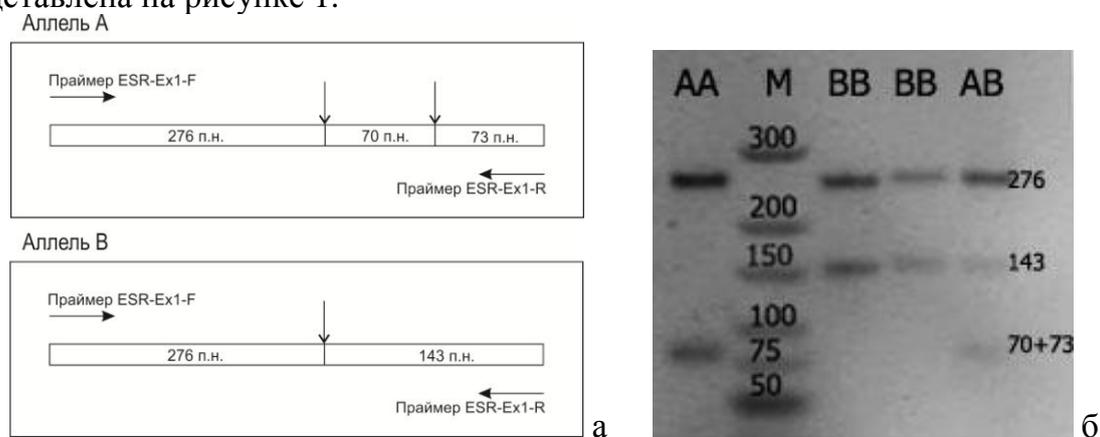


Рисунок 1. Схема (а) и электрофореграмма (б) рестрикционного анализа продуктов амплификации экзона 1 гена *ESR1* эндонуклеазой рестрикции *MhI*. Обозначения: М – маркер молекулярных весов «М50», *AA*, *AB*, *BB* – генотипы.

Для аллель-специфичной ПЦР использовали в качестве внешних праймеров праймеры из работы (Xiao-Dan et al., 2005). В соответствии с зарегистрированными в базе данных GenBank последовательностями X98010 и Z49257.1(mRNA) и на основании собственных полученных секвенированных последовательностей (KU043042, KU043043) были подобраны аллель-специфичные праймеры. Прямой внутренний праймер (ESR-Ex1-F_A) 5'-CACGGCCAACAGGTGCCCT-3' определял аллель *A* (C), обратный внутренний праймер (ESR-Ex1-R_B) 5'-GGCTCGTTCTCCAGGTAATAC-3' определял аллель *B* (G). С помощью олигокалькулятора оптимизировали условия амплификации. Условия ПЦР: 4 мин при 95 °C; 94 °C – 1 мин, отжиг при 67 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин (34 циклов); 72 °C – 7

мин. Фракционирование продуктов амплификации проводили в 2,5%-ом агарозном геле. Продукт длиной 90 п.н. соответствовал аллелю *A*, длиной 367 п.н. – аллелю *B*.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью стандартных компьютерных программ Statistica 8.0, PopGene 1.32, GENEPOP 4.2.1, Microsoft Excel и специально разработанных программ в среде R (<http://www.R-project.org/>). Дендрограммы построены методами UPMGA, BIONJ (Gascuel, 1997) в программах Statistica 8.0, SplitsTree4 V4.13.1. STRUCTURE v2.3.4 и по матрице несмещенных генетических расстояний Нея (Nei, 1978). Для анализа популяционной структуры романовской породы овец применен метод кластеризации в программе STRUCTURE v2.3.4 (Evanno et al., 2005).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетический полиморфизм ISSR-фрагментов у романовской породы овец

Характеристика спектров AG- и GA-ISSR-фрагментов у романовской породы овец

С использованием двух динуклеотидных ISSR-праймеров ((AG)₉C и (GA)₉C) был исследован внутривидовой полиморфизм на пяти выборках овец романовской породы, полученных из генофондных хозяйств Угличского района Ярославской области: ООО «Агрофирма Авангард» (n=80), ООО «Агрофирма Земледелец» (40), ООО «Дружба» (40), ООО «Заречье» (100), ООО «Красный Перекоп» (40). Для каждой исследуемой популяции романовских овец были определены специфические спектры фрагментов ДНК в диапазоне от 2500 до 160 п.н. (рисунок 2). Всего по двум праймерам было выявлено 43 фрагмента ДНК: по (AG)₉C - 25, в том числе 20 полиморфных, по (GA)₉C – 18 и 15, соответственно. Между исследованными популяциями романовской овцы обнаружены как сходство, так и различия по частотам встречаемости AG и GA-ISSR-фрагментов. Многие фрагменты с высокой частотой обнаружены у всех исследованных популяций, отдельные встречаются только в одной или двух выборках.

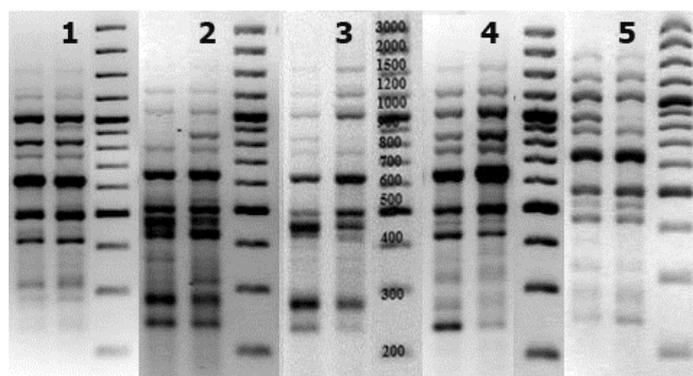


Рисунок 2. Спектры фрагментов амплификации ДНК романовских овец, полученных методом ISSR-PCR при использовании праймера (AG)₉C. Обозначения: 1 – «Авангард»; 2 – «Земледелец»; 3 – «Заречье»; 4 – «Дружба»; 5 – «Красный Перекоп».

Выявленные в ходе исследования достоверные различия по частоте встречаемости того или иного фрагмента среди пяти групп животных могут быть использованы при сохранении внутривидового генетического разнообразия, разработке селекционно-племенного плана по разведению романовской породы овец, в частности при подборе и отборе, ротации и обмену овец между хозяйствами Ярославской области.

Оценка популяционной структуры романовской породы методом кластеризации на основании данных ISSR анализа

Анализ популяционной структуры генофонда в исследуемых выборках романовских овец с использованием обработки данных ISSR-фингерпринтинга в программе STRUCTURE позволил выявить помесных животных и дать оценку консолидированности изученных популяций. Значения функции правдоподобия $L(K)$ (-6219.83) со стандартным отклонением $sd L(K)=8.82$ и параметра дельта K (90.72) (Evanno et al., 2005), свидетельствуют о том, что наиболее оптимальным числом кластеров в исследованной группе романовских овец из пяти хозяйств является $K=2$.

Таким образом, результаты кластеризации (рисунок 3) на внутривидовом уровне свидетельствуют о наличии двух кластеров в структуре генофонда, каждый из которых характеризуется рядом частот аллелей ISSR-локусов. Данный факт позволяет предположить участие двух исходных прародительских популяций в формировании романовской породы (общей исследованной выборки), одна из которых внесла наибольший вклад в генофонды отар «Авангарда» и «Земледельца», вторая – «Дружбы», Заречья» и «Красного Перекопа». Основываясь на представленных выше данных, в романовской породе можно выделить соответственно две внутривидовые группы. В то же время наличие во всех хозяйствах смешанных/помесных особей, свидетельствует о периодическом обмене животными между хозяйствами.

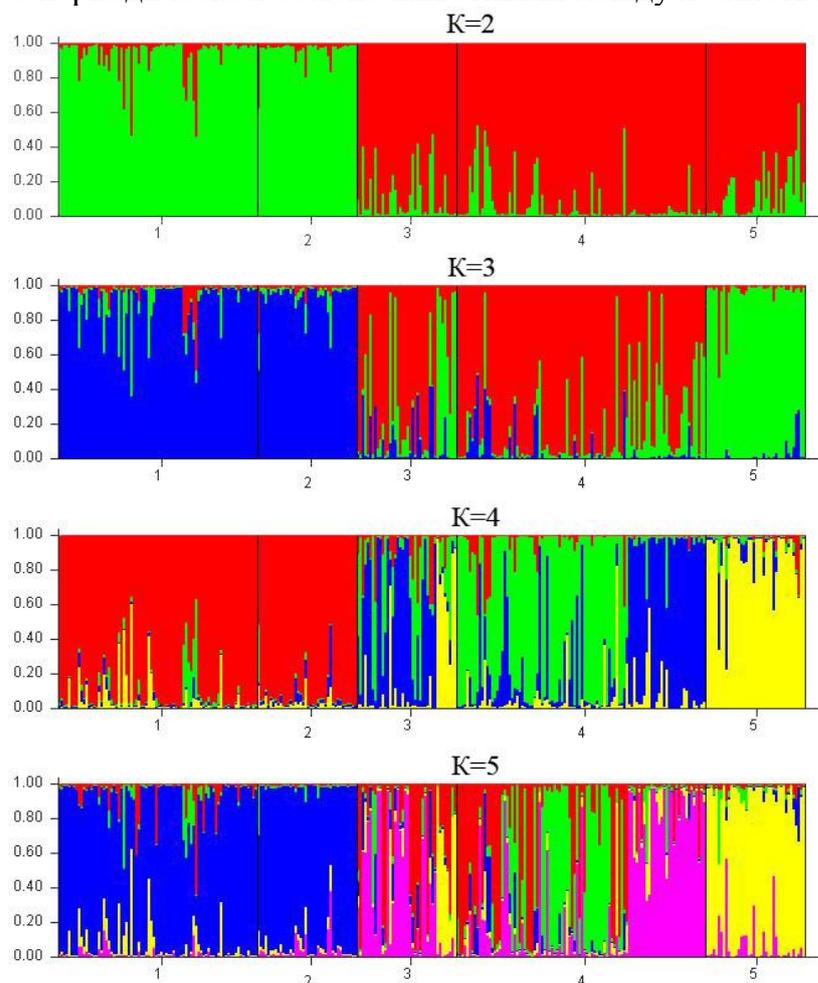


Рисунок 3. Кластеризация популяций романовской породы овец на основе популяционно-статистической обработки данных ISSR-фингерпринтинга с использованием программы STRUCTURE 2.3.4. 1 Обозначения: 1 – «Авангард»; 2 – «Земледелец»; 3 – «Заречье»; 4 – «Дружба»; 5 – «Красный Перекоп».

Определив из совокупности особей, процент/долю таких смешанных или интродуцированных генотипов на уровне популяции, можно сделать заключение о чистоте и консолидации популяционной структуры романовских овец. В нашем исследовании наиболее консолидированное и генетически однородное стадо обнаружено в хозяйстве «Земледелец», несмотря на достаточно высокий уровень генетического разнообразия по AG-ISSR-PCR маркеру.

Оценка генетического разнообразия романовской породы овец с использованием ISSR-PCR маркеров

Генотипирование романовских овец с использованием двух ISSR-праймеров позволило оценить параметры генетического разнообразия (таблица 1), популяционную структуру, сходство и различие генофондов пяти хозяйств романовской породы овец. Наибольшее генетическое разнообразие по Нею и Шеннону по обоим праймерам выявлено у популяции «Авангард», наименьшее зафиксировано у отары овец из «Красного Перекопа».

Таблица 1

Параметры генетического разнообразия популяций романовской породы овец с использованием ISSR-PCR маркеров

	Выборка, n	Полиморфных локусов, N	Полиморфных локусов, %	Среднее на локус генное разнообразие, H_T (Nei, 1987) ($\pm se$)	Средний на локус индекс информации Шеннона, I (Lewontin, 1972) ($\pm se$)	Среднее число аллелей μ (Животовский, 1991) ($\pm s_\mu$)	Доля редких аллелей h_μ (Животовский, 1991) ($\pm s_h$)
по (AG)₉C							
Авангард	80	15	42.86	0.143 \pm 0.022	0.213 \pm 0.032	1.332 \pm 0.105	0.334 \pm 0.053
Земледелец	40	12	34.29	0.101 \pm 0.027	0.154 \pm 0.040	1.248 \pm 0.153	0.376 \pm 0.077
Дружба	40	10	28.57	0.087 \pm 0.025	0.134 \pm 0.037	1.215 \pm 0.154	0.393 \pm 0.077
Заречье	100	17	48.57	0.128 \pm 0.018	0.198 \pm 0.026	1.326 \pm 0.095	0.337 \pm 0.047
Красный Перекоп	40	7	20.00	0.067 \pm 0.024	0.100 \pm 0.035	1.158 \pm 0.156	0.421 \pm 0.078
Романовская	300	20	57.14	0.153 \pm 0.011	0.234 \pm 0.016	1.381 \pm 0.053	0.309 \pm 0.027
по (GA)₉C							
Авангард	80	14	77.78	0.224 \pm 0.023	0.341 \pm 0.031	1.550 \pm 0.093	0.225 \pm 0.047
Земледелец	40	4	22.22	0.086 \pm 0.027	0.127 \pm 0.040	1.194 \pm 0.155	0.403 \pm 0.078
Дружба	40	9	50.00	0.181 \pm 0.036	0.262 \pm 0.050	1.402 \pm 0.145	0.299 \pm 0.072
Заречье	100	9	50.00	0.187 \pm 0.022	0.271 \pm 0.031	1.412 \pm 0.091	0.294 \pm 0.046
Красный Перекоп	40	5	27.78	0.065 \pm 0.021	0.106 \pm 0.032	1.181 \pm 0.155	0.409 \pm 0.078
Романовская	300	15	83.33	0.216 \pm 0.013	0.323 \pm 0.017	1.545 \pm 0.048	0.227 \pm 0.024

Обозначения: se – стандартная ошибка; s_μ – ошибка среднего числа аллелей; s_h – ошибка доли редких аллелей.

Внутрипопуляционное разнообразие проанализировано также с помощью параметров: среднее число морф/аллелей μ и доля редких морф/аллелей h_μ (Животовский, 1980, 1991). Их преимущество по сравнению с некоторыми другими показателями заключается в способности оценивать более тонкие различия между популяциями по разнообразию, особенно, когда редкие аллели варьируют от

популяции к популяции. Среднее число аллелей μ оценивает степень разнообразия, а доля редких аллелей h_{μ} - структуру разнообразия популяции. В наибольшей степени равномерное распределение частот аллелей ISSR-фрагментов отмечено у популяции «Авангард», так как она имеет самые высокие значения среднего числа аллелей μ и наименьшую долю редких аллелей h_{μ} (таблица 1). Среди исследованных популяций романовской породы минимальные значения среднего числа аллелей μ по AG-ISSR-PCR маркеру отмечены у овец хозяйства «Красный Перекоп» (1.158 ± 0.156). Это подтверждается также и высокими значениями показателя h_{μ} в данной популяции (0.421 ± 0.078). Среди изученных популяций по GA-ISSR-PCR маркеру неравномерное распределение частот аллелей свойственно выборке «Красный Перекоп» и «Земледелец».

С целью определения генетических взаимоотношений между популяциями романовских овец были рассчитаны попарные генетические расстояния (таблица 2). Наиболее близкие генетические взаимоотношения как по AG-, так и по GA-ISSR-фрагментам отмечены между отарами из хозяйств «Дружба» и «Заречье» ($D_N=0.0155$ и 0.0284 , соответственно). Аналогичная картина между вышеуказанными хозяйствами, сохраняется и для совокупности всех маркеров (по $(AG)_9C$ и $(GA)_9C$) ($D_N=0.0196$) (рисунок 4, таблица 2), что, по всей видимости, обусловлено тесными селекционными связями между данными хозяйствами. Исследованные популяции романовских овец по результатам кластеризации на основании матриц генетических расстояний разбиваются на две родственные группы: первую образуют овцы хозяйств «Авангард» и «Земледелец», вторую – «Красный Перекоп», «Дружба» и «Заречье» (рисунок 4). Данные результаты совпадают с разделением на группы, выявленным методом кластеризации в программе STRUCTURE.

Таблица 2

Генетические расстояния (N_e , 1978) между популяциями романовской породы овец по данным ISSR-PCR маркеров

Популяции	Авангард	Земледелец	Дружба	Заречье	Красный Перекоп
по $(AG)_9C$					
Авангард	****				
Земледелец	0.0225	****			
Дружба	0.0700	0.0814	****		
Заречье	0.0714	0.1057	0.0155	****	
Красный Перекоп	0.0465	0.0908	0.0293	0.0349	****
по $(GA)_9C$					
Авангард	****				
Земледелец	0.1769	****			
Дружба	0.0628	0.0540	****		
Заречье	0.0538	0.0832	0.0284	****	
Красный Перекоп	0.1798	0.0342	0.0482	0.0698	****
по $(AG)_9C$ и $(GA)_9C$					
Авангард	****				
Земледелец	0.0713	****			
Дружба	0.0677	0.0727	****		
Заречье	0.0657	0.0984	0.0196	****	
Красный Перекоп	0.0886	0.0712	0.0358	0.0463	****

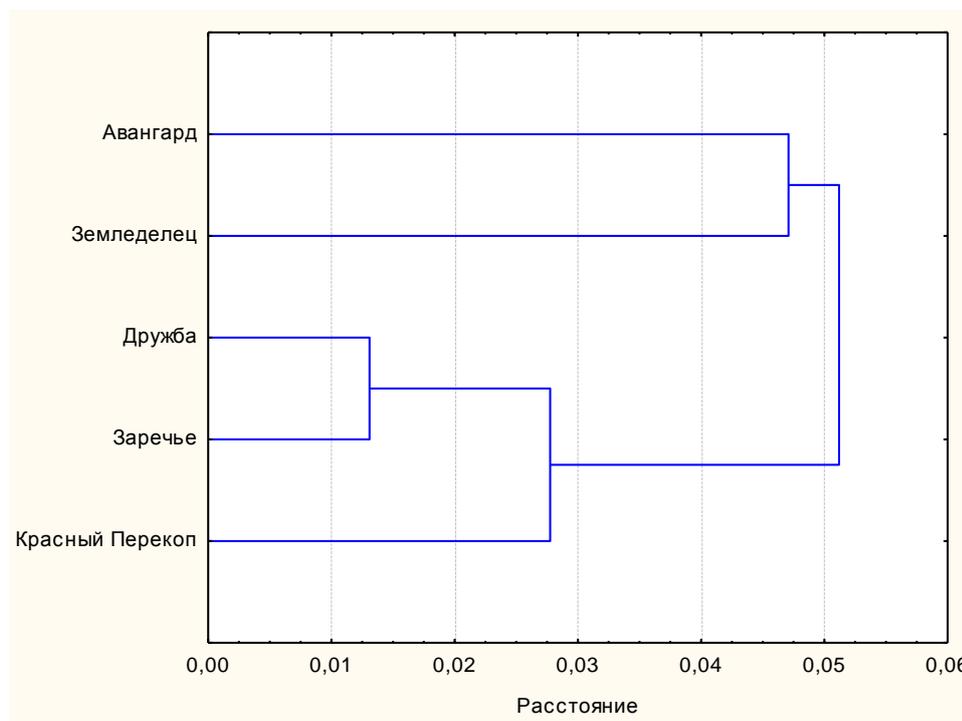


Рисунок 4. Дендрограмма филогенетического сходства пяти популяций романовской породы овец на основании данных AG- и GA-ISSR-анализа, построенная с использованием программы Statistica 8.0 (Метод построения UPGMA)

На основании полученных данных о генетических взаимоотношениях, параметрах разнообразия можно сделать определенные выводы, которые могут быть использованы при разработке селекционной стратегии для разведения романовских овец в Угличском районе Ярославской области.

С целью повышения эффективности селекционной работы с поголовьем романовских овец в исследованных хозяйствах, а именно для сохранения внутривидового разнообразия романовской породы следует активно использовать овцематок и баранов производителей из агрофирмы «Авангард» - хозяйства лидера по выявленному генетическому разнообразию. Исключение составляет хозяйство «Земледелец», где разводятся по данным AG-ISSR-анализа близкородственные ($D_N=0.0225$) с животными «Авангарда» овцы. Для поддержания генетического разнообразия и уменьшения негативного влияния инбридинга в исследованных отарах романовских овец следует предусмотреть обмен животными между хозяйствами «Земледелец» и «Заречье», а также между «Авангардом» и «Заречье». С генетико-селекционной точки зрения, для того чтобы избежать инбредной депрессии, прежде всего, в хозяйствах «Красный перекоп», «Дружба» и «Земледелец» необходимо прилитие свежей крови, использование экологического подбора, а в целом по пяти хозяйствам применение индивидуального и группового отбора с учетом данных полученных по генетическому разнообразию.

Полученные данные мультилокусного межмикросателлитного анализа предоставляют новую информацию о внутривидовом генетическом разнообразии, что позволит оптимизировать селекционно-племенную работу с романовской породой овец с целью сохранения и использования ее уникального генофонда для настоящей и будущей селекции.

Коэффициент генетической оригинальности (КГО) как оценка генетического разнообразия романовской породы овец

Впервые для сельскохозяйственных животных был применен новый математический алгоритм для подсчета степени генетической оригинальности особей (классификации внутривидового разнообразия), представленный ранее Потокиной Е.К. и Александровой Т.Г. для бобовых растений (Потокина, Александрова, 2008а, б). Этот подход также был успешно использован для оценки состояния генофондов растений при анализе спектров фрагментов ДНК, полученных методами ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) и IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) (Боронникова, 2013). Данный метод, основан на принципе «взвешивания» признаков в зависимости от частоты их встречаемости. Его результатом является индекс усредненных значений «весов» всех полиморфных в выборке фрагментов, который называется коэффициентом генетической оригинальности (КГО). На основании рассчитанных значений коэффициента генетической оригинальности по данным ISSR-PCR маркеров генофонд романовских овец был разделен на классы. Разделение происходило с использованием пятибалльной шкалы классификации, границы классов, которые соответствуют интервалам между минимальным, максимальным значениями выборки x и 5%-ым, 25%-ым, 75%-ым и 95%-ым квантилями полученного распределения (рисунок 5). Таким образом, были выделены наиболее типичные и оригинальные особи, то есть особи, попадающие в крайние интервалы и составляющие, соответственно, 1 и 5 классы.

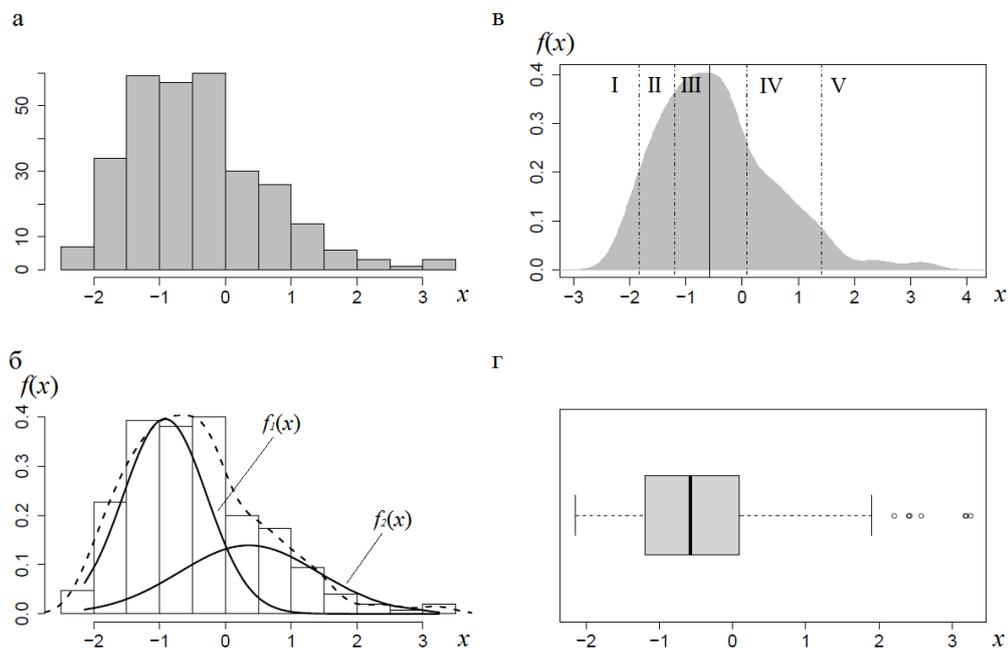


Рисунок 5. Распределение выборки из 300 значений КГО, логарифмированных по основанию 2: а) гистограмма распределения; б) функция плотности распределения $f(x)$, аппроксимированная смесью двух нормальных распределений $f_1(x)$ и $f_2(x)$; в) функция плотности распределения $f(x)$ с разделением на области с помощью 5%-ого, 25%-ого, 50%-ого, 75%-ого и 95%-ого квантилей; г) диаграмма «boxplot», показывающая медиану, 25% и 75%-ый квантили, минимальное и максимальное значения и выбросы.

В результате выполненных исследований определены хозяйства, где сосредоточено наибольшее количество типичных для породы генотипов (хозяйства «Красный Перекоп» и «Дружба») и наиболее оригинальный генофонд романовской породы овец (популяция «Авангард») (рисунок 6).

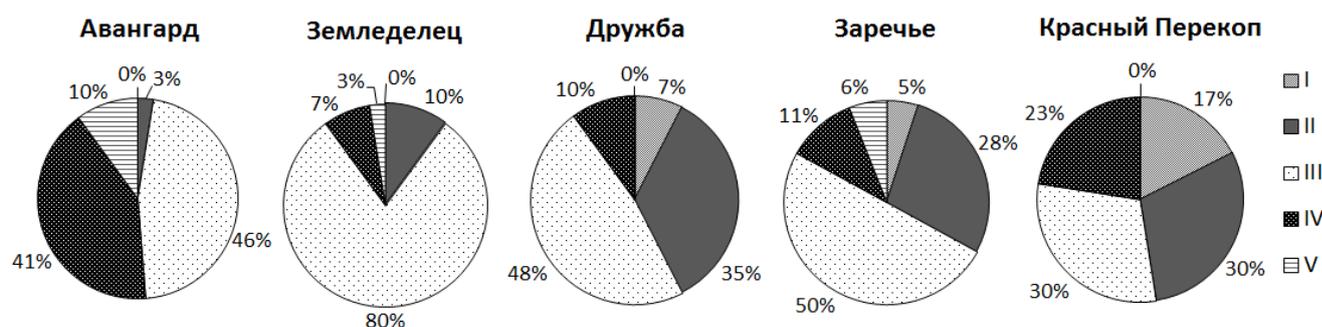


Рисунок 6. Соотношение представителей пяти классов в структуре исследуемых популяций романовской породы овец: I-первый класс, II-второй класс, III-третий класс, IV-четвертый класс, V-пятый класс.

Предложенная классификация внутривидового разнообразия может быть использована как в селекционно-племенной работе (при отборе-подборе пар для скрещивания, обмене животными между хозяйствами), так и при сохранении генофонда породы, в частности для сохранения всего спектра редких (оригинальных) и типичных (базовых) генотипов внутри породного разнообразия.

Анализ ассоциаций между хозяйственно-полезными признаками романовских овец и ISSR-фрагментами

В работе было проанализировано влияние генетической структуры (полиморфизма по AG- и GA-ISSR-фрагментам) на изменчивость хозяйственно-полезных признаков романовских овец и оценены взаимосвязи анализируемых признаков продуктивности овец романовской породы.

Для 268 животных выполнен поиск возможных ассоциаций данных по генетическому полиморфизму с результатами бонитировок из баз данных исследуемых хозяйств. Анализ был осуществлен с помощью построения модели наследования признака как регрессионной линейной модели и применения критерия Фишера. По результатам анализа ассоциаций и впервые установлено влияние ISSR-фрагментов на изменчивость хозяйственно-полезных признаков романовских овец. Достоверная взаимосвязь с одним или более фрагментом была определена для 9 признаков (таблица 3).

Таблица 3

Достоверные ассоциации между признаками продуктивности романовских овец и генетическими локусами (значения $p < 0.05$)

Признак	ISSR-PCR маркеры (p -значения)
Настриг шерсти	A12 (0.0029), A29 (0.0156), A32 (0.0047), G12 (0.0177), G28 (0.0300)
Уравненность шерсти	A34 (0.0283×10^{-5}), G29 (0.0397)
Густота шерсти	A34 (0.0073), A36 (0.0392), G36 (0.0034)
Соотношение ости и пуха (по количеству)	A12 (0.0264), G3 (0.0385), G8 (0.0319), G28 (0.0363)
Оброслость брюха	A23 (0.0214)
Комплексный класс	A24 (0.0225), A31 (0.0307)
Средняя плодовитость	A6 (0.0329)
Максимальное число ягнят	A12 (0.0462)
Наличие мертворожденных ягнят	A6 (0.0057), A21 (0.0049), A30 (0.0470), G27 (0.0292), G36 (0.0005)

Примечание. В скобках указаны вычисленные p -значения.

Дальнейшие исследования по ISSR-фрагментам, ассоциированным с фенотипическим проявлением признаков романовских овец, могут способствовать выявлению и уточнению вклада потенциальных генов-кандидатов в изменчивость количественных признаков овец.

С помощью корреляционных коэффициентов Пирсона были выявлены достоверные взаимосвязи между анализируемыми фенотипическими признаками у романовских овец (таблица 4). Большинство выявленных взаимосвязей подтвердили ранее известные селекционерам зависимости, а также влияние таких факторов как пол, популяционная принадлежность и заводская линия на селекционируемые хозяйственно-полезные признаки. Знание направления и степени корреляции между признаками поможет решать вопросы о методах отбора и подбора родительских пар при селекции по комплексу признаков.

Таблица 4
Корреляционные коэффициенты Пирсона между признаками (над диагональю) и их *p*-значения (под диагональю)

Признак	1. Пол	2. Популяция	3. Заводская линия	4. Тип рождения	5. Комплексный класс	6. Живая масса	7. Настриг шерсти	8. Уравненность шерсти	9. Густота шерсти	10. Соотношение ости и пуха (по количеству)	11. Оброслость брюха	12. Соотношение ости и пуха (по длине)	13. Средняя плодовитость	14. Максимальное число ягнят	15. Наличие м/р ягнят
1.		0.103	0.116	0.033	0.184	0.481	0.616	0.185	0.130	0.072	0.044	0.129	0.000	0.000	0.000
2.	0.094		0.068	0.070	0.060	0.292	0.112	0.143	0.236	0.055	0.017	0.024	0.084	0.067	0.126
3.	0.058	0.268		0.047	0.097	0.013	0.113	0.027	0.137	0.014	0.060	0.052	0.051	0.047	0.035
4.	0.591	0.256	0.448		0.107	-0.022	-0.039	-0.009	-0.178	-0.020	-0.106	-0.003	0.003	0.007	0.092
5.	0.002	0.328	0.114	0.081		0.053	0.138	0.192	-0.004	0.111	0.141	0.089	-0.121	-0.052	-0.032
6.	0.000	0.000	0.838	0.724	0.390		0.600	0.032	0.223	-0.007	0.044	0.025	0.080	0.088	0.026
7.	0.000	0.067	0.066	0.526	0.023	0.000		0.226	0.292	0.093	0.055	0.066	-0.020	0.001	0.005
8.	0.002	0.019	0.658	0.887	0.002	0.603	0.000		-0.078	0.329	-0.051	0.152	0.039	-0.051	0.055
9.	0.033	0.000	0.025	0.003	0.946	0.000	0.000	0.204		-0.043	0.048	-0.013	-0.066	-0.138	-0.238
10.	0.237	0.366	0.823	0.748	0.069	0.907	0.128	0.000	0.479		-0.044	0.253	-0.050	-0.085	0.059
11.	0.472	0.776	0.327	0.083	0.021	0.472	0.366	0.406	0.437	0.473		0.063	-0.010	-0.037	-0.053
12.	0.035	0.701	0.392	0.960	0.147	0.682	0.282	0.013	0.828	0.000	0.302		-0.067	-0.127	-0.133
13.	1.000	0.172	0.406	0.956	0.047	0.194	0.740	0.530	0.284	0.414	0.870	0.273		0.675	0.269
14.	1.000	0.271	0.440	0.907	0.399	0.152	0.981	0.401	0.024	0.165	0.549	0.038	0.000		0.326
15.	1.000	0.039	0.570	0.132	0.606	0.669	0.932	0.370	0.000	0.335	0.386	0.029	0.000	0.000	

Сравнительный анализ генофондов романовской и других пород овец на основании оценок полиморфизма AG-ISSR-фрагментов

Методом мультилокусного межмикросателлитного анализа с использованием праймера (AG)₉C была изучена генетическая структура девяти пород овец (*Ovis aries*), разводимых на территориях России и Монголии. Всего проанализировано 1798 особей из 33-х популяций.

При сравнительном анализе полученных AG-ISSR-спектров пород обнаружены отличия в количестве выявленных фрагментов и их полиморфизме (рисунок 7).

Обнаружены породоспецифичные фрагменты ДНК, присутствие которых типично для генофонда определенной породы и с высоким уровнем значимости по частоте встречаемости отличают ее от других пород (например, фрагмент A28 длиной 400-380 п.н. у породы тексель).

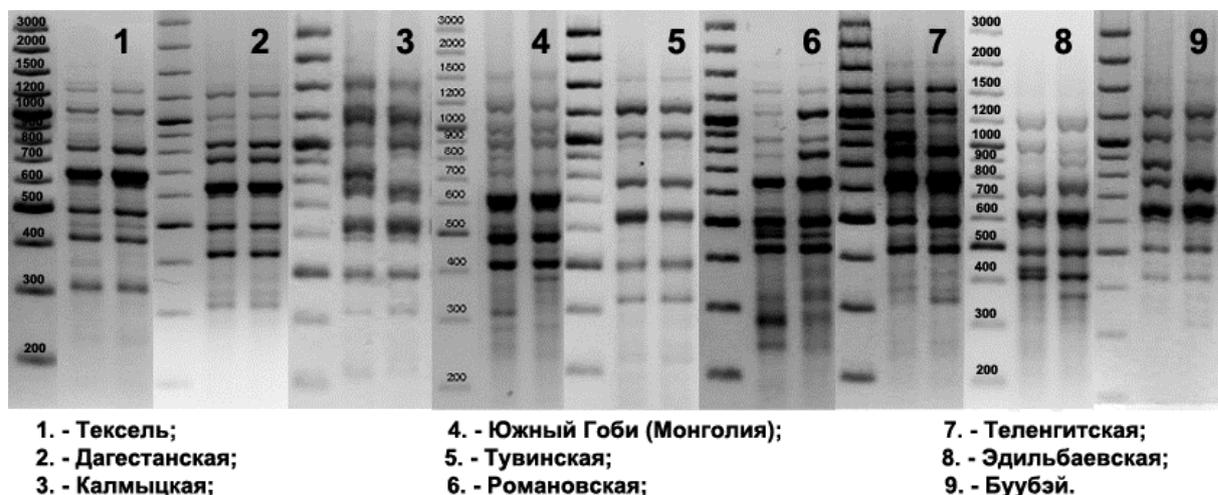


Рисунок 7. Спектры фрагментов амплификации ДНК исследованных пород овец с праймером (AG)₉C в 2% агарозном геле. Размеры фрагментов маркера молекулярного веса 100kb DNA Ladder Plus указаны над ними.

На основании ISSR-полиморфизма оценены основные параметры генетического разнообразия и структуры пород, определены филогенетические связи и генетические дистанции между изученными породами. Таким образом, определена наибольшая близость романовских овец с тувинскими короткожирнохвостыми ($D_N=0.231$), что говорит либо об обмене животными, либо о родстве двух пород (рисунок 8). Впервые получена информация о генетическом разнообразии для аборигенной породы Алтая – теленгитской, а также для недавно созданной в Бурятии породы буубэй, которые ранее не были исследованы с помощью молекулярно-генетических методов.



Рисунок 8. Дендрограмма кластерного анализа изученных пород, построенная с использованием программы SplitsTree4 V4.13.1. Масштаб указывает генетические расстояния (Nei, 1978).

Трехуровневый анализ разнообразия по данным ISSR-фингерпринтинга показал, что внутривидовая изменчивость и для всей совокупности изученных пород овец, и для романовской породы в частности, составила более 50% (таблица 5), что свидетельствует о важности ведения селекции на уровне особей.

Параметры генетической структуры и дифференциации популяций

	Число популяций	H_T	H_S	G_{ST} , %
Романовская	5	0.1453	0.1054	27.63
Дагестанская	1	0.0031	0.0031	0
Монгольская	3	0.1825	0.1418	22.27
Тексель	1	0.1047	0.1047	0
Эдильбаевская	1	0.0866	0.0866	0
Теленгитская	1	0.0616	0.0616	0
Тувинская	19	0.1866	0.1009	45.94
Калмыцкая	1	0.0719	0.0719	0
Буубей	1	0.0832	0.0832	0
«Протогенофонд»	33	0.1882	0.1585	15.77

Примечание. H_T - общее генное разнообразие; H_S - внутривидовое генное разнообразие; G_{ST} - доля межпопуляционного разнообразия в общем разнообразии (Nei, 1987)

С помощью метода иерархического усреднения частот проведена реконструкция «протогенофонда» овец, наибольшее сходство с которым показали эдильбаевские ($D_N=0.0139$), тувинские ($D_N=0.0144$) и монгольские овцы ($D_N=0.0179$) (рисунок 9). Полученный результат соответствует известным историческим данным о древнейшем происхождении данных групп животных.

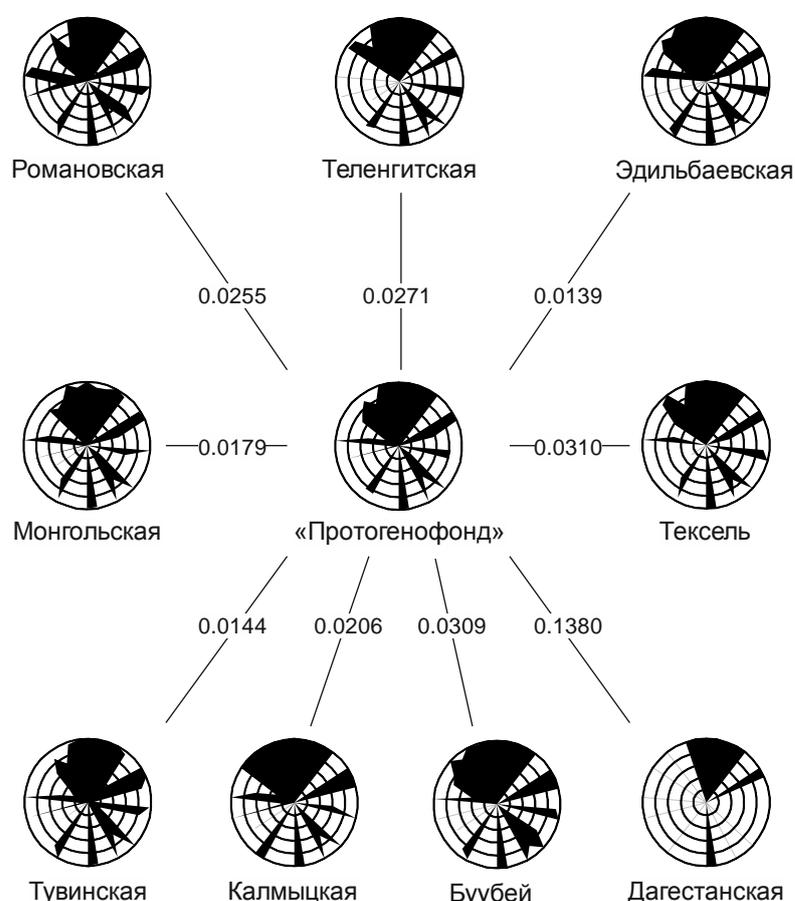


Рисунок 9. Полигоны, построенные на основании полиморфизма, выявленного по праймеру (AG)₉C у 9 пород овец.

Полиморфизм гена эстрогенового рецептора *ESR1* (1 и 4 экзоны) у овец романовской породы

В связи с отсутствием информации в научной литературе по изменчивости гена эстрогенового рецептора *ESR1* у отечественной высоко плодовитой романовской породы овец, проведено исследование полиморфизма гена *ESR1* по эксонам 1 и 4 у овец романовской породы в сравнении с низко плодовитыми породами полл дорсет и суффолк канадской селекции, разводимыми в течение нескольких лет в России. В ходе выполнения данной работы оптимизирована методика типирования полиморфизма экзона 1 гена *ESR1* овец, что заключалось в подборе эндонуклеазы рестрикции *MhI* для проведения рестрикционного анализа продуктов амплификации, а также разработке аллель-специфичных праймеров, которые в сочетании с уже описанными в литературе внешними праймерами (Xiao-Dan et al., 2005), позволяют проводить аллель-специфичную ПЦР, более точно детектировать *A* (*C*)- и *B* (*G*)-аллели. В результате секвенирования продуктов амплификации экзона 4 гена *ESR1* в наших образцах (49 особей романовской породы и по 10 особей пород полл дорсет и суффолк) обнаружена одна синонимичная замена (27C>T) из выявленных ранее (Ozmen et al., 2012). Полученные для романовской породы последовательности с гомозиготными генотипами (*CC*, *TT*) в позиции 27 относительно референсной последовательности JF262030, соответствующие двум гаплотипам (JF262030, JF262033) работы (Ozmen et al., 2012), были зарегистрированы нами в GenBank под номерами: KT962249, KT962250.

Полиморфизм гена эстрогенового рецептора по локусам *ESR-ex1* и *ESR-ex4* у овец романовской породы из разных выборок. Исследование изменчивости локусов *ESR-ex1* и *ESR-ex4* гена эстрогенового рецептора в изученных выборках овец романовской породы показало значительное внутривидовое сходство, которое отразилось в высокой доле гетерозиготных животных в большинстве выборок по обоим изученным локусам, кроме популяции «Заречье» (локус *ESR-ex4*), а также в преобладании частоты *B* (*G*)- и *C*-аллелей по локусам *ESR-ex1* и *ESR-ex4*, соответственно (таблица 6). Исследованные выборки романовской породы не различаются по распределению частот генотипов *ESR-ex1* локуса гена *ESR1* друг от друга (*G*-тест) и не дифференцируются на основе индекса фиксации, F_{ST} .

Сравнение романовской породы овец с зарубежными породами полл дорсет и суффолк по изменчивости *ESR-ex1* и *ESR-ex4* локусов гена *ESR1*. Проведен сравнительный анализ полиморфизма гена эстрогенового рецептора объединенной выборки овец романовской породы с низко плодовитыми породами полл дорсет и суффолк канадской селекции. Анализ полиморфизма по локусам *ESR-ex1* и *ESR-ex4* выявил достоверное отличие (*G*-тест, $P < 0.01$ и $P < 0.05$, соответственно) генотипической изменчивости романовской породы от пород полл дорсет, суффолк. К тому же романовская порода отличается преобладанием *B*-аллеля 1 экзона, наряду с тем, что у других изученных пород выше частота *C*-аллеля (таблица 7).

Редко встречаемый в нашем исследовании у низко плодовитых пород канадской селекции генотип *BB* по локусу *ESR-ex1* гена *ESR1*, по литературным данным также с низкой частотой встречается и у ряда высоко плодовитых зарубежных пород овец, таких как короткохвостая порода Хан (0.014), породы Ху (0.104) и немецкий мясной меринос (0.048), и отсутствуют у низко плодовитых пород дорсет и суффолк, разводимых в Китае (Xiao-Dan et al., 2005). Стоит отметить, что у романовской породы его частота составляет 37%, что позволяет предположить существование связи локуса *ESR-ex1* гена *ESR1* с повышенной плодовитостью романовских овец.

Таблица 6

Частоты генотипов и аллелей гена *ESR1* по локусам *ESR-ex1* и *ESR-ex4* у овец романовской породы из разных выборок

Выборки романовской породы (n=73)	Частота генотипов гена <i>ESR-ex1</i> (\pm sp)			Частота аллелей гена <i>ESR-ex1</i> (\pm sp)		H_E	HWE (P)	F_{IS}
	<i>AA</i> (CC)	<i>AB</i> (CG)	<i>BB</i> (GG)	<i>B</i> (G)	<i>A</i> (C)			
Авангард (n=22)	0.000 \pm 0.000	0.682 \pm 0.099	0.318 \pm 0.099	0.659 \pm 0.071	0.341 \pm 0.071	0.460	0.049	-0.500
Дружба (7)	0.000 \pm 0.000	0.571 \pm 0.187	0.429 \pm 0.187	0.714 \pm 0.121	0.286 \pm 0.121	0.440	1.000	-0.333
Заречье (22)	0.136 \pm 0.073	0.500 \pm 0.107	0.364 \pm 0.103	0.614 \pm 0.073	0.386 \pm 0.073	0.485	1.000	-0.031
Земледелец (15)	0.067 \pm 0.064	0.467 \pm 0.129	0.467 \pm 0.129	0.700 \pm 0.084	0.300 \pm 0.084	0.434	1.000	-0.077
Красный Перекоп (7)	0.000 \pm 0.000	0.714 \pm 0.171	0.286 \pm 0.171	0.643 \pm 0.128	0.357 \pm 0.128	0.495	0.441	-0.500
Выборки романовской породы (n=49)	Частота генотипов гена <i>ESR-ex4</i> (\pm sp)			Частота аллелей гена <i>ESR-ex4</i> (\pm sp)		H_E	HWE (P)	F_{IS}
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>			
Авангард (n=5)	0.200 \pm 0.179	0.800 \pm 0.179	0.000 \pm 0.000	0.600 \pm 0.155	0.400 \pm 0.155	0.533	0.427	-0.600
Дружба (5)	0.400 \pm 0.219	0.600 \pm 0.219	0.000 \pm 0.000	0.700 \pm 0.145	0.300 \pm 0.145	0.467	1.000	-0.333
Заречье (17)	0.647 \pm 0.116	0.353 \pm 0.116	0.000 \pm 0.000	0.824 \pm 0.065	0.176 \pm 0.065	0.300	1.000	-0.185
Земледелец (17)	0.412 \pm 0.119	0.529 \pm 0.121	0.059 \pm 0.057	0.676 \pm 0.080	0.324 \pm 0.080	0.451	0.609	-0.180
Красный Перекоп (5)	0.200 \pm 0.179	0.600 \pm 0.219	0.200 \pm 0.179	0.500 \pm 0.158	0.500 \pm 0.158	0.556	1.000	-0.091

Обозначения: sp – стандартная ошибка частоты, H_E – ожидаемая гетерозиготность, HWE (P) – достоверность отклонения выборочных распределений частот генотипов от распределения по Харди-Вайнбергу, F_{IS} – коэффициент Райта.

Таблица 7

Частота генотипов и аллелей гена *ESR1* (*ex1* и *ex2*) у овец романовской породы, полл дорсет и суффолк

Порода	Частота генотипов гена <i>ESR-ex1</i> (\pm sp)			Частота аллелей гена <i>ESR-ex1</i> (\pm sp)		H_E	HWE (P)	F_{IS}
	<i>AA</i> (CC)	<i>AB</i> (CG)	<i>BB</i> (GG)	<i>G</i> (B)	<i>C</i> (A)			
Романовская	0.055 \pm 0.027	0.575 \pm 0.058	0.370 \pm 0.057	0.658 \pm 0.039	0.342 \pm 0.039	0.453	0.035	-
Полл дорсет	0.250 \pm 0.097	0.750 \pm 0.097	0.000 \pm 0.000	0.375 \pm 0.077	0.625 \pm 0.077	0.481	0.016	-
Суффолк	0.273 \pm 0.095	0.682 \pm 0.099	0.045 \pm 0.044	0.386 \pm 0.073	0.614 \pm 0.073	0.485	0.078	-
Порода	Частота генотипов гена <i>ESR-ex4</i> (\pm sp)			Частота аллелей гена <i>ESR-ex4</i> (\pm sp)		H_E	HWE (P)	F_{IS}
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>			
Романовская	0.449 \pm 0.071	0.510 \pm 0.071	0.041 \pm 0.028	0.704 \pm 0.046	0.296 \pm 0.046	0.421	0.177	-
Полл дорсет	0.900 \pm 0.095	0.100 \pm 0.095	0.000 \pm 0.000	0.950 \pm 0.049	0.050 \pm 0.049	0.100	1.000	0
Суффолк	0.100 \pm 0.095	0.700 \pm 0.145	0.200 \pm 0.127	0.450 \pm 0.111	0.550 \pm 0.111	0.521	0.520	-

Обозначения: sp – стандартная ошибка частоты, H_E – ожидаемая гетерозиготность, HWE (P) – достоверность отклонения выборочных распределений частот генотипов от распределения по Харди-Вайнбергу, F_{IS} – коэффициент Райта.

ВЫВОДЫ

1. С помощью ISSR-PCR маркеров изучены генетическая структура, параметры генетического разнообразия, филогенетические связи и генетические дистанции пяти генофондных хозяйств романовской породы овец. Обнаружены достоверные отличия по частоте встречаемости отдельных фрагментов ДНК между изученными сельскохозяйственными популяциями.
2. Методом кластеризации в программе STRUCTURE на основании данных ISSR-фингерпринтинга выполнен анализ популяционных структур романовской породы овец, который позволил провести оценку консолидированности популяций. По результатам кластеризации на внутривидовом уровне выявлено наличие двух кластеров в структуре генофонда, свидетельствующие о том, что в формировании породы принимали участие две исходные прародительские популяции, одна из которых внесла наибольший вклад в генофонды отар «Авангарда» и «Земледельца», вторая – «Дружбы», «Заречья» и «Красного Перекопа». Соответственно в современном генофонде романовской породы выделено две внутривидовые группы.
3. Сравнительный анализ спектров фрагментов ДНК разной длины у 33-х популяций 9 пород овец позволил выявить породоспецифичные фрагменты ДНК, а именно их совокупности, маркирующие породы. Впервые получена информация о генетическом разнообразии овец теленгитских и буубэй. По результатам сравнительного анализа по AG-ISSR-PCR маркеру романовские овцы оказались наиболее близки с тувинскими короткожирнохвостыми. С помощью метода иерархического усреднения частот проведена реконструкция «протогенофонда» овец, которая показала, что наиболее древними из изученных пород были эдильбаевские, тувинские и монгольские овцы.
4. Трехуровневый анализ разнообразия по данным AG-ISSR-анализа для девяти пород овец и оценка долей этих трех компонент в общем разнообразии показали, что на изменчивость между породами приходится - 15.8% ($D_{ST}=0.0297$), между популяциями внутри пород – 31.4% ($D_{CS}=0.0591$), на индивидуальное разнообразие внутри популяций – 52.8% ($H_C=0.0994$). Межпопуляционная изменчивость у тувинских овец оказалась практически равной внутривидовой, а у романовских и монгольских овец внутривидовая изменчивость значительно превышает межпопуляционную, что свидетельствует о важности ведения отбора и подбора в генофондных хозяйствах на уровне отдельных особей.
5. Впервые на основании рассчитанных значений коэффициента генетической оригинальности (КГО) по данным ISSR-PCR маркеров генофонд романовских овец был разделен на 5 классов, что позволило выделить в породе наиболее оригинальных и типичных особей. Наибольшее количество типичных для породы генотипов сосредоточено в хозяйствах «Красный Перекоп» и «Дружба». Наиболее оригинальный генофонд романовской породы содержится в агрофирме «Авангард».
6. На основании результатов анализа ассоциаций ISSR-фрагментов и фенотипических признаков романовских овец впервые установлена достоверная взаимосвязь с одним или более фрагментами ДНК для 9 хозяйственно-полезных признаков овец.
7. Выявлен полиморфизм гена рецептора эстрогена *ESR1* (1 и 4 экзоны) у овец романовской породы. В большинстве исследованных выборок по обоим изученным локусам показано преобладание частот *B* (G) и *C*-аллелей, соответственно по локусам *ESR-ex1* и *ESR-ex4*, а также преобладание гетерозиготных животных, кроме популяции «Заречье» (локус *ESR-ex4*).

8. Сравнительный анализ полиморфизма по локусам *ESR-ex1* и *ESR-ex4* гена *ESR1* выявил достоверное отличие (G-тест, $P < 0.01$ и $P < 0.05$, соответственно) генотипической изменчивости высоко плодовитой романовской породы овец от низко плодовитых пород канадской селекции (полл дорсет, суффолк).

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Полученные данные по ISSR-PCR маркерам и использованные способы оценок выявленного полиморфизма, предлагается применять для контроля и сохранения существующего генетического разнообразия отечественных пород овец.
2. Использование методов реконструкции «протогенофонда» и кластерного анализа позволяют определять как наиболее древние породы овец, интересные для изучения их филогенеза, так и реликтовые популяции в этих породах, сохранившие близкий к исходному тип животных. В свою очередь предоставляется возможность вести селекцию на сохранение наиболее древнего типа особей, а также оценить изменения, происходящие в породе в пространстве и времени.
3. В генофондных и племенных хозяйствах для контроля многоплодия у романовских овец следует проводить мониторинг полиморфизма и селекцию по гену рецептора эстрогена *ESR1* (1 и 4 экзоны).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК:

1. **Нестерук Л.В.**, Макарова Н.Н., Евсюков А.Н., Свищева Г.Р., Лхасаранов Б.Б., Столповский Ю.А. Сравнительная оценка генофондов пород овец на основании ISSR-анализа // Генетика, 2016. № 3. С. 1-11.
2. **Нестерук Л.В.**, Макарова Н.Н., Свищева Г.Р., Столповский Ю.А. Анализ ассоциаций между хозяйственно-полезными признаками романовских овец и ISSR-PCR маркерами // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки», 2015. № 12. С. 8-13.
3. **Нестерук Л.В.**, Макарова Н.Н., Свищева Г.Р., Евсюков А.Н., Столповский Ю.А. Оценка генетического разнообразия романовской породы овец с помощью коэффициента генетической оригинальности на основе данных ISSR-фингерпринтинга // Генетика, 2015. Т.51. № 7. С. 847-852.

Публикации в других изданиях:

4. Макарова Н.Н., **Нестерук Л.В.**, Столповский Ю.А., Москаленко Л.П., Николаева Е.А. Перспективы использования мультилокусных маркеров ДНК при сохранении и разведении генофонда романовской породы овец // Вестник АПК Верхневолжья, 2013. - № 2 (22). С. 75-80.
5. **Нестерук Л.В.**, Лазебная И.В., Столповский Ю.А. Полиморфизм гена эстрогенового рецептора (*ESR1*) у овец романовской породы, полл дорсет и суффолк // Сборник материалов V Ежегодной итоговой международной научно-практической конференции «Научные итоги 2015 года: достижения, проекты, гипотезы» / Под общ. ред. С.С. Чернова. – Новосибирск: Издательство ЦРНС, 2015. С. 24-28.
6. Сулимова Г.Е., Лазебная И.В., Перчун А.В., **Нестерук Л.В.**, Оюн Н.Ю., Столповский Ю.А. Популяционно-генетические основы сохранения генофондов домашних животных // Живая природа: современное состояние и проблемы развития.

Динамика и сохранение генофондов. Материалы отчётной конференции / М.: ИОГен, 2014. - С. 77-78.

7. **Нестерук Л.В.**, Макарова Н.Н., Свищева Г.Р., Евсюков А.Н., Столповский Ю.А. Анализ генофонда романовской породы овец на основе данных ISSR-фингерпринтинга // VI Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и системная биология» (16-21 ноября 2014 г., Звенигород, Россия). Тезисы докладов. - М.: ИМГ РАН, 2014. С. 33.
8. **Нестерук Л.В.**, Макарова Н.Н., Евсюков А.Н., Столповский Ю.А. Оценка генетического разнообразия романовской породы овец с использованием ISSR-маркеров // VI съезд ВОГиС (15-20 июня 2014г., Ростов-на-Дону). Тезисы докладов. С. 175.
9. **Нестерук Л.В.**, Евсюков А.Н., Балановский О.П., Столповский Ю.А. Анализ генофондов пород овец на основании оценок полиморфизма ISSR-PCR маркеров // Сборник тезисов молодёжной конференции "Популяционная генетика и геогеография: наука и практика". - 22 ноября 2013 года. Москва. С. 22.
10. **Nesteruk L.V.**, Balanovsky O.P., Stolpovsky Yu.A. Сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров у пород овец (Comparative analysis of polymorphism of ISSR-markers in breed of sheep) // European Science and Technology: materials of the III international research and practice conference, Vol. II, Munich, October 30th-31st, 2012 / publishing office Vela Verlag Waldkraiburg – Munich – Germany, 2012 p. 598-605.
11. **Касенкова Л.В.**, Балановский О.П., Столповский Ю.А. Использование ISSR-PCR маркеров для анализа генетической структуры и взаимоотношений между породами овец // Материалы всероссийской с международным участием научной конференции «Научное наследие Н.И. Вавилова и современность». Изд-во РГАУ-МСХА. Москва, 2012. С. 42.