

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ОВЕЦ КУЙБЫШЕВСКОЙ ПОРОДЫ

О.А. КОШКИНА, Т.Е. ДЕНИСКОВА, Н.А. ЗИНОВЬЕВА

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOMES OF SHEEP OF THE KUIBYSHEV BREED

O.A. KOSHKINA, T.E. DENISKOVA, N.A. ZINOVIEVA

Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center of Animal Husbandry – VIZ named after Academician L.K. Ernst"

Аннотация. В статье представлены результаты филогенетического анализа овец куйбышевской породы. Впервые получены и проанализированы в аспекте отдельных маркеров полные последовательности митохондриального генома российской породы овец. Установлен уровень полиморфизма в отдельных митохондриальных маркерах. Рассчитаны показатели генетического разнообразия как для отдельных генов, так и для полного митохондриального генома. На основании проведенного анализа построено филогенетическое дерево, а также определена гаплогрупповая принадлежность изучаемых овец. Регулярное проведение подобных работ способствует накоплению знаний о полиморфизмах всех митохондриальных маркеров. Полученные знания позволяют углубить понимание роли митохондриальной ДНК в жизнедеятельности овец.

Ключевые слова: куйбышевская порода овец, митохондриальная ДНК, гаплотипы, гаплогруппы, филогения.

Summary. Here, we present the results of a phylogenetic analysis of sheep of the Kuibyshev breed. Complete mitochondrial genome sequences of Russian sheep breed were obtained and then analyzed considering separate mitochondrial markers. The level of polymorphism in separate mitochondrial markers was established. Genetic diversity indicators were calculated for separate mitochondrial genes and for the complete mitochondrial genome. Based on the analysis, a phylogenetic tree was constructed, and the haplogroup assignment of the studied sheep was determined. Regular genetic monitoring will contribute to the accumulation of knowledge on the polymorphisms of all mitochondrial markers. Our study resulted in gaining new knowledge, which deepen the understanding of the role of mitochondrial DNA in the life functions support of sheep.

Keywords: Kuibyshev sheep breed, mitochondrial DNA, haplotypes, haplogroups, phylogeny.

Овцеводство играет важную роль в сельскохозяйственном производстве Российской Федерации, снабжая население страны сырьем (шерсть, овчины) и продуктами питания (молоко, мясо) [1]. Научно-исследовательские работы по оценке генетической изменчивости отечественных пород овец позволяют определить уровень их генетического разнообразия, поток генов между дикими и домашними формами, а также установить филогенетические связи между породами, что является важной составляющей в современной селекции

овец. Этому вопросу в современном мире посвящено множество исследований [2-8]. В основном, в предыдущих исследованиях оценка генетического разнообразия овец проводилась с использованием полиморфизма конкретных генов, микросателлитных локусов, либо отдельных регионов митохондриальной ДНК (мтДНК).

В филогенетических исследованиях, а также для изучения внутривидовой изменчивости овец в качестве генетических маркеров повсеместно используются регионы митохондриального генома. Благодаря своей высокой копийности и вариабельности, а также отсутствию рекомбинаций митохондриальная ДНК – это один из основных маркеров в популяционной генетике.

Большинство популяционных исследований овец основаны на единственном митохондриальном маркере, в большинстве случаев это D-петля [7, 9] или ген *CytB* [10]. Однако полиморфизм остальных митохондриальных генов остается без должного внимания. Использование полных митохондриальных геномов позволит расширить знания о роли мтДНК в жизнедеятельности овец.

Цель исследований. Определить полные последовательности митохондриального генома овец куйбышевской породы, на основании которых изучить генетическое разнообразие отдельных регионов мтДНК, а также установить филогенетические связи между представителями породы.

Материал и методика. Исследование проводилось на образцах ткани (ушной выщип) куйбышевской породы овец ($n = 10$), которые были взяты из биобанка «Банк генетического материала домашних и диких видов животных и птицы» (зарегистрирован Минобрнауки РФ № 498808), созданной и поддерживаемой в ФГБНУ ФИЦ животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста.

Из выбранных образцов была выделена ДНК с помощью коммерческого набора «ДНК-Экстрен-2» (ООО «Синтол», Россия) по стандартному протоколу производителя. Затем проводили оценку качества и количества полученной ДНК с использованием приборов: спектрофотометр NanoDrop 8000 («ThermoFisher Scientific, Inc.», США) и флуориметр Qubit 4.0 («Invitrogen/Life Technologies»,

США). Для дальнейшего исследования были отобраны пробы ($n = 7$) с концентрацией от 15 до 50 нг/мкл и соотношением поглощения OD_{260}/OD_{280} от 1,8 и выше.

Полные последовательности митохондрий овец были получены с использованием технологии секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS). Для этого были амплифицированы три перекрывающихся фрагмента мтДНК (область перекрытия более 290 п.н.) длиной 6500, 5700 и 6700 п.н. с использованием следующих пар праймеров: F1 5'-GTCCTCGCCCTA-ATCCTCTC-3', R1 3'-AGGGTGCCGATATCTTT-GTG-5'; F2 5'-ACCCAAACTCTTCTGTC-3', R2 3'-GGAAGTCAGA-ATGCGATGGT-5'; F3 5'-ACACCAAACCCACGCTTATC-3', R3 3'-GGGT-GTTGATAGTGGGGCTA-5'. Реакции проводили в конечном объеме 25 мкл: 10 мкл реакционного буфера (2,5% HF Reaction buffer), 10,25 мкл H_2O , 2,5 мкл dNTPs, 1 мкл смеси праймеров, 0,25 мкл SmartTaq HF-FuZZ ДНК полимеразы («Диалат Лтд.», Россия), 1 мкл ДНК. После начальной денатурации (2 мин при 94°C) проводили амплификацию в следующем температурно-временном режиме: 30 с при 94°C (1 цикл); 30 с при 61°C, 6,5 мин при 70°C (10 циклов); 30 с при 94°C, 30 с при 60°C, 3,5 мин при 70°C (25 циклов); заключительный этап – 10 мин при 72°C (термоциклер Applied Biosystems SimpliAmp («Thermo-Fisher Scientific, Inc.», США). Успешная амплификация всех трех фрагментов прошла у 5 животных. Полученные ампликоны были вырезаны из 1%-ого агарозного геля и очищены с использованием набора Cleanup Standard (ЗАО «Евроген», Россия). После очистки продуктов ПЦР из геля были отобраны пробы с концентрацией 10 нг/мкл и выше ($n = 3$).

Очищенные продукты ПЦР использовались для подготовки библиотек к секвенированию с помощью набора NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina по стандартному протоколу производителя, которые затем были секвенированы методом парных концевых прочтений по 300 п.н. на приборе MiSeq («Illumina, Inc.», США).

Для проведения филогенетического анализа в исследование были включены 10 последовательностей полных митохондриальных геномов овец, соответствующие гаплогруппам А (номер доступа в GenBank HM236174.1 и HM236175.1), В (номер доступа в GenBank HM236176.1 и HM236177.1), С (номер доступа в GenBank HM236178.1 и HM236179.1), D (номер доступа в GenBank HM236180.1 и HM236181.1) и Е (номер доступа в GenBank HM236182.1 и HM236183.1). Вышеперечисленные последовательности были загружены из базы данных NCBI.

Филогенетическое дерево было построено с помощью программного обеспечения MrBayes 3.2.7 с последующей визуализацией в FigTree 1.4.3.

Для расчета параметров генетического разнообразия (число полиморфных сайтов (S), среднее число нуклеотидных различий (K), число гаплотипов (H), гаплотипическое разнообразие (Hd), нуклеотидное разнообразие (π), ошибки средних арифметических ($\pm$ SEM)) использовалась программа DnaSP 6.12.01.

Результаты исследований и их обсуждение. Филогенетический анализ полных последовательностей митохондриальной ДНК овец куйбышевской породы, проведенный в данном исследовании, позволил определить генетическое разнообразие в отдельных митохондриальных маркерах, а также гаплогрупповую принадлежность изучаемых овец.

Полный митохондриальный геном исследуемых особей содержал 16615 п.н., в то время как у одной овцы была обнаружена вставка -GTTATA-, и ее геном был длиной 16623 п.н. Анализ полных митохондрий овец куйбышевской породы позволил обнаружить три гаплотипа ($n = 3$), что определило их высокое гаплотипическое разнообразие ($Hd = 1,000 \pm 0,272$). Было выявлено 26 полиморфных сайтов со средним числом нуклеотидных различий $K = 17,333$.

Как показано на рисунке 1, наибольшее нуклеотидное разнообразие с наивысшим количеством полиморфных сайтов было обнаружено в контрольном регионе (D-петля) ($\pi = 0,00508$; $S = 9$).

Стоит отметить, что не все митохондриальные маркеры характеризовались наличием полиморфизма. Нуклеотидное разнообразие других отдельных митохондриальных маркеров представлены в таблице 1.

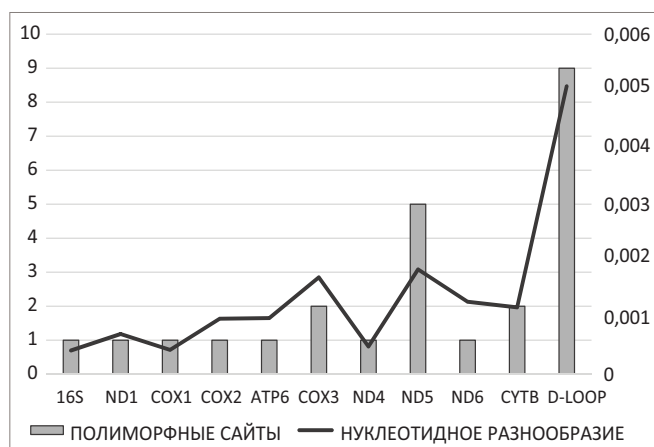


Рис. 1. Полиморфизм отдельных митохондриальных маркеров

Fig. 1. Polymorphism of separate mitochondrial markers

Таблица 1

Нуклеотидное разнообразие отдельных митохондриальных маркеров

Nucleotide diversity of separate mitochondrial markers

	16S	ND1	COX1	COX2	ATP6	COX3	ND4	ND5	ND6	CYTB	D-loop
π	0,00042	0,00071	0,00043	0,00098	0,00099	0,00171	0,00049	0,00185	0,00128	0,00118	0,00508
S	1	1	1	1	1	2	1	5	1	2	9

Примечание. π – нуклеотидное разнообразие; S – количество полиморфных сайтов.

Помимо D-петли высокий уровень полиморфизма показал митохондриальный ген *ND5* ($\pi = 0,00185$; $S = 5$). Наименьшим разнообразием ($\pi = 0,00042$; $S = 1$) характеризовался ген, кодирующий *16S* рРНК. Маркеры *12S*, *ND2*, *ATP8* и *ND3* оказались неполиморфны.

Анализ филогенетического дерева (рис. 2), построенного с использованием программы MrBayes 3.2.7, позволил определить принадлежность исследуемых особей к гаплогруппе В, которая характерна для овец европейского происхождения.

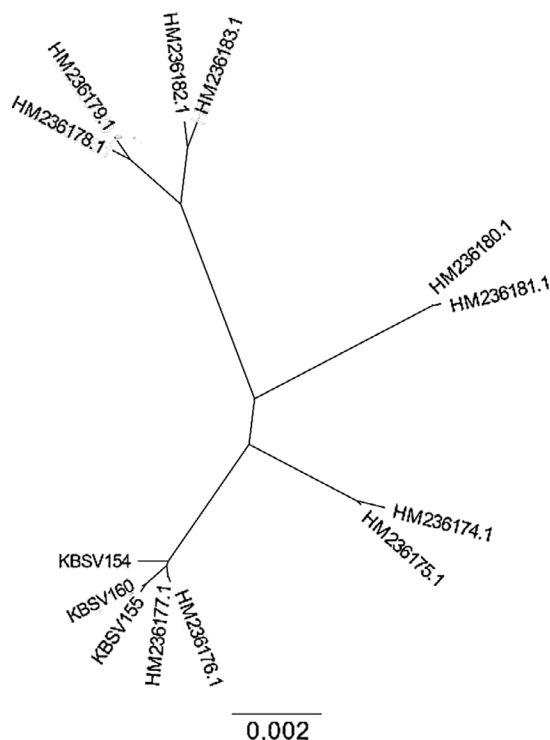


Рис. 2. Байесовское филогенетическое дерево, отражающее генетические связи исследуемых овец ($n = 3$) куйбышевской породы и носителей пяти гаплогрупп домашних овец (*Ovis aries*)

Fig. 2. Bayesian phylogenetic tree representing the genetic relationships of the studied sheep of the Kuibyshev breed ($n = 3$) and carriers of five haplogroups of domestic sheep (*Ovis aries*)

Выводы. В заключении хотелось бы отметить, что полученные нами данные позволяют судить о распределении полиморфизмов по всему митохондриальному геному домашней овцы. Помимо филогенетических исследований митохондриальный геном также интересен в аспекте изучения отдельных маркеров, полиморфизмы которых могут служить основой адаптационных способностей овец к различным климатическим условиям и высотным широтам, как это ранее наблюдалось у других видов млекопитающих [11]. Нами планируется продолжение исследования на большем количестве российских пород овец. Дальнейшие исследования в этой области помогут более точно понять роль митохондриального генома в адаптационных способностях домашних овец.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пушкарев М.Г. Состояние породного овцеводства и козоводства России // Научные разработки и инновации в решении стратегических задач агропромышленного комплекса: Материалы Международной научно-практической конференции. В 2-х томах, Ижевск, 15-18 февраля 2022 года. – Ижевск: Ижевская государственная сельскохозяйственная академия, 2022. – С. 85-87.
2. Лушников В.П. Полиморфизм гена *CAST* у овец татарстанской и эдильбаевской пород / В.П. Лушников, Т.О. Фетисова, А.А. Стрильчук // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2020. – № 2. – С. 9-11.
3. Abecia J.A. Ewes giving birth to female lambs produce more milk than ewes giving birth to male lambs / J.A. Abecia, C. Palacios // Italian Journal of Animal Science. 2018; 17(3):736-739. doi: 10.1080/1828051X.2017.1415705.
4. Golik T.V. Spectra of ISSR-PCR Markers in Assessments of the Intrinsic Genetic Differentiation of the Karachai Horse / T.V. Golik, I.I. Gaponova, E.A. Knyaseva, T.A. Erkenov, T.T. Glazko. // Biogeosystem Technique. 2017; 4 (1): 9-24. DOI: 10.13187/bgt.2017.1.9.
5. Glazko V.I. Genetic Structure of Karachai Horses on ISSR-PCR Markers / V.I. Glazko, T.A. Erkenov, T.T. Glazko, K.M. Dzatoev // Biogeosystem Technique. 2016; 9(3):195-204. DOI: 10.13187/bgt.2016.9.195.
6. Денискова Т.Е. Оценка биоразнообразия межвидовых гибридов рода *Ovis* с использованием STR- и SNP-маркеров / Т.Е. Денискова, А.В. Доцев, В.А. Багиров [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – № 52 (2). – С. 251-260. – DOI 10.15389/agrobiology.2017.2.251rus.
7. Meadows J.R. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East / J.R. Meadows, I. Cemal, O. Karaca, E. Gootwine, J.W. Kijas // Genetics. 2007; 175(3): 1371-1379 doi: 10.1534/genetics.106.068353.
8. Кошкина О.А. Оценка материнской изменчивости российских локальных пород овец на основе анализа полиморфизма гена цитохрома *b* / О.А. Кошкина, Т.Е. Денискова, А.В. Доцев [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – № 56 (6). – С. 1134-1147. – DOI 10.15389/agrobiology.2021.6.1134rus.
9. Barbato M. Islands as time capsules for genetic diversity conservation: the case of the giglio island mouflon / M. Barbato, M. Masseti, M. Pirastru, N. Columbano, M. Scali, R. Vignani, P. Mereu, // Diversity. 2022; 14(8): 609.
10. Liu J. Phylogeography and phylogenetic evolution in Tibetan sheep based on MT-CYB sequences / J. Liu, Z. Lu, C. Yuan, F. Wang, B. Yang // Animals. 2020; 10(7): 117 (doi: 10.3390/ani10071177).
11. Yu L. Mitogenomic analysis of Chinese snub-nosed monkeys: Evidence of positive selection in NADH dehydrogenase genes in highaltitude adaptation / L. Yu, X. Wang, N. Ting, Y. Zhang // Mitochondrion. 2011; 11(3): 497-503. https://doi.org/10.1186/s12862-017-0896-0.

REFERENCES

1. Pushkarev M.G. The state of pedigree sheep and goat breeding in Russia // Scientific developments and innovations in solving strategic tasks of the agro-industrial complex: Materials of the International scientific and practical conference. In 2 volumes, Izhevsk, February 15-18, 2022. – Izhevsk: Izhevsk State Agricultural Academy, 2022. – Pp. 85-87.

2. Lushnikov V.P. Polymorphism of the cast gene in sheep of Tatarstan and Edilbaevsky breeds / V.P. Lushnikov, T.O. Fetisova, A.A. Strilchuk // Sheep, goats, wool business. – 2020. – No. 2. – Pp. 9-11.

3. Abecia J.A. Ewes giving birth to female lambs produce more milk than ewes giving birth to male lambs / J.A. Abecia, C. Palacios // Italian Journal of Animal Science. 2018; 17(3):736-739. doi: 10.1080/1828051X.2017.1415705.

4. Golik T.V. Spectra of ISSR-PCR Markers in Assessments of the Intrinsic Genetic Differentiation of the Karachai Horse / T.V. Golik, I.I. Gaponova, E.A. Knyaseva, T.A. Erkenov, T.T. Glazko. // Biogeosystem Technique. 2017; 4 (1): 9-24. DOI: 10.13187/bgt.2017.1.9.

5. Glazko V.I. Genetic Structure of Karachai Horses on ISSR-PCR Markers / V.I. Glazko, T.A. Erkenov, T.T. Glazko, K.M. Dzatoev // Biogeosystem Technique. 2016; 9(3):195-204. DOI: 10.13187/bgt.2016.9.195.6. Deniskova T.E. Assessment of biodiversity in interspecific hybrids of the genus "Ovis" using SPO and SnP markers / T.E. Deniskova, A.V. Dotsev, V.A. Bagirov [et al.] // Agricultural biology. – 2017. – № 52 (2). – Pp. 251-260. – DOI 10.15389/agrobiol.2017.2.251rus.

7. Meadows J.R. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East / J.R. Meadows, I. Cermal, O. Karaca, E. Gootwine, J.W. Kijas // Genetics. 2007; 175(3): 1371-1379 doi: 10.1534/ge-netics.106.068353.

8. Koshkina O.A. Assessment of maternal variability of Russian local sheep breeds based on the analysis of cytochrome b gene polymorphism / O.A. Koshkina, T.E. Deniskova,

A.V. Dotsev [et al.] // Agricultural Biology. – 2021. – № 56 (6). – Pp. 1134-1147. – DOI 10.15389/agrobiol.2021.6.1134rus.

9. Barbato M. Islands as time capsules for genetic diversity conservation: the case of the giglio island mouflon / M. Barbato, M. Masseti, M. Pirastru, N. Columbano, M. Scali, R. Vignani, P. Mereu, // Diversity. 2022; 14(8): 609.

10. Liu J. Phylogeography and phylogenetic evolution in Tibetan sheep based on MT-CYB sequences / J. Liu, Z. Lu, C. Yuan, F. Wang, B. Yang // Animals. 2020; 10(7): 117 (doi: 10.3390/ani10071177).

11. Yu L. Mitogenomic analysis of Chinese snub-nosed monkeys: Evidence of positive selection in NADH dehydrogenase genes in high altitude adaptation / L. Yu, X. Wang, N. Ting, Y. Zhang // Mitochondrion. 2011; 11(3): 497-503. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0896-0>.

Кошкина Ольга Андреевна, аспирант, мл. науч. сотрудник группы генетики и геномики мелкого рогатого скота, тел.: (926) 532-21-19, e-mail: olechka1808@list.ru; **Денискова Татьяна Евгеньевна**, канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник группы генетики и геномики мелкого рогатого скота, тел.: (916) 914-20-17, e-mail: horarka@yandex.ru;

Зиновьева Наталия Анатольевна, доктор биол. наук, профессор, академик РАН, директор, тел.: (4967) 65-11-63, e-mail: priemnaya-vij@mail.ru; ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Контактный телефон (916) 914-20-17, e-mail: horarka@yandex.ru

УДК 636.32/38:575.1

DOI: 10.26897/2074-0840-2022-4-11-16

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МНОГОПЛОДИЯ ОВЕЦ

А.И. ЕРОХИН, Е.А. КАРАСЕВ, Ю.А. ЮЛДАШБАЕВ, С.А. ЕРОХИН, И.Н. СЫЧЕВА

Российский государственный аграрный университет –
Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева

GENETIC BASES OF SHEEP MULTIPLICITY

A.I. EROKHIN, E.A. KARASEV, YU.A. YULDASHBAYEV, S.A. EROKHIN, I.N. SYCHEVA

Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev

Аннотация. В статье рассмотрены некоторые аспекты повышения плодовитости овец путем использования в селекционном процессе некоторых генетических факторов, которые имеются в популяциях животных соответствующих пород.

Ключевые слова: плодовитость, генетические факторы, тип рождения, одно- и разнополые двойни, куйбышевская и романовская породы овец.

Summary. The article discusses some aspects of increasing the fertility of sheep by using in the breeding process some genetic factors that are present in the populations of animals of the corresponding breeds.

Keywords: fertility, genetic factors, type of birth, same- and opposite-sex twins, Kuibyshev and Romanov sheep breeds.

В овцеводстве уровень и эффективность производства баранины, шерсти и другой продукции в значительной мере определяются показателями

воспроизводства маток и сохранности полученного молодняка. Достаточно сказать, что матка с двумя ягнятами в расчете на каждый килограмм произведенной баранины затрачивает на 35-50% корма меньше, чем матка с одним ягненком.

При высокой плодовитости маток и выращивании большого количества молодняка, кроме того, создаются предпосылки повышения эффективности селекции, поскольку расширяются возможности для более строгого отбора и ускорения смены поколений.

Анализируемые материалы получены в основном на овцах куйбышевской и романовской пород. Работы выполнялись в племязаводе овец куйбышевской породы «Дружба» Самарской области и в ОПХ «Тутаево» Ярославского НИИ животноводства и кормопроизводства на овцах романовской породы. В Советский период в этих хозяйствах племенная работа, с нашим участием,