

На правах рукописи

СТОЛПОВСКИЙ
ЮРИЙ АНАТОЛЬЕВИЧ

«ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
СОХРАНЕНИЯ РЕСУРСОВ ГЕНОФОНДОВ
ДОМЕСТИЦИРОВАННЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ»

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва
2010

Работа выполнена в лаборатории сравнительной генетики животных
Института Общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Научный консультант: член-
корреспондент РАН, доктор
биологических наук, профессор
Илья Артемьевич Захаров-Гезехус

Официальные оппоненты: доктор
биологических наук, профессор
Марлен Мкртычевич Асланян
доктор биологических наук, профессор
Александр Федорович Смирнов
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор
Дмитрий Васильевич Карликов

Ведущая организация: Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2010 года в _____
час. _____ мин.

на заседании диссертационного Совета (Д 002.214.01) при Институте общей
генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, ул.
Губкина, 3.

факс: (499) 132-89-62, e-mail: aspirantura@vigg.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОГен РАН

Автореферат разослан «_____» _____ 2010 года

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
кандидат биологических наук

Т.А. Синельщикова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Мировая тенденция индустриализации сельского хозяйства несет в себе множество рисков. Один из них — это сокращение национальных генетических ресурсов животных и растений (доктрина продовольственной безопасности РФ, 2010). Включение в отечественное сельское хозяйство транснациональных животноводческих индустрий создает опасность сокращения собственных генетических ресурсов сельскохозяйственных видов, зависимость от импорта, а также угрозу глобализации распространения инфекций и скрытых генетических дефектов. В то же время создание индустриальных цепочек производства продовольствия уменьшает эффективность использования богатства природных комплексов/ландшафтов, особенно разнообразных на территории России, и тормозит развитие биоорганического сельского хозяйства. Отсюда следует все возрастающая важность сохранения генофондов отечественных сельскохозяйственных видов животных.

Сегодня проблемы контроля и управления породами сельскохозяйственных животных приобретают международное значение, поскольку затрагивают многие страны мира, особенно обладающие большой территорией, различными агроэкологическими и экономическими условиями. Проблему сохранения генетических ресурсов местных пород животных мировое сообщество тесно связывает с необходимостью сохранения культурных традиций, биологизации сельского хозяйства, с продовольственной безопасностью, устойчивым развитием сельского хозяйства и агроэколандшафтов в мире и его отдельных регионах, а также качеством жизни в целом.

Потеря породного разнообразия оказывается не только утратой уникального и бесценного генетического разнообразия, но и сужением генетического потенциала, принципиально ограничивающим возможности селекционной работы, породообразовательного процесса в настоящем и будущем (Иванов М., 1924, 1970; Серебровский, 1928; Адамец, 1933; Лобашев, 1954; Maijala, 1970; Глембоцкий и др., 1972; Simon, 1984; Беляев, 1987; Bodo, 1989; Дмитриев и Эрнст, 1994; Алтухов, 2004; Паронян и Прохоренко, 2008; FAO, 1981–2009; Slow Food, 2009).

Важность сохранения «культурного» биоразнообразия подтверждена в международной конвенции о биологическом разнообразии, принятой на форуме «Повестка дня на XXI век». В конвенции подчеркивается значение сохранения и регионального использования генетических ресурсов для продовольствия и сельского хозяйства, с учетом взаимозависимости стран, обладающих этими ресурсами, для продовольственной безопасности планеты (КБР, 1992, 2002).

Сегодня в России нет надежной системы (организационной и биологической) сохранения генетических ресурсов domesticированных видов. Современные подходы к сохранению биоразнообразия не дают четкого ответа на вопросы: «какие породы необходимо сохранять и каковы

должны быть принципы сохранения». При наличии представлений о фенотипическом «стандарте» породы, отсутствуют данные и принципы выявления генетического, генофондного «стандарта» породы, нет четкого представления о таких понятиях, как «единица, эффективность и потенциал сохранения, генетические: уникальность, мониторинг и паспортизация», об оценке генетического разнообразия на молекулярно-генетическом уровне и т.д.. Отсутствие фундаментальных знаний, концепций, стратегий, тактик и законов о сохранении генетических ресурсов животных в целях обеспечения продовольственной безопасности препятствует согласованным действиям на региональном, федеральном и международном уровнях, формированию надежных и современных механизмов сохранения и управления породным разнообразием и пороодообразовательным процессом в Российской Федерации.

Очевидно, что первым этапом в разработке программ по сохранению пород является определение методов и принципов выявления их генетического своеобразие. Исследования генетической структуры локальных пород различных видов сельскохозяйственных животных с помощью популяционно-генетических методов необходимы, прежде всего, для создания генетически обоснованных программ по выявлению генетической изменчивости, ее анализу, в целях дальнейшего сохранения и использования, в том числе для нужд современного агропромышленного комплекса.

Цель и задачи исследования. Основная цель исследования заключалась в разработке концепции и принципов сохранения генофондов аутохтонных пород domesticiрованных видов, единой организационной системы сохранения и генетического мониторинга на основе популяционно-генетических и статистических методов.

Конкретные задачи нашего исследования сводились к следующему:

- Оценить качественные и количественные характеристики породного разнообразия России. Провести анализ динамики численности пород основных сельскохозяйственных видов и породного разнообразия на примере крупного рогатого скота;
- Определить пороодообразовательные центры в Российской Федерации;
- Разработать новую организационную схему для сохранения генетических ресурсов domesticiрованных видов на территории РФ;
- Разработать принципы генетического мониторинга и оценок межпородного и видового генетического разнообразия, а также чистопородности пород, сохраняемых в генофондных хозяйствах;
- Провести сравнительный анализ генетической структуры аутохтонных пород domesticiрованных видов с использованием морфологических признаков, структурных генов, полилокусных ДНК-маркеров;
- Разработать генетические характеристики видов и пород, в том числе генофондный стандарт породы на основе ISSR-фингерпринтинга;

- Разработать принципы создания генетически обоснованных программ по сохранению (управлению) генетическими ресурсами домашних животных, а также стратегии по их сохранению *in situ*.

Научная новизна полученных результатов. Сопоставление происхождения 198 пород 33-х domesticiрованных видов впервые позволило локализовать на территории России пять основных центров наиболее интенсивного пороодообразования. Впервые на основании выявленных пороодообразовательных центрах сформулирована концепция и организационная схема сохранения генофондов domesticiрованных видов *in situ*. Предложена система генетического мониторинга, основанная на популяционно-генетическом анализе морфологических признаков, полиморфизма структурных генов и полилокусных маркеров ДНК. Впервые выполнены комплексные популяционно-генетические исследования генофондов целого ряда видов и пород, которые позволили оценить генетическое разнообразие и выявить видо- и породоспецифические характеристики. Сочетания фенов, аллелей структурных генов, полилокусных спектров последовательностей ДНК позволяют надежно дифференцировать породы, выделять породоспецифические признаки, породоспецифические аллели структурных генов, отслеживать изменения генетического разнообразия во времени и пространстве. Впервые разработана общая шкала длин фрагментов ДНК, фланкированных динуклеотидными микросателлитами $(GA)_n$ C и $(AG)_n$ C, для 6 видов парнокопытных, которая позволяет надежно генотипировать животных одновременно по 38 продуктам ПЦР, выполнять внутри- и межпородные, межвидовые сравнения, проводить мониторинг генофондов, определять параметры генетического разнообразия, контролировать чистопородность животных. Впервые выполнены сравнительные исследования спектров полилокусных фрагментов ДНК, фланкированных участками микросателлитных локусов (ISSR-PCR), ряда пород крупного рогатого скота, яка, овец, коз, свиней, верблюдов, которые позволили выявить консервативные ПЦР-продукты, переменные, а также породоспецифические спектры фрагментов. На основании полученных данных впервые сформулированы понятия «генофондный профиль» вида (породы), «видо- и породоспецифического паттерна», «генофондного стандарта породы». Использование мультилокусного межмикросателлитного анализа (ISSR-PCR) совместно с методом к-кластеризации популяционных структур стало основой для создания ряда тестов молекулярно-генетической экспертизы и исследования популяционной структуры domesticiрованных видов животных. Впервые с помощью ISSR-маркеров показаны возможности анализа популяционной структуры domesticiрованных видов, сходства и различия генофондов пород (внутрипородных групп), их идентификации и наглядной оценки консолидированности, чистопородности и генеалогических связей. На основании полученных данных вычислен «протогенофонд» крупного рогатого скота, установлены наиболее приближенные к «прапопуляции» породы

и филогенетические связи между исследуемыми группами животных, что позволяет устанавливать приоритеты в сохранении породного разнообразия. Анализ параметров генетического разнообразия позволил обосновать предположение, что в популяциях крупного рогатого скота существует некий «оптимум» средней гетерозиготности или благоприятные показатели по определенным генетическим параметрам. Их колебания могут сигнализировать о различных процессах, происходящих в популяции, или стать генетическим инструментом контроля над генофондом породы.

Научно-практическое значение полученных результатов. Разработана новая организационная схема сохранения генофондов отечественных пород, основанная на международном и отечественном опыте и географическом расположении пороодообразовательных центров в Российской Федерации. Предложена концепция генетического мониторинга — комплексный метод анализа и контроля генетической структуры пород domesticированных видов, основанный на оценке параметров генетического разнообразия.

Предложен метод оценки консолидации и чистопородности популяций домашних животных, основанный на полиморфизме ISSR-маркеров, который может быть использован в генофондных и племенных хозяйствах РФ. На примере популяций крупного рогатого скота и овец показан алгоритм действий для анализа меж- и внутри- популяционной генетической изменчивости на геномном уровне, который позволяет определить:

- прапопуляцию породы, что важно при сохранении изначальной генетической структуры породы
- принадлежность популяции (индивидуальной особи) к той или иной породе, виду
- наиболее типичных для породы популяций (особей), с точки зрения, современной сформировавшейся генетической структуры
- чистопородные и синтетические стада (популяции).

Предложенный алгоритм исследования позволяет в зависимости от поставленных задач выбирать селекционную тактику при разведении и сохранении пород *in situ*, в том числе и контролировать процесс восстановления породы, после интродукции в нее производителей других пород.

На основании разработанных подходов выполнен анализ генетических структур стад 40 хозяйств базовых domesticированных видов, претендующих на получение генофондного статуса, позволивший выделить среди них наиболее консолидированные и наиболее гетерогенные.

На примере пород КРС предложен метод оценки пород как генетического объекта сохранения и метод определения вклада конкретной породы в общее разнообразие по ISSR-маркерам, что может стать одним из критериев при выборе пород для сохранения *in* и *ex situ*.

Полученные материалы могут быть использованы при разработке национальной доктрины развития российского животноводства, в частности его «генофондного» направления.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

Разработка концепции сохранения и управления генофондами domesticированных видов животных требует качественно новых, геномных методов их мониторинга. В связи с этим к основным положениям диссертационной работы, выносимым на защиту, относятся следующие:

1. Предложена универсальная шкала, которая позволяет надежно генотипировать 38 ПЦР-продуктов, полученных методом ISSR-PCR. Использование межмикросателлитного анализа совместно с методом к-кластеризации популяционных структур является основой тестов молекулярно-генетической экспертизы и исследования генофонда domesticированных видов животных.
2. Выявление и одновременная оценка не менее 20–30 независимых локусов в одном геноме с помощью ISSR-маркеров позволяют выявлять генофондные особенности на уровне популяций, пород, помесных групп животных и видов, что может быть использовано как компонент комплексного генетического мониторинга динамики генофондов и сохранения разнообразия domesticированных видов.
3. В полученном методом ISSR-PCR спектре ПЦР-продуктов выделяются сочетания фрагментов ДНК, ассоциированные с генеалогическими связями между исследованными группами животных, а также эволюционно консервативные у разных видов.
4. С помощью ISSR-фингерпринтинга получены оценки, которые позволяют количественно характеризовать ценность каждой породы, предложен критерий для выбора пород, подлежащих сохранению, на основе молекулярно-генетических данных.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены и докладывались на III-й школе-семинаре по генетике и селекции животных (Новосибирск-Горно-Алтайск, 1989), Российско-украинском совещании по генетике сельскохозяйственных животных (Аскания-Нова, 1992), на I, II международных конференциях «Молекулярно-генетические маркеры животных» (Киев, 1994, 1996); 46-ом конгрессе ЕААР (Прага, 1994); международной конференции «Проблемы сохранения редких пород домашних животных и близкородственных диких видов» (Пушино, 1996); международной конференции «ДНК-технологии» (Киев, 1997), первой научной школе-конференции «Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических ресурсов» (Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, 2000), международном симпозиуме «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология» (Москва-Минск, 2001), международном конгрессе по сохранению биологического разнообразия (Неаполь, 2003), I и II международных научно-практических конференциях «Биоразнообразие и сохранение генофонда флоры, фауны и народонаселения Центрально-Азиатского региона» (Кызыл, 2003, 2007), международном форуме Terra Madre I, II, III (Турин, 2004, 2006, 2008), конференции «Динамика

генофондов растений, животных и человека» (Москва, 2005), Всероссийском учредительном съезде-конференции «Сохранение генетических ресурсов» (Москва, 2006), научно-практической конференции «Актуальные вопросы развития звероводства» ВВЦ «Золотая Осень» (Москва, 2007), международной конференции «Научное наследие Н.И. Вавилова – фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства» (Москва, 2007), заседании конвивиума «Суздаль-Нива» международной организации «Слоу-Фуд» (Суздаль, 2007), Семинаре ФГОУ ВПО МГВМиБ им. Скрыбина и ВНИИЖ «Новый порядок аттестации племенных хозяйств, правила определения видов организаций по племенному животноводству. Проблемы, возникающие при работе с импортным скотом, и пути их решения» (Дубровицы, 2008), 59 и 60-ой международных научно-практических конференциях «Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе» (Кострома, 2008, 2009), международной конференции «Продуктивность, ветеринария, агроэкономика и продовольственная безопасность» (Черногория, 2008), V всероссийском съезде генетиков и селекционеров (Москва, 2009), семинаре животноводов в республике Алтай (Кош-Агач, 2009). Материалы исследования были использованы в учебном процессе — курсе лекций «Генетика сельскохозяйственных животных» для студентов сельскохозяйственного факультета Российского Университета Дружбы Народов, в рабочей программе «Генофонд сельскохозяйственных животных и его использование в селекции» ГОУВПО «Новгородский государственный университет им. Ярослава Мудрого», в учебном процессе Тывинского государственного университета (кафедра зоотехнии).

Декларация личного участия автора. В диссертационной работе использованы экспериментальные и аналитические материалы, полученные лично автором и совместно с сотрудниками лаборатории сравнительной генетики животных ИОГен РАН им. Н.И. Вавилова. Автору принадлежит решающая роль в разработке плана экспериментов, их осуществления, анализе и обобщения полученных результатов, а также организации экспедиций по сбору образцов биологических тканей у представителей различных пород domesticiрованных видов. Суммарно личное участие автора составляет около 80%.

Благодарности. Значительная часть работы по изучению структурных генов, морфологических признаков была выполнена на базе Института Цитологии и Генетики СО РАН. Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в сборе и обсуждении материала данной работы, получении первых навыков в исследовании полиморфизма структурных генов, митохондриальной ДНК доктору биологических наук С.М. Закияну (ИЦиГ СО РАН), С.Б. Кузнецову (University of Rhode Island, USA), М.Р. Мулаканову, Н. Холодилову, М. Бочкареву и О.Б. Прушинской (ИЦиГ СО РАН). Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам сравнительной генетики животных ИОГен РАН: профессору Г.Е. Сулимовой, И.Г. Моисеевой, С.В. Уханову, Н.В. Кол, М.Н. Рузиной, В.Н. Воронковой за помощь в исследовании

полиморфизма ISSR-маркеров и в разработке концепции сохранения генофондов domesticированных видов. Автор признателен В.И. и Т.Т. Глазко (ТСХА) за совместное исследование генофондов животных Украины и России. Автор благодарит А.С. Баранова (ИБР РАН) за помощь в изучении фенотипов КРС и всестороннюю поддержку. Большую роль в организации экспедиций в саяно-алтайском регионе оказали Ч.М. Доржу (Тывинский Университет) и Цэндсүрэн Цэдев (Институт Биологии МАН). Автор выражает искреннюю признательность за совместную работу и за помощь в сборе биологического материала ветеринарным врачам: С. Елекову, А.П. Тодошеву, а также И.Е. Кадцину (республика Алтай) и Т.Д. Халматовой (ДИАМ, Москва), А.А. Шаршову (ИЦиГ СО РАН). Автор признателен А.Н. Евсюкову (ИОГен РАН), Д.В. Щепоткину (ИБР РАН) за помощь в статистической обработке данных, их обсуждении и оформлении. Автор благодарит за техническую и моральную поддержку Г.В. Костюнину и Г.Х. Абидулину (ИОГен РАН). Неоценимую роль в сборе информации и обсуждении проблемы сохранения генетических ресурсов животных в мире оказали сотрудники международной организации Slow Food International (Italy) Лилия и Виктория Смелковы и Л.В. Щербак (МСХ РФ).

Автор выражает большую признательность и благодарность своему научному консультанту и учителю профессору Илье Артемьевичу Захарову-Гезехусу.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 86 научных работ – 6 монографий, 61 статья в научных и научно-популярных журналах, сборниках трудов, научных вестниках, международных бюллетенях и 19 сообщений в материалах и тезисах отечественных и международных конференций.

Структура и работы. Диссертационная работа изложена на 339 страницах печатного текста и включает 42 таблицы и 74 рисунка. Диссертация состоит из введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы», четырех глав, излагающих результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, состоящего из 333 источников, в том числе 170 публикаций на русском языке, и 9 приложений.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальный материал получен при проведении экспедиционных исследований в период с 1986 по 2009 годы, а также на базе НИЦ Института Общей Генетики РАН при проведении молекулярно-генетического тестирования животных на предмет установления или подтверждения генофондного и племенного статусов хозяйств. Всего различными генетико-селекционными методами исследовано 35 пород среди 6 domesticированных видов: 21 порода КРС; 4 — овец; 3 — свиней; 3 — коз; 2 — верблюдов; алтайский, тувинский, монгольский яки. Итого **3422** животных из **70** популяций России, Украины, Монголии, Венгрии, Германии, Ирландии. Образцы ряда пород КРС любезно

предоставлены сотрудниками сельскохозяйственного университетского колледжа г. Дублина (Ирландия) и научно-исследовательского центра животноводства Академии сельскохозяйственных наук (Дюссельдорф-Росток, Германия).

Электрофорез проводили в вертикальных пластинах полиакриламидного геля в буферных системах Лэммли (Laemmli, 1970) и Ганэ (Gahne, 1977) с некоторыми нашими модификациями. Для типирования трансферринов нами использовались эталонные сыворотки, любезно предоставленные Blood group Laboratory, Central Association A.I. (Финляндия) и Blood Typing Laboratory, Livestock Improvement Association of A.I. (Япония). Электрофоретические варианты ряда ферментов выявляли с использованием электрофореза в крахмальном геле по методике (Smithies, 1955) с последующим гистохимическим окрашиванием.

В качестве маркеров полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов (ISSR-PCR маркеры), использовали стандартный метод, разработанный Зиеткевичем и соав. (Zietkiewicz et al, 1994). Молекулярные массы продуктов амплификации оценивали с применением маркера молекулярных масс 0,1-kb (тысяч пар оснований) DNA Ladder (Gibco BRL).

Для оценки морфологических фенотипов крупного рогатого скота использовали метод визуальной оценки и фотографирования морфологических фенотипов по методике, разработанной автором. Расчет коэффициентов фенетического разнообразия выполняли по Животовскому (Животовский, 1980).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью стандартных компьютерных программ «BIOSYS-I» «STATISTICA 8.0» (StatSoft. STATISTICA for Windows (computer program manual) / 1996. StatSoft, Inc., Tulsa, OK), «POPGENE 1.32» (Yeh F.C., Yang R.-C. Boyle T. POPGENE VERSION 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis Quick User Guide/ 1999.). STRUCTURE 2.2, 2.3.3 (Pritchard et al, 2000, Negrini et al, 2007; Mosher et al., 2009). Генетическое расстояние между внутривидовыми группами определяли по Нею (Nei, 1972).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Состояние генетических ресурсов domesticированных животных Российской Федерации

Для подтверждения актуальности разработок методов генофондного контроля и сохранения отечественных сельскохозяйственных видов выполнены анализ и обобщение информации, представленной в изданиях Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в течение последних 20 лет, и дополненные материалами регулярных экспедиций, проводимых Институтом Общей Генетики им. Н.И. Вавилова РАН в течение 1990 – 2009 гг, в различных эколого-географических регионах России. Получены следующие данные.

На территории Российской Федерации разводится более 400 пород, относящихся к 46 видам сельскохозяйственных животных — млекопитающих, птиц, рыб и насекомых. Среди одомашненных представителей зоологических классов лидируют млекопитающие (21 вид), затем следуют рыбы (14), птицы (9) и насекомые (2). Наибольшее число пород в виде на территории России зарегистрировано у собак (56 пород), кур (52), лошадей (40), овец (38), крупного рогатого скота (33), гусей (24), свиней (21), американских норок (15), карпов (12). Доля исконно российских пород, то есть выведенных в России, среди общего количества разводимых в РФ (2007 г.) колеблется от 27% (куры) и до 70% (овцы, лошади) и 85–91% (козы и карпы).

С 1990 года по 2009 годы в России численность сельскохозяйственных животных уменьшалась. Так, поголовье крупного рогатого скота сократилось на 36 млн. 21 тысячу или на 63,2%, лошадей на 1 млн. голов 269 тысяч или 49,5%, свиней на 22 млн. 151 тысячу или на 57,9%, овец и коз на 36 млн 651 тысячу или на 63%, птицы на 322 млн. или на 49%.

Снижение численности привело к сокращению породного разнообразия, исчезли как малочисленные ранее завезенные импортные, так и отечественные породы, а также повысилась вероятность генетической эрозии за счет снижения генетического разнообразия.

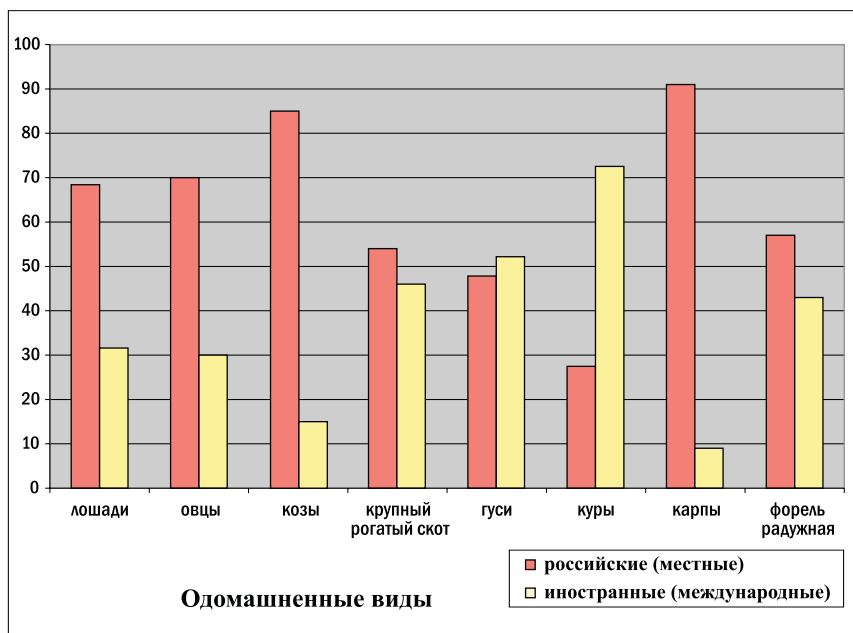


Рис. 1. Соотношение российских (местных) и иностранных (международных) пород, зарегистрированных в Госреестре РФ (%), 2007 г.

3.1.1. Сравнительный анализ породного состава эколого-географических регионов России для выявления отечественных центров пороодообразования

На основании полученных данных предпринята попытка определения основных центров породного богатства (или условные центры пороодообразования) в России. В этих целях выполнен анализ происхождения 198 пород российской селекции 33-х сельскохозяйственных видов, представленных в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию ФГУ «Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений» МСХ Российской Федерации. Это позволило впервые оценить географические закономерности распределения отечественных пород по 66 регионам Российской Федерации (см. рис. 2).

В результате анализа количества сформированных пород на территории Российской Федерации выделяется 5 основных центров с наибольшим количеством выведенных пород:

- Северно-европейский (Ленинградская область)
- Центрально-европейский (Московская, Воронежская, Кировская области)
- Южно-европейский (Краснодарский, Ставропольский края, Ростовская область)



Рис. 2. Центры пороодообразования в России на основании данных по 33-м domesticiрованным видам животных

- Кавказский (Дагестан, кавказские республики РФ)
- Западно-Сибирский (Алтай и Тыва).

Уникальность российского генофонда местных пород обусловлена еще и тем, что среди 33-х видов одомашненных животных 198 пород представлено породами российской селекции (около 2,5% мирового породного разнообразия).

Выявленные условные центры пороодообразования являются исторически сложившимися «точками роста и сохранения» как породного разнообразия, так и скрытой генетической изменчивости. Для сохранения их генофондов необходимы новые организационные принципы их контроля и управления.

3.2. Новая организационная система и принципы сохранения генетических ресурсов животноводства России.

Современное животноводство России делится на два основных направления: «племенное» и «генофондное». Это два по своей сути взаимодополняющих направления животноводческой отрасли, без которых невозможно достичь устойчивого развития животноводства. На данном этапе племенное направление в животноводстве доминирует и поддерживается государством, научным сообществом (РАСХН), как на законодательном, так и финансовом, интеллектуальном уровнях. На 1.12.2008 г. в МСХ РФ было зарегистрировано 2335 племенных заводов и репродукторов. Генофондное направление представлено 79 хозяйствами по 10 одомашненным видам, что составляет 3% от всех животноводческих организаций, включая племенной завод, племенной репродуктор и генофондное хозяйство (данные 2009 года).

Способ государственной поддержки генофондов domesticированных видов на данный момент в России один — это дотация на содержание условной головы. Мировой и российских опыт показывают, что для сохранения и управления генофондами локальных пород государственных дотаций явно недостаточно, если нет системы сохранения.

С учетом полученных данных по пороодообразовательным центрам России необходимо формирование генофондных центров, которые должны стать основой федеральной системы сохранения и управления генофондными хозяйствами в регионах РФ. Для сохранения генофондов в сфере животноводства РФ необходимо, помимо оптимизации законодательно-правовой базы и финансирования, создать соответствующие организационные структуры как инструмент для выполнения главной цели — устойчивого развития «генофондного» направления животноводства.

Главной опорой в этом должна стать межведомственная структура, с условным названием «Российская Генофондная Корпорация» («РГК») — федеральная структура, созданная при участии четырех ведомств РФ — Министерства сельского хозяйства РФ, Министерства природных ресурсов РФ, Российской Академии сельскохозяйственных наук (РАСХН) и Российской Академии наук (РАН) (см. схему. рис. 3).

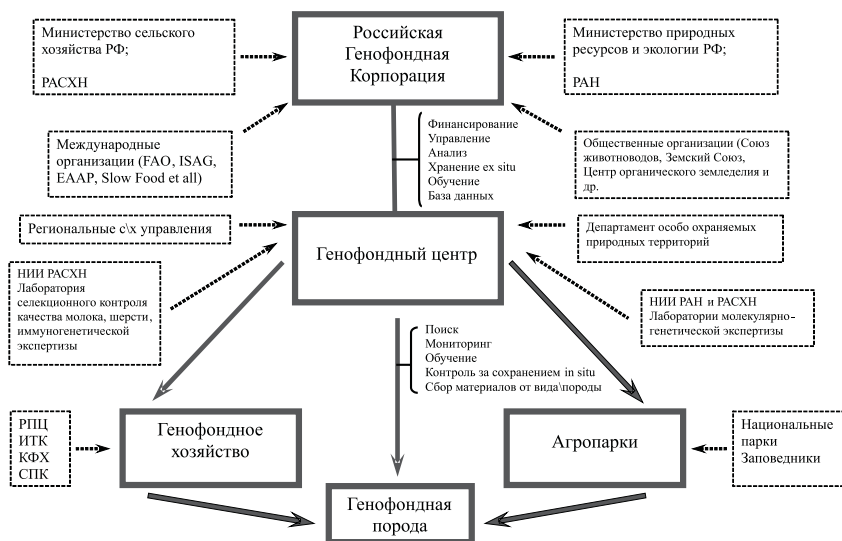


Рис. 3. Организационная схема сохранения domesticiрованных видов животных

Предлагаемая организационная схема сохранения генофонда пород основана на современных принципах сохранения пород *ex* и *in situ*, где основными единицами сохранения должны стать породы, разводимые в генофондных хозяйствах или агропарках под эгидой «Генофондных центров», образующих «Российскую генофондную корпорацию» (РГК). Ее основная задача — объединить все оставшиеся на сегодняшний день генофондные хозяйства, группы животных, незарегистрированные породы в единую государственную систему управления и консервации породного разнообразия, создание информационного банка. Под управляемой консервацией подразумевается комплекс действий, направленных на управление генетическими ресурсами сельскохозяйственных животных, по их учету, наилучшему использованию и развитию этих ресурсов в целях удовлетворения текущих и краткосрочных потребностей в продовольствии и сельскохозяйственной продукции, а также по обеспечению сохранности имеющегося разнообразия в целях удовлетворения возможных долгосрочных потребностей. В состав «Российской генофондной корпорации» должны входить или под ее управлением формироваться структуры, выполняющие следующие задачи.

1. Сертификационный центр (СЦ) с международной сертификацией по выявлению генов, связанных с заболеваниями, продуктивностью, жизнеспособностью, чистопородностью, консолидацией пород и качеством продуктов питания. СЦ должен тестировать и курировать работу лицензированных государством межведомственных лабораторий.
2. Информационный банк данных (зоотехническая, ветеринарная и генетическая информация)

3. Единая государственная система контроля за происхождением, основанная на инвентаризации каждого генофондного животного (макробиоципирование).
4. Федеральный банк спермы и эмбрионов.
5. Пять региональных генофондных центров, обслуживающих сохранение и управление породами, разводимыми в генофондных хозяйствах.

С помощью предлагаемых нами новой организационной системы и принципов сохранения генофондов сельскохозяйственных видов можно превратить невостребованный сегодня потенциал отечественных малочисленных пород в единую сеть генофондных хозяйств по производству животноводческой продукции, ориентированную не только на внутренний, но и на внешний рынок. Это может способствовать совершенствованию экономических основ сохранения местных пород и увеличению их прибыльности.

3.3. Сравнительный анализ методов генетического мониторинга породного генофонда

Сохранение генофондов пород и оптимизация их использования непосредственно зависят от степени разработанности методов контроля их популяционно-генетического своеобразия. Несмотря на наличие большого разнообразия подходов к генотипированию животных по разным маркерам полиморфизма, до настоящего времени отсутствуют методы, позволяющие надежно выявлять генофондные изменения и контролировать генофондный «стандарт» породы. В целях сравнительной оценки разных методов генетического мониторинга для описания специфических особенностей породных генофондов и их пространственной и временной динамики, в качестве модельного объекта в наших исследованиях изучалась одна из древнейших пород крупного рогатого скота в мире — серая степная (украинская) (*Bos taurus primigenius*). В период с 1986 года по 2009 года нами были исследованы как качественные, так и количественные признаки этих животных, а именно: признаки продуктивности, экстерьера, формирования масти, особенности поведения, показатели естественной резистентности, морфологические фены, эритроцитарные антигены, белки и изоферменты крови, рестрикционный полиморфизм митохондриальной ДНК, ISSR-маркеры (Столповский, 1990–2010). В наших исследованиях с помощью зоотехнических и генетических методов выявлены уникальные признаки и аллельное разнообразие серой степной породы. В результате выполненных исследований предложена система генетического мониторинга для пород основных domesticiрованных видов, элементы которой рассматриваются ниже.

3.3.1. Популяционно-фенетический анализ генофондного разнообразия серой степной (украинской) породы.

Фенетический подход обоснован и разработан Н.В. Тимофеевым-Ресовским и А.В. Яблоковым (1973, 1988). Контроль фенов может способствовать поддержанию уникальности генофонда породы на основании анализа распределения генетически детерминированных дискретных (альтернативных) признаков фенотипа (фенов). Нами выявлены и оценены различия в составе и структуре фенофонда трех популяций серого степного скота, разводимых на Украине — в хозяйствах «Аскания-Нова» и «Поливановке», в России — в алтайском экспериментальном хозяйстве «Черга». Выделено 13 феногрупп или 66 дискретных признаков. Наибольшие различия обнаружены по масти, окраске головы, наличию «очков» вокруг глаз, масти челки, распределению светлых и темных участков в окраске туловища. Половой диморфизм и распределения частот встречаемости 12 фенов среди трех генофондных стад представлены на векторных диаграммах (рис. 4).

Для породы в целом характерно 8 типов масти, основными из которых являются серая — 69% и светло-серая — 13%. В алтайском стаде отсутствуют животные типа красно-серые, мышастые, белые, в Асканийском помимо этих есть особи с черной мастью. Окраска головы представлена 10 типами. Наибольшую группу составляют животные, имеющие полностью серую окраску головы (33%) (рис.5).

Наибольшее количество животных, имеющих фен — черные «очки» вокруг глаз (см. рис. 5) встречается в поливановском стаде — 13,1% (в целом по породе 10,7%). По феногруппе «распределение светлых и темных участков окраски» (покровов) в маточном поголовье явное преобладание животных с признака равномерным окрашиванием — 71,1%. Более темную переднюю треть туловища имеют 23,8% животных, максимальная концентрация данного фена отмечена в алтайском стаде — 32,6%.

Сравнение фенофондов трех стад серой степной (украинской) породы по двум показателям внутрипопуляционного разнообразия (табл.1) показало, что, как по среднему, так и по доле редких фенов представленные группы животных различаются незначительно. Несколько выше доля редких фенов в алтайской группе, а средняя степень разнообразия — в поливановском стаде.

Таблица 1. Коэффициент фенетического разнообразия (μ) и доля редких фенов (h) трех популяций серой степной породы

Популяция	n	μ	h
"Поливановка"	320	2,41±0,035	0,17±0,028
"Аскания-Нова"	117	1,95±0,033	0,15±0,015
"Черга"	95	2,03±0,047	0,20±0,014

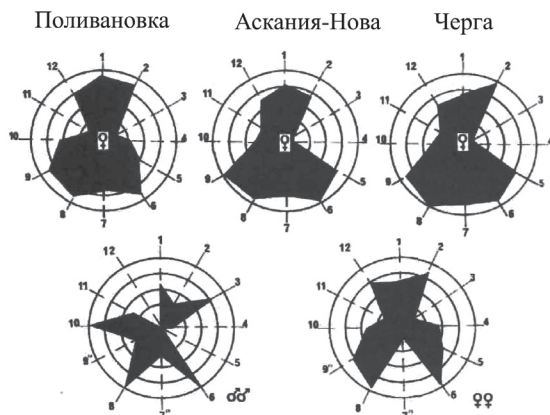


Рис. 4. Распределение частот встречаемости 12 фенотипов у быков и коров (внизу) и в 3-х популяциях (маточное поголовье) (вверху) серой степной породы. 1 — серая масть 2 — наличие светлых «очков» вокруг глаз; 3 — наличие черных «очков» вокруг глаз; 4 — черные «очки» над глазом; 5 — отсутствие черных «очков»; 6 — черная кайма на ушах; 7 — горбоносости нет; 7' — серая масть челки между рогами; 8 — светлоокрашенное кольцо вокруг носогубного зеркала; 9 — вульва пигментирована; 9' — горбоносости нет; 10 — подпалины есть; 11 — «барсучий» тип окраски; 12 — передняя треть туловища темная.

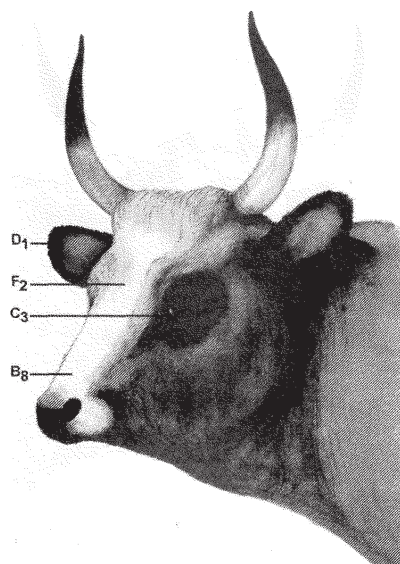


Рис.5. Окраска головы — светло-серый волос по фронтальной части, темно-серый низ (B_8); маска вокруг глаз — наличие черных «очков» (C_3); черная кайма на ушах есть (D_1); завитка шерсти на лбу нет (F_2)

Наблюдая внутри породы достаточную гетерогенность по морфологическим признакам, мы пришли к выводу, что современная популяция серого степного скота представляет собой смешанные остатки нескольких древних отродий степного скота. Наличие в генотипе серой степной породы генов исходной формы дикого тура (*B. primigenius*) проявляется в таких фенотипических особенностях, как светлый ремень по хребту, кольцо вокруг носогубного зеркала, темные подпалины по туловищу. В то же время ряд морфологических признаков (затрагивающих окраску всего животного) в комплексе могут считаться породоспецифичными для серого степного скота (не исключено, что и для всех пород серого корня). Этим животным свойственно проявление основных черт окраски, называемой акромеланизмом: при общей светлой окраске все выступающие части конечностей, хвоста, ушей, носа — темные. Для исследуемой породы — это черная окраска каймы на ушах, кисточки хвоста, верхней трети рогов, полосы на семенниках, копыт и носогубного зеркала. Перечисленные особенности характерны для большинства современных представителей серой степной породы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованный серый степной скот обладает уникальным набором дискретных морфологических признаков, по которым можно осуществлять контроль за генетической структурой популяции при ее сохранении. Исследованные стада различаются как по представленности, так и по частотам встречаемости разных фенотипов. Таким образом, фенотипы могут служить объектом отбора и подбора в генетико-селекционных программах и использоваться при генетическом мониторинге локальных пород. Фенотипический метод может стать весьма перспективным при решении задач сохранения и поддержания генетического разнообразия, а также при создании новых форм домашних животных.

3.3.2. Популяционно-генетический анализ внутрипородного разнообразия серого степного скота с использованием оценок полиморфизма электрофоретических вариантов белков плазмы крови

Выполнен анализ продуктов 29 локусов, полиморфизм выявлен по 12 генетико-биохимическим системам, кодирующим белки и ферменты: TF, PTF1, PTF2, PTF3, ALB, AMI, PA, CP, PGM I, CAR, GC, NP.

Исследования электрофоретических вариантов белков подтверждают уникальность животных серой степной породы. Так, нами выявлено 5 аллелей и 15 фенотипов трансферрина, что является нетипичным для других пород крупного рогатого скота. Нехарактерный для европейских пород аллель TF F является обычным для серой породы, обнаружен он также и у серого венгерского скота. Аллель TF F, вероятно, можно считать специфичным маркером всей группы серого степного скота.

Мы проанализировали отклонения наблюдаемых гетеро- и гомозигот от теоретически ожидаемых по наиболее многоаллельному локусу TF. Если в Асканийском стаде серого скота достоверно сохраняется равновесие, то в «Черге»

и «Поливановке» имело место преобладание наиболее распространенных и редких гетерозигот и недостаток гомозигот, причем в Чергинской группе такое отклонение от теоретически ожидаемого достоверно. Полученные данные свидетельствуют о том, что локус TF в Чергинской группе животных находится под давлением отбора, направленного в сторону гетерозигот. Вероятно, в данном случае мы наблюдаем картину сбалансированного полиморфизма, поддерживаемого за счет адаптивного преимущества гетерозигот.

По частотам встречаемости аллелей PTF1 и PTF2 выявлены достоверно значимые ($P < 0,005$ и $P < 0,001$) различия между стадами серой степной (украинской) породы в «Аскании-Нова», «Поливановке» и «Черге».

Кроме пяти известных полиморфных систем плазмы крови крупного рогатого скота (ALB, PA, TF, PTF1 и PTF2), нами у серой степной породы был обнаружен новый полиморфный белок, ранее в литературе не описанный. С помощью семейного анализа установлено, что все три фенотипа посттрансферрина 3 контролируются двумя кодоминантными аллелями PTF3 F и PTF3 S. Фенотипическое проявление гетерозиготы FS в виде пяти полос, две из которых совпадают по подвижности с основными аллелями F и S, а три имеют промежуточную активность, указывает на вероятную тетрамерную четвертичную структуру белка.

Фермент фосфофруктомутаза представлен двумя кодоминантными аллелями с разной электрофоретической подвижностью: PGM I A и PGM I B. Помимо двух описанных в литературе вариантов PGM I у крупного рогатого скота, нами у серого скота обнаружен новый аллель, условно обозначенный как «X». Из шести возможных фенотипов выявлено пять: AA, AB, BB, AX, BX (рис.6.).

При сопоставлении генетических структур исследуемых групп скота наибольшее значение генетического расстояния (рассчитанного по биохимическим маркерам по методу М. Нея, 1972) обнаружено между животными из «Аскании-Новой» и «Поливановки» ($DN = 0,030$), тогда как между последними и животными из «Черги» расстояние оказалось существенно ниже ($D = 0,003$). Эти данные представляют интерес, поскольку в создании Чергинской группы на Алтае участвовали животные именно из «Поливановки» (Украина). Наблюдаемые значения генетических расстояний можно объяснить более высокой степенью родства у вывезенных животных, чем у суммарно исходного асканийского генофонда.

Генетическая структура по 12 генетико-биохимическим системам исследуемых групп серого степного скота отображена на рис. 7.

При изучении генетической структуры серой степной породы было отмечено как сходство ее различных отродий, так и ряд специфических особенностей по полиморфным системам. Установлено, что на структуру породы существенно влияет временной фактор, наблюдается пространственная подразделенность генетической и фенетической структур. Полученные данные позволяют предполагать наличие механизмов, поддерживающих

внутрипородное разнообразие серого степного скота. Их исследования могут способствовать разработке и оптимизации методов сохранения генетического разнообразия в генофондах исчезающих видов и пород.

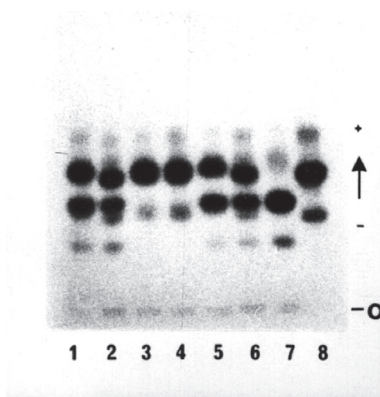


Рис. 6. Фосфоглюкомутаза I (PGM-I). Фенотипы: 1 – BX; 2 – AB; 3 – AA; 4 – AA; 6 – AB; 7 – BB; 8 – AA.

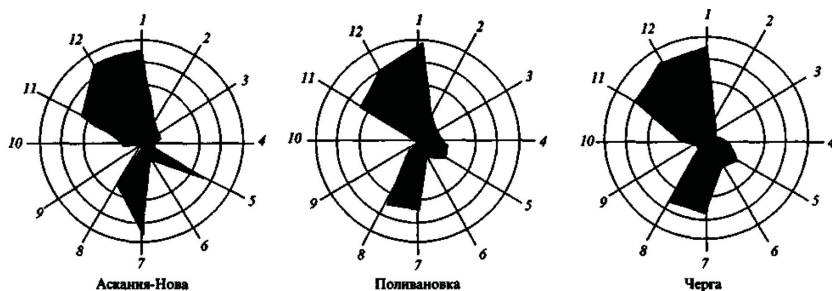


Рис. 7. Генетическая структура серого степного скота, разводимого в Аскании-Новой, Поливановке, Черге: 1 — ALB A; 2 — GC A; 3 — TF A; 4 — TF D1; 5 — TF D2; 6 — TF F; 7 — PTF-1 F; 8 — PTF-2 F; 9 — PTF-3 F; 10 — NP H; 11 — CP A; 12 — AM B

3.3.3. Распределение фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами ди- и тринуклеотидных микросателлитов, в геномах серого степного скота

В последние годы в популяционной генетике широкое использование получили новые методы прямого исследования полиморфизма различных участков ДНК, такие, как оценки полиморфизма фрагментов рестрикции (RFLP), микросателлитных локусов (SSR), фрагментов ДНК, фланкированных

инвертированными повторами случайных декануклеотидов (RAPD), или последовательностей микросателлитов (ISSR). Преимущества последних двух методов обусловлены тем, что они позволяют получать многолокусные и высокополиморфные спектры фрагментов генома, однако к их недостаткам следует отнести доминантный характер наследования регистрируемых фрагментов.

Для того, чтобы оценить внутривидовой размах изменчивости по полиморфизму участков ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов у серого степного скота, нами выполнены исследования полилокусных спектров, полученных с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) с использованием в качестве праймеров фрагментов ди- и тринуклеотидных микросателлитных последовательностей, отличающихся коровыми мотивами (ISSR-PCR маркеры).

При использовании четырех тринуклеотидных праймеров в ISSR-PCR спектрах наблюдали от 8-ми до 32-ти ПЦР-продуктов (ампликонов). Наибольшее количество ампликонов (фрагментов ДНК) располагалось в пределах длин 2600 – 520 п.н. Отмечается неодинаковая представленность ПЦР-продуктов этих групп у исследованных животных, в зависимости от нуклеотидной последовательности участка микросателлитного локуса, взятого в качестве праймера в ISSR-PCR. Так, при использовании в качестве праймера последовательностей $(ACC)_6G$ и $(AGC)_6G$ отмечается тенденция к относительно повышенной встречаемости ампликонов малой длины, последовательности $(GAG)_6C$ — наблюдается отчетливое преобладание в спектрах легких по массе ампликонов, а при использовании в качестве праймера фрагмента микросателлитного локуса $(CTC)_6C$ обнаруживается относительно увеличенное количество ампликонов из области длин в 3250–1550 п.н. (**табл. 2.**).

Использование в качестве праймера последовательности $(ACC)_6G$ позволило суммарно получить наибольшее количество ПЦР-продуктов и наибольшую долю полиморфных локусов среди них (**таб.3**). Праймер $(GAG)_6C$ суммарно у животных позволил выявить 17 локусов в спектрах продуктов амплификации, среди которых полиморфными оказалось только 47%. При использовании праймера $(AGC)_6G$ получен спектр ампликонов, среди которых оказалось наименьшее количество полиморфных локусов (25%). При использовании в качестве праймера последовательности $(CTC)_6C$ суммарно обнаружено 16 фрагментов ДНК, однако по большинству из них (94%) наблюдался выраженный полиморфизм среди исследованной группы животных.

Таблица 2. Вклад (в %) ампликонов разной длины в спектры ISSR-PCR у серой степной породы крупного рогатого скота при использовании в качестве праймеров фрагментов тринуклеотидных микросателлитных локусов.

Длины ампликонов	Частота ампликонов, %
Праймер (ACC) ₆ G	
3250–1550	25
1550–1000	31
1000–320	44
Праймер (GAG) ₆ C	
3250–1550	24
1550–1000	35
1000–320	41
Праймер (AGC) ₆ G	
3250–1550	38
1550–1000	19
1000–320	44
Праймер (CTC) ₆ C	
3250–1550	50
1550–1000	19
1000–320	31

Таблица 3. Наличие полиморфных локусов в спектре ампликонов (ISSR-PCR метод), полученных при использовании тринуклеотидных праймеров у серой степной породы крупного рогатого скота

Праймер	Число исследованных голов	Количество ампликонов в спектре	Доля (в %) полиморфных ампликонов в спектре	РІС
(ACC) ₆ G	28	32	97 (31 ампликон)	0,280
(GAG) ₆ C	16	17	47 (8 ампликонов)	0,233
(AGC) ₆ G	6	16	25 (4 ампликона)	0,162
(CTC) ₆ C	21	16	94 (15 ампликонов)	0,300

Примечание: РІС – полиморфное информационное содержание локуса

Полученные данные свидетельствуют о том, что каждый используемый праймер в ISSR-PCR методе приводил к формированию высоко специфичных спектров продуктов амплификации именно для данного праймера, как по количеству ампликонов, так и по доле полиморфных локусов. Их полиморфизм не был прямо связан с количеством выявляемых локусов и был наибольшим в спектрах ампликонов, выявленных с помощью праймеров (ACC)₆G и (CTC)₆C, по сравнению со спектрами, полученными при использовании праймеров (GAG)₆C и (AGC)₆G.

Обращает на себя внимание выраженные отличия спектров, полученных при использовании в качестве праймеров последовательностей $(GAG)_6C$ и $(CTC)_6C$, принадлежащих к так называемым пурин/пиримидиновым трактам, способным формировать триплексные структуры, предположительно, принимающие участие в регуляции генной экспрессии (Kalish et al., 2005). При примерно одинаковом количестве ампликонов в спектрах (17 для $(GAG)_6C$ и 16 для $(CTC)_6C$), они существенно отличались по доле полиморфных локусов, а также по представленности в спектрах ампликонов разной длины (табл. 2.). По-видимому, это может свидетельствовать об относительно повышенной консервативности у исследованных животных коротких фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором $(GAG)_6C$, по сравнению с фрагментами, фланкированными повтором $(CTC)_6C$. Во всяком случае, полученные данные свидетельствуют о существенных отличиях в распределении этих повторов по геномам исследованных животных серой степной породы.

Следует отметить, что анализ полилокусных спектров ампликонов ISSR-PCR, позволяет наблюдать в ряде случаев их выраженные отличия у разных полов. Так, в исследованной группе животных серой степной породы присутствовали четыре быка. Полученные у этих животных спектры ПЦР-продуктов с праймером $(ACC)_6G$ существенно отличались от выявленных у коров по присутствию шести локусов, по которым наблюдались отличия и между быками – фрагменты длиной 2950, 1500, 1050, 690 п.н. выявлены только у одного из них.

Использование в качестве праймеров в PCR фрагментов четырех тринуклеотидных и двух динуклеотидных микросателлитных локусов позволил получить воспроизводимые и надежно выявляемые спектры продуктов амплификации. Среди выявленных 102 локусов в геномах животных серой степной породы 58 (57%) оказались полиморфными. Усредненные по спектру каждого праймера значения полиморфного информационного содержания (PIC) по локусам спектра варьировали в пределах от 0 до 0,300. Полностью консервативными оказались спектры ампликонов праймера $(GA)_6C$, наиболее изменчивыми – праймера $(ACC)_6G$. Более того, именно в спектре праймера $(ACC)_6G$ обнаруживаются отличия между коровами и быками серой степной породы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие или отсутствие полиморфизма участков генома, фланкированных инвертированными повторами, определяется нуклеотидным мотивом фланга. Выраженные отличия между спектрами по количеству ампликонов, предпочтительностью их длины, а также в их полиморфизме у исследованных животных, свидетельствуют об их принадлежности к структурно-функциональным участкам генома, отличающимся по своей консервативности. Это требует предварительной оценки эффективности использования в качестве праймера разных микросателлитов, что может позволить отобрать те из них, которые

позволяют получать наиболее информативные полилокусные спектры для суммарной характеристики генофонда породы. По-видимому, разработка такой характеристики, позволяющей судить о наличии «оптимума» (Livshits et al., 1985; Leary, 1989 et al., 1987) гетерозиготности в генофонде вида, породы, популяции требует для каждого конкретного случая поиска геномных участков, полиморфизм которых наиболее объективно будет отражать динамические генофондные процессы.

Следует подчеркнуть, что сравнительный анализ маркирования внутривидового разнообразия свидетельствует о том, что все типы такого маркирования дают сходные оценки внутривидового разнообразия, однако маркеры полиморфизма ДНК имеют очевидное преимущество, поскольку позволяют в одной ПЦР одновременно оценивать полиморфизм нескольких локусов, то есть, осуществлять полилокусное генотипирование животных.

3.4. Эффективность использования для оценок внутривидового полиморфизма электрофоретических вариантов белков и ДНК маркеров (ISSR-PCR маркеров) у овец романовской породы.

Помимо серого степного скота еще на одной породе было выполнено сравнение методов выявления внутривидового полиморфизма. В целях исследования эффективности использования для генофондного анализа различных типов молекулярно-генетических маркеров в настоящем разделе выполнена оценка генофондов разных групп животных романовской породы с применением различных молекулярно-генетических маркеров (электрофоретические варианты белков, фрагменты ДНК, фланкированные инвертированными повторами динуклеотидных микросателлитных локусов).

Полиморфизм электрофоретических вариантов белков регистрировался по таким транспортным белкам как трансферрин (TF), гемоглобин (HB); ферментам метаболизма экзогенных субстратов лейцинаминопептидазе (LAP), эстеразе (EST), регуляторному локусу лактатдегидрогеназы (LDR) и ферменту, участвующему в антиоксидантной системе, диафорозе (DP).

В результате выполненных исследований у романовской породы овец выявлено 5 аллельных вариантов по локусу трансферрина, среди которых преобладали аллельные варианты TF C и TF D (TF A — 0.038; TF B — 0.077; TF C — 0.593; TF D — 0.287; TF E — 0.005). По локусу гемоглобина с преобладающей частотой встречался аллельный вариант HBA (HBA — 0.703, HBB — 0.297). У исследованной группы овец примерно с равной частотой встречались аллельные варианты H и L по регуляторному локусу лактатдегидрогеназы, детерминирующие высокую и низкую активность субъединицы A данного фермента (LDR H — 0.467; LDR L — 0.533). По локусу лейцинаминопептидазы с более высокой частотой встречался медленно мигрирующий аллельный вариант (LAP A — 0.298; LAP B — 0.702); по локусу диафорозы – наоборот, быстрый аллельный вариант (DP F — 0.800; DP S — 0.200). По локусу эстеразы обнаруживалась более высокая частота

встречаемости аллельного варианта А (EST А — 0.670; EST В — 0.330), и это был единственный локус из 6-ти рассмотренных, по которому обнаруживалось статистически достоверное ($P < 0.05$) отклонение от равновесного состояния в сторону дефицита гетерозигот. По вышеуказанным полиморфным локусам средний уровень гетерозиготности у исследованных овец романовской породы был 0.439 (S.E. 0.025), что соответствует данным полученным по другим аутохтонным порода овец.

Генетическая структура популяции романовской овцы была исследована также с использованием оценок полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами фрагментов динуклеотидных микросателлитных локусов (TC)₉G и (CT)₉G.

Среди продуктов амплификации, полученных при использовании в ПЦР в качестве праймера последовательности (AG)₉C, наиболее надежно выявлялись 13 фрагментов ДНК, каждый из которых в дальнейшем рассматривался как отдельный локус. В спектре продуктов амплификации, полученных при использовании в качестве праймера последовательности (GA)₉C, выполнялось гентотипирование животных по 8 фрагментам ДНК (локусам), длина которых варьировала от 600 до 200 п.н.

Уровень средней гетерозиготности (PIC) по 8 ампликонам, полученным с помощью праймера (GA)₉C, практически не отличался у овец из разных хозяйств (0,355–0,359). В спектрах продуктов амплификации, полученных с последовательностью праймера (AG)₉C, с высокой частотой присутствовали фрагменты ДНК длиной около 1000 п.н. Расчет PIC по спектру продуктов амплификации, полученных с использованием в качестве праймера последовательности (AG)₉C, показал, что уровень ожидаемой средней гетерозиготности фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором данной последовательности, несколько ниже, чем при использовании в качестве праймера (GA)₉C. Так, расчетная гетерозиготность по спектрам, полученным с последовательностью (AG)₉C у романовских овец находилась в пределах от 0,264 до 0,3,74.

Полученные нами данные свидетельствует о том, что уровень внутри- и межгрупповой генетической гетерогенности у исследованных групп достаточно высока, как по доле полиморфных локусов, так и величинам средней гетерозиготности (наблюдаемой по электрофоретическим вариантам транспортных белков и ферментов; ожидаемой по полиморфизму фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов). Относительно высокий уровень генетической гетерогенности позволяет предполагать наличие возможностей для успешной селекции среди сохранившихся романовских овец. Можно ожидать, что генотипирование животных с использованием молекулярно-генетических маркеров будет способствовать контролю, коррекции и, таким образом, ускорению селекционной работы в целом.

Таким образом, выполненные нами исследования позволяют прийти к заключению о том, что по таким популяционно-генетическим параметрам, как оценки уровня генетической гетерогенности, генетические взаимоотношения между различными внутривидовыми группами животных и разными породами эффективность использования разных типов молекулярно-генетических маркеров качественно не отличается друг от друга. В то же время, применение ISSR-PCR маркеров расширяет количество одновременно генотипируемых локусов в одном геноме, что способствует увеличению точности генофондных исследований.

3.5. Генетический мониторинг внутривидовой и межвидовой изменчивости по ISSR-PCR маркерам

На сером степном скоте и романовской породе овец показана возможность применения ISSR-PCR маркеров для анализа их генофондов. В целях изучения возможностей применения ISSR-фингерпринтинга для внутри- и межвидовых исследований генофондов, рассмотрены результаты оценок с использованием внутривидовой генетической дифференциации между 18-тью группами тувинской короткожирнохвостой овцы, а также 19-тью породами крупного рогатого скота.

3.5.1. Разработка универсальной шкалы для мониторинга генофондов и видов сельскохозяйственных животных с использованием ISSR-PCR маркеров и ее применение для характеристики генофонда тувинской короткожирнохвостой овцы

Для более точной оценки длин выявленных фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами (AG)_nC и (GA)_nC, на основании сравнительного анализа спектров продуктов амплификации у крупного рогатого скота и овец, разработана универсальная шкала, где применена градация фрагментов ДНК по молекулярным массам. В зависимости от зоны («тяжелые», «средние», «легкие» фрагменты) использовался определенный шаг от 10 до 100 пар нуклеотидов (пн). В результате выделено 38 зон с фиксированным интервалом, которые позволяют достаточно точно определять молекулярную массу для 38 ПЦР-продуктов разной длины (Табл.4).

Разработка такой единой универсальной шкалы для оценки длин продуктов амплификации ДНК позволила выявить закономерности в распределении фрагментов и в дальнейшем выполнять сравнительные исследования внутри- и межвидовых отличий, а также видовых генофондных особенностей.

**Таблица 4. Универсальная шкала для мониторинга генофондов пород и видов
доместичированных животных с использованием ISSR-PCR маркеров**

2500–2300	990–940	430–410
2100–2000	930–880	400–380
1900–1800	870–820	370–360
1750–1700	810–760	350–340
1650–1600	750–720	330–320
1550–1500	710–680	310–300
1450–1400	670–640	290–280
1350–1300	630–600	270–260
1290–1240	590–560	250–240
1230–1180	550–530	230–220
1170–1120	520–500	210–200
1110–1060	490–470	180–160
1050–1000	460–440	

3.5.2. Анализ генетической структуры популяций тувинской короткожирнохвостой овцы с использованием метода ISSR-PCR

Создание универсальной шкалы распределения длин продуктов амплификации позволило оценить возможности использования ISSR-маркеров для контроля и мониторинга дифференциации генетической структуры породы по отдельным хозяйствам на примере тувинской жирнохвостой овцы, выявления породоспецифичных сочетаний генотипов по разным локусам, для оценок генеалогических связей между отдельными популяциями.

С помощью праймера (AG)₆C у тувинских овец выявлен 21 фрагмент, из них 67,7% оказались полиморфными. Обнаружено шесть наиболее типичных ампликонов ДНК, которые, как правило, встречаются в геноме внутривидовых групп тувинских овец единым блоком, их частота встречаемости варьировала от 0,658 до 1,000. К ним относятся фрагменты с молекулярной массой 750–720 п.н. (частота встречаемости – 0,932), двойной фрагмент: 630–600 п.н. (0,993) и 590–560 п.н. (0,956), фрагменты 490–470 п.н. (0,976) и 430–410 п.н. (0,933) можно отнести к категории «породоспецифичных» (рис. 8). С большой частотой практически во всех популяциях встречается ампликон с молекулярной массой от 1180 до 1230 п.н. (от 0,574 до 1,000). Сравнительный анализ ISSR-PCR спектров амплификации показал значительные внутривидовые различия у изучаемых групп тувинской овцы. Частоты встречаемости «средних» по длинам фрагментов от 300 до 1200 п.н. ампликонов маркируют генетические структуры конкретных популяций и вносят наибольший вклад в генетическое внутривидовое разнообразие исследованных животных.

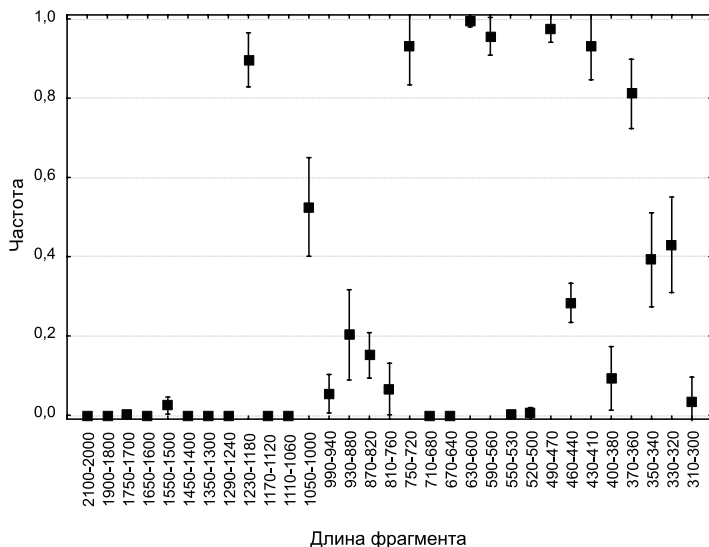


Рис. 8. Частота встречаемости фрагментов различной длины межмикросателлитной ДНК праймера (AG)₅C у тувинских овец, рассчитанная как средняя частота по всем внутрипородным группам. Вертикальными линиями отмечены доверительные интервалы (P=95%).

Для упрощения анализа разнообразия генотипов по ISSR-PCR маркерам, сложный характер которого выявлен на примере 18-ти популяций тувинской овцы, мы предлагаем ввести три понятия: «генофондный профиль», «породоспецифический паттерн» и «генофондный стандарт».

Под генофондным профилем подразумевается совокупность всех выявленных фрагментов и частот их встречаемости у породы. На рисунке 8 показан генофондный профиль тувинских овец, который можно условно разделить на две части: часто встречающиеся фрагменты (частота более 0,4) и редко встречающиеся (частота менее 0,4). Для определения породоспецифического паттерна породы нами предлагается использовать только наиболее часто встречающиеся фрагменты (частота более 0,4).

Генофондный стандарт породы включает в себя совокупность фрагментов ДНК, выявленных во внутрипородных группах, которые по данным кластерного анализа наиболее приближены либо к спектру продуктов амплификации наиболее древней группы (протогенофонду), или усредненному генофонду породы в целом.

Информация о популяционных частотах фрагментов амплификации тувинских овец была использована для анализа параметров генеалогических связей и расчета индекса сходства (генетических расстояний) между популяциями (Nei, 1972). По данным кластерного анализа в современной популяции тувинской короткожирнохвостой овцы наиболее типичные, то есть сходные с усредненным генофондом тувинской овцы, животные сосредоточены

в хозяйствах: ГУП «Бай-Тал» (индекс генетического сходства с тувинской овцой составил 0,997), ГУП «Моген-Бурен» (0,995), МУП «Чалааты» (0,993), ООО МТС «Кызыльская» (0,991), СПК «Биче-Тей» (0,990), ГУП «Малчын» (0,990), СПК «Бай-Хол» (0,989), ГУП «Чодураа» (0,989), ГУП «Торгалык» (0,989).

Таким образом, «генофондный стандарт» тувинской короткожирнохвостой овцы породы по праймеру (AG)₉С соответствует ампликонам, независимо от их частоты, в двух вышеуказанных хозяйствах (ГУП «Бай-Тал» и ГУП «Моген-Бурен»), где по данным кластерного анализа сосредоточены наиболее типичные тувинские овцы. «Генофондный стандарт» тувинской короткожирнохвостой породы овец состоит из 17 фрагментов ДНК.

При попарном сравнении наименьшее генетическое расстояние выявлено между популяциями ГУП «Торгалык» и МУП «Чалааты» ($DN = 0,003$), наибольшее отмечено между животными СПК «Дуза» и КФХ «Ондар» (0,130). Наименьшее генетическое расстояние с усредненным генофондом тувинской овцы имеют овцы «Бай-Тал» ($DN = 0,003$), «Моген-Бурен», ($DN = 0,005$), наибольшее расстояние «Деспен» ($DN = 0,035$), «Даг-Ужу» ($DN = 0,037$).

Полученные данные по индексам генетического сходства и генетическим расстояниям в популяциях овец представляют интерес не только для частной генетики вида (породы), но имеют важное селекционное значение, так как позволяют из всего массива, в рассматриваемом случае тувинских овец, выделить отары, где разводят типичных для породы животных, определить их родственные связи, выделить изолированные и синтетические группы животных, оценить генофондную ситуацию по породе в целом и предложить селекционную стратегию на будущее.

При более детальном рассмотрении генетических взаимоотношений выделяются генетически близкие друг к другу отары тувинской овца из хозяйств: СПК «Амырлан» и КФХ «Ондар»; СПК «Бай-Хол» и ООО МТС «Кызыльская»; ГУП «Малчын» и ГУП «Моген-Бурен»; МУП «Чалааты» и ГУП «Торгалык». Генетически обособленные группы создают несколько мини кластеров, что позволяет констатировать, что в популяциях овец республики Тыва сформировалось несколько генетически консолидированных групп, связанных между собой благодаря регулярному обмену овцематками и баранами-производителями, а также обособленные изолированные группы животных (рис. 9)

Важную оценку эффективности использования ISSR-PCR маркеров дает анализ их использования при изучении межпородной дифференциации внутри вида, поскольку именно породный уровень является наиболее оптимальной единицей при решении проблем сохранения внутривидового разнообразия генетических ресурсов сельскохозяйственных видов (FAO, 2007). В этой связи в следующем подразделе рассматривается результативность полилокусного генотипирования по ISSR-PCR маркерам разных пород крупного рогатого скота.

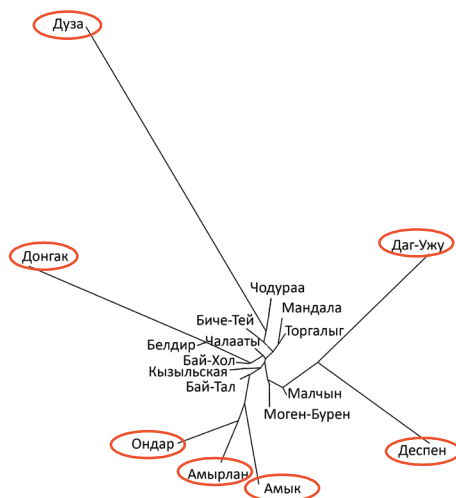


Рис.9. Генетические дистанции между 18 популяциями тувинской овцы, полученные с помощью программы Structure 2.3.3. на основании данных ISSR-PCR анализа.

3.5.3. Оценка генофондной дифференциации пород крупного рогатого скота с использованием ISSR-PCR маркеров.

Выполнен сравнительный анализ полилокусных спектров ISSR – PCR маркеров с использованием двух праймеров $(AG)_9C$ и $(GA)_9C$ у 19-ти пород и одного отечественного селекционного типа крупного рогатого скота. Суммарно по двум типам ISSR-маркеров выявлено 66 фрагментов ДНК разной длины. С помощью праймера $(AG)_9C$ обнаружено 37 ПЦР-продуктов, $(GA)_9C$ – 29 ампликонов в диапазоне длин от 2500 до 160 п.н. (**рис. 10**).

В основном породы отличались между собой по частоте встречаемости фрагментов ДНК разной длины или группировались по принципу: «есть фрагмент или его нет».

На рисунке 11 представлены генофондные профили (все выявленные ПЦР-продукты в породе – черный и серый цвета) и породоспецифические или типичные для породы паттерны (частота встречаемости фрагмента более 0,4 – черный цвет) для 19 пород КРС, полученные с помощью AG-ISSR маркеров. На основании этих данных можно выделить генофондные стандарты для каждой породы. Хорошо видно, что количество фрагментов, по которым одна порода отличается от другой не так велико. Для породоспецифического паттерна оно варьирует от 0 до 5 фрагментов. Например, соответственно: «монбельярдская и нормандская», «серая степная и скот Гоби» отличаются по фрагментам, обозначенным по универсальной шкале как A6; A9; A17; A27; A37. Отличия по генофондным профилям более выражены и находятся в пределах от 2 до

15 фрагментов. Такие различия обнаруживаются между «голштино-фризской и фризской» (A27 и A31); «н-дама и норвежская красная» (A2; A9–11; A14; A18–19; A21–23; A26–27; A30; A38.). При сопоставлении спектров генофондов исследованных пород выделяются породоспецифичные сочетания фрагментов ДНК, которые могут рассматриваться как породный ДНК «штрихкод».

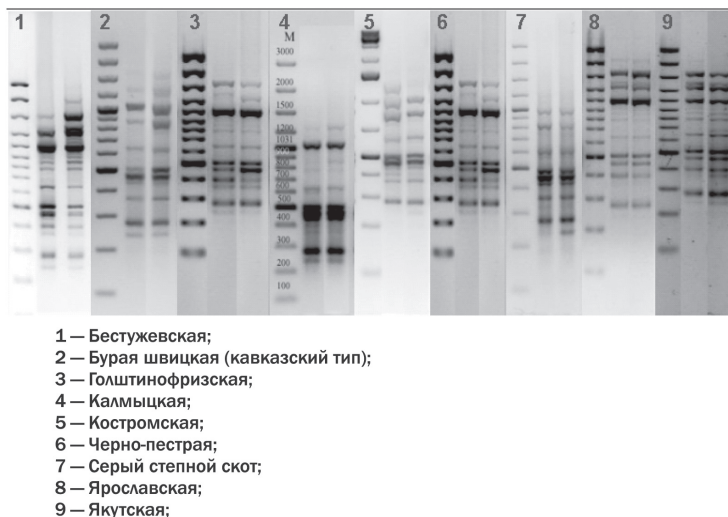


Рис. 10. ISSR-фингерпринт 9 пород КРС (праймер (AG)₅C).

Для более детального рассмотрения генетических взаимоотношений между породами мы применили методы многомерного шкалирования и главных компонент, которые позволяют с одной стороны определить генетические взаимоотношения между породами, с другой — наглядно увидеть расположение исследуемых групп животных в пространстве (**рис. 12.**).

Анализ полученных данных показал, что изменчивость по спектрам AG-ISSR-маркеров позволяет отличать популяции, принадлежащие к разным видам (*Bos taurus* и *Bos indicus*). На **рисунке 12** по этим спектрам породы формируют три группы (облака). Первая является основной, в ней сконцентрировалось большинство пород — по расположению на плоскости это «среднее облако». Вторая группа — «верхнее облако», куда вошли следующие породы: две популяции монгольского скота, серый степной, калмыцкий, красная эстонская, костромская порода и популяция кавказского типа бурой швицкой породы (СПК «Дружба»). И третья группа, или «нижнее облако», которое образовали четыре породы: сахивал, тапаркер, хариана и якутский скот. Месторасположение популяции кавказского типа бурого швицкого скота (ГУП «Дылымское») свидетельствует о том, что этот генофонд значительно отличается от всех исследованных в данной работе пород и, по всей видимости, в большей степени представлен уникальным генофондом местного скота Дагестана.



частота встречаемости равна или более 0,4
 частота встречаемости менее 0,4
 вместе: черные и серые банды формируют "генетический профиль" породы, черные – ее "породоспецифический паттерн"

Рис. 11. Генотипный профиль и породоспецифический паттерн, полученные с помощью праймера (AG)₃Cy 19 пород крупного рогатого скота

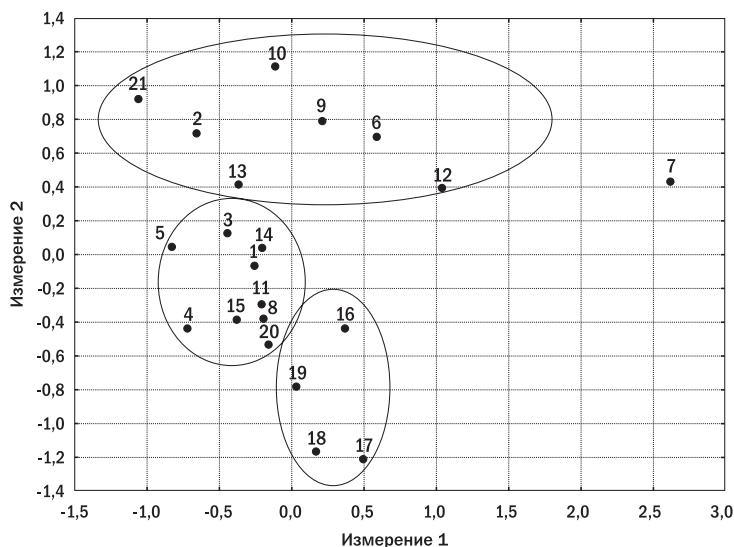


Рис. 12. Результаты многомерного шкалирования на плоскости, выполненные на основе данных, полученных с праймером (AG)₉C.
 Список популяций (пород): 1.Фризская; 2. Калмыцкая; 3. Черно-пестрая; 4. Ндама; 5. Бестужевская; 6. Бурая швицкая (Дружба); 7. Бурая швицкая (Дылымское); 8. Голштино-фризская; 9. Костромская; 10. Красная эстонская; 11. Монбелиард; 12. Монгольская Гоби; 13. Монгольская Хогорого; 14. Норвежская красная; 15. Нормандская; 16. Сахивал; 17. Тарпаркер; 18. Хариана; 19. Якутская; 20. Ярославская; 21. Серый степной скот

Для получения общей картины взаимоотношений между породами, был объединен весь набор ISSR-маркеров (AG и GA) и получена проекция на плоскости главных компонент (**рис. 13**).

Анализ расположения пород в большинстве случаев подтвердил результаты, полученные с помощью метода многомерного шкалирования. Три породы — тарпаркер, серый степной скот, калмыцкая и кавказский тип бурого швицкого скота занимают крайние положения на плоскости, тем самым их генофонды отличаются от генофондов большинства исследованных популяций КРС, представленных преимущественно европейскими породами. В связи с этим можно предположить: вышеуказанные популяции произошли не от европейского предка, а от азиатского прародителя или имеют полифилетическое происхождение.

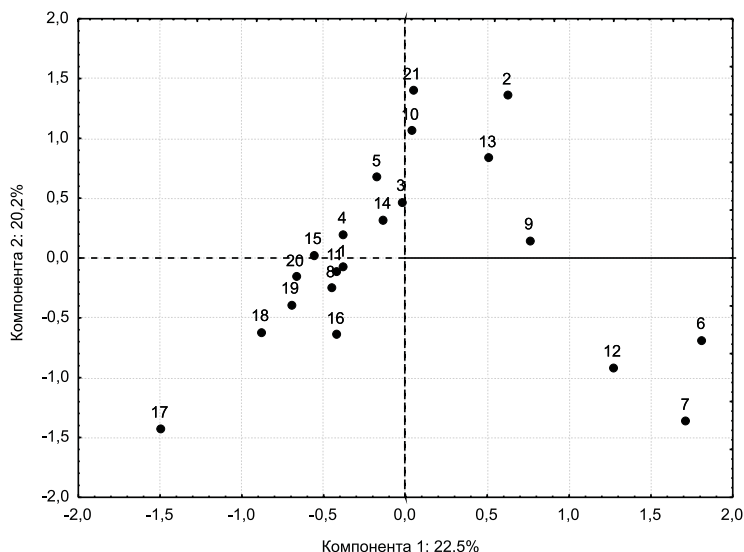


Рис. 13. Породы КРС в пространстве главных компонент по общему набору маркеров, полученных с помощью праймеров (AG)₉C и (GA)₉C. Список пород тот же (см. рис. 12).

Информацию о популяционных частотах фрагментов ДНК изученных пород мы использовали в целях выяснения возможностей этого метода для выяснения филогении пород. Согласно принципу популяционных систем, сформулированному в работах Ю.П. Алтухова и Ю.Г. Рычкова, генетическое разнообразие современных популяций соответствует некоторой предковой «прапопуляции», генофонд которой можно условно назвать «протогенофондом» и предложено для реконструкции «протогенофонда» использовать усреднение частот генов по всем изученным популяциям. В соответствие с этим принципом, нами был построен «протогенофонд» крупного рогатого скота, куда включены породы *Bos taurus* и *Bos indicus*.

На рисунке 14 показаны полигоны изученных пород крупного рогатого скота, полученные на основании полиморфизма, выявленного по AG-ISSR маркерам. Из всех исследуемых популяций наибольшее сходство с «протогенофондом» имеют породы: фризская (0,015), черно-пестрая (0,015) и монгольская порода хогорого (0,016). Полученный результат, по-видимому, закономерен, так как соответствует известным фактам по филогенезу пород.

Для оценки генетического разнообразия среди пород мы использовали традиционные показатели генетического разнообразия по Кимура (1964), Левонтину (1972), Нею (1973) (Yeh et al., 1999; Nei, 1973, 1987; 2000).

В целом по генетическому разнообразию у всех пород по спектрам ампликонов, полученных с (AG)₉C и (GA)₉C праймерами, обнаруживаются сходные результаты. По индексам Нея и Шеннона, для 66 ПЦР-продуктов КРС

по двум праймерам (AG)₉C (37 ПЦР-продуктов) и (GA)₉C (29 ПЦР-продуктов) получены следующие данные с учетом полиморфизма, соответственно, $h = 0,1698$ и $0,113$; $I = 0,2746$ и $0,1911$. Разнообразие по Нею для (AG)₉C праймера находится в пределах $(0,1642 - 0,039)$ и для (GA)₉C праймера – $(0,107 - 0,0036)$, по Шеннону соответственно $(0,2228 - 0,052)$ и $(0,161 - 0,007)$. Среди 19 пород низкими показателями разнообразия по спектрам (AG)₉C праймера выделяется серый степной скот. Известно, что серый степной (украинский) скот в России длительное время находится в изоляции и имеет по классификации ФАО по численности критический статус, иными словами находится на грани выживания. Полученные нами данные по ISSR-маркерам подтверждают данный факт.

Исходя из полученных нами данных, по-видимому, для пород крупного рогатого скота «оптимальными» показателями значения среднего на locus генного разнообразия следует считать: для AG-ISSR маркерам – $0,10-0,15$ (по Нею) и GA-ISSR маркерам $0,04-0,05$ (по Шеннону). Можно ожидать, что отклонения от указанного выше «оптимума» в меньшую сторону свидетельствуют о процессах, связанных с инбридингом или генофондной эрозией, отклонения в большую сторону, скорее всего, говорят о синтетическом происхождении популяции или направленном отборе в сторону сохранения генетического разнообразия в силу естественных или искусственных причин.

Полученные оценки полиморфизма полилокусных геномных участков могут служить объективными характеристиками изменчивости, консолидированности и уникальности генофондов домашних животных, в частности, пород крупного рогатого скота, стать основой для идентификации породы и определения ее «генофондного стандарта». Представленные молекулярно-генетические характеристики могут способствовать разработке критериев для определения следующих основополагающих селекционных параметров: породной принадлежности, отличимости, консолидированности и устойчивости породы, что крайне важно при регистрации новых пород, чистопородном разведении или сохранении породы как резерва определенных наследственных качеств.

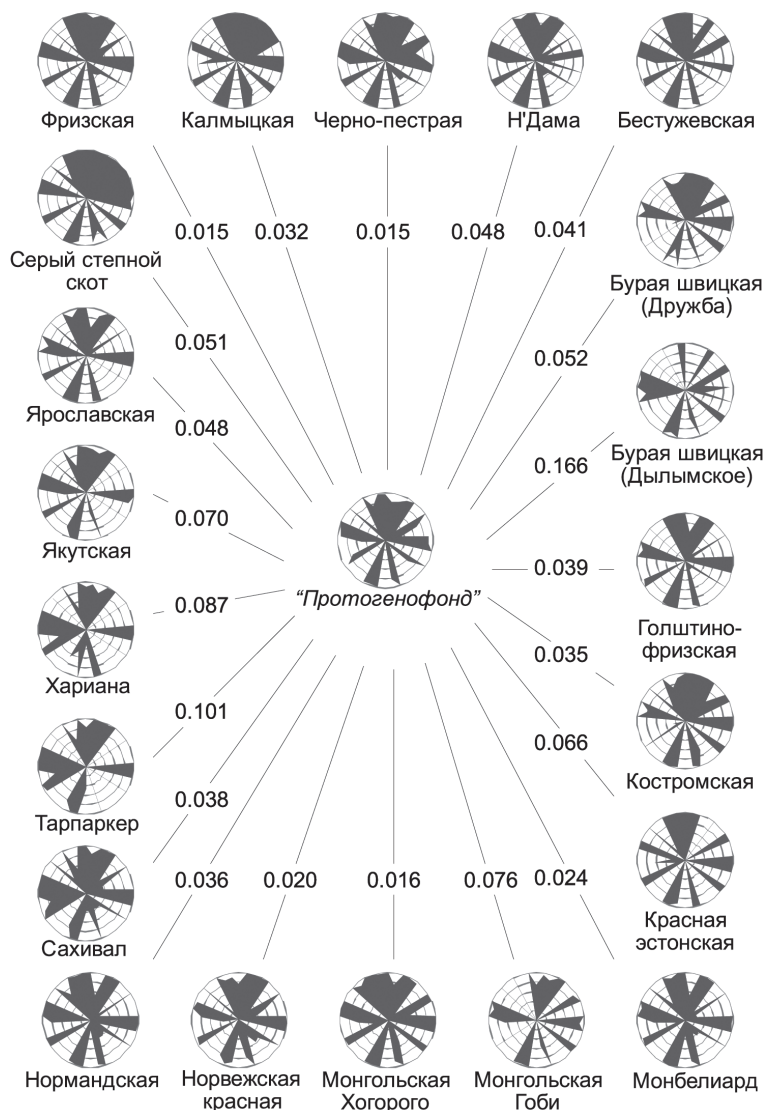


Рис. 14. Полигоны, построенные на основании полиморфизма, выявленного по праймеру (AG)_nC у 19 пород и одного селекционного типа КРС

3.5.3.1 Оценка ценности породы, ее вклада в общее генетическое разнообразие на примере данных ISSR-фингерпринтинга КРС

На основании анализа генофондных профилей, породных стандартов и породоспецифических паттернов, нами предложен способ оптимизации планирования программ сохранения конкретных пород. Если исходить из постулата,

что сохранение породы достигается путем сохранения как можно большего внутривидового разнообразия, то необходимо рассчитать общее разнообразие имеющегося набора пород, а также вклад каждой породы в это общее разнообразие. Полученные оценки могут стать критериями при выборе пород для программ сохранения.

Для того, чтобы оценить вклад каждой породы в общую изменчивость крупного рогатого скота, мы воспользовались правилом сложения дисперсий, согласно которому общая дисперсия признака σ_o^2 равна сумме межгрупповой дисперсии δ^2 и средней внутригрупповой дисперсии $\bar{\sigma}^2$, т.е. $\sigma_o^2 = \bar{\sigma}^2 + \delta^2$.

Величины дисперсий в этой формуле можно оценить по формулам

$$\sigma_o^2 = \frac{1}{N} \sum (x - \bar{x})^2, \quad \bar{\sigma}^2 = \frac{1}{n} \sum \sigma_i^2, \quad \sigma_i^2 = \frac{1}{N_i - 1} \sum (x - \bar{x}_i)^2, \\ \delta^2 = \frac{1}{n} \sum (\bar{x}_i - \bar{x})^2,$$

где $\bar{x}$ – среднее значение, N – общий объем выборки, n – количество групп, N_i – численности групп.

В нашем случае признак x – это диаллельный генетический локус, состояние которого обозначено нулем или единицей, частоты аллелей равны q и $1-q$, а общая дисперсия для двух аллелей равна ожидаемому уровню гетерозиготности признака $2q(1-q)$. Таким образом, формулы дисперсии как меры генетического разнообразия имеют следующий вид:

$$\sigma_o^2 = 2\bar{q}(1-\bar{q}) - \text{общее разнообразие} \\ \bar{\sigma}^2 = \frac{1}{n} \sum 2q_i(1-q_i) - \text{среднее внутригрупповое разнообразие} \\ \delta^2 = \frac{1}{n} \sum (q_i - \bar{q})^2 - \text{межгрупповое разнообразие.}$$

Та часть общего разнообразия σ_o^2 , которая приходится на какую-то конкретную породу или группу, составляет $\frac{1}{n} 2q_i(1-q_i) + \frac{1}{n} (q_i - \bar{q})^2$, причем первое слагаемое – это участие породы во внутривидовом, а второе – в межвидовом разнообразии вида. Поделив первое слагаемое, второе слагаемое и их сумму на общее разнообразие σ_o^2 , получим долю разнообразия, которое приходится на конкретную породу в общем разнообразии вида, а также внутривидовую и межвидовую составляющие этой доли.

На диаграмме показаны доли в общем разнообразии конкретных пород. Из исследованных групп крупного рогатого скота по AG-ISSR-маркерам наибольший вклад в общее разнообразие КРС вносят животные норвежской красной, нормандской и бурой швицкой (кавказский тип) (Рис.15).

Стоит отметить, что доля внутривидового разнообразия для всех пород составила 66%, а межвидового 34%.

Полученные оценки позволяют количественно характеризовать ценность каждой породы и по-новому взглянуть на проблему сохранения важнейших генетических ресурсов животных.

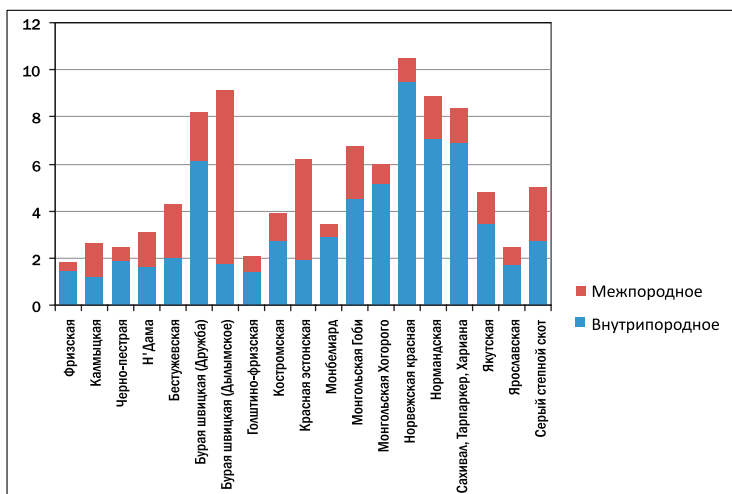


Рис. 15. Вклад отдельных пород в общее генетическое разнообразие КРС на основании данных AG-ISSR-маркеров.

3.6. Оценка дифференциации генофондов видов сельскохозяйственных животных с использованием метода ISSR-PCR

Одна из центральных проблем в работе с сельскохозяйственными видами связана с разработкой простых и надежных тест-систем для генотипирования отдельных животных, на основании которых можно не только исключать ошибки в их происхождении, но и оценивать видовую и породную принадлежность животных, контролировать процессы изменений генетических структур под влиянием факторов естественного и искусственного отборов. Видовая идентификация может быть необходима при ветеринарной и судебной экспертизе продуктов животноводства. К таким тест-системам, по нашему мнению, относятся ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), основанный на полилокусном генотипировании с использованием оценок длин фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами нуклеотидных последовательностей.

Для того чтобы оценить эффективность такого подхода, в настоящем разделе выполнен сравнительный анализ спектров фрагментов ДНК, фланкированных микросателлитными локусами, шести видов сельскохозяйственных животных.

В исследования были включены образцы крови животных КРС (род *Bos*, виды: *Bos taurus* и *Bos indicus*, в нашем случае эти группы объединены в одну), яки (род *Bos*, вид *Bos mutus*), овцы (род *Ovis*, подвид домашней овцы *Ovis ammon aries*), козы (род *Capra*, вид *Capra aeqagus*), свиньи (*Sus scrofa ferus*), верблюды (семейство *Camelidae* отряд мозолоногих *Tyloropoda*).

В работе рассмотрены спектры продуктов амплификации, полученные с помощью метода ISSR-PCR, в качестве праймеров использовали $(AG)_9C$ и $(GA)_9C$ к микросателлитным локусам $(TC)_n$ и $(CT)_n$. Анализ полученных спектров продуктов амплификации позволил выявить межвидовые различия у 6 domesticiрованных видов. На электрофореграммах суммарно идентифицировалось 38 фрагментов ДНК с различной частотой встречаемости.

Обнаружены как общие, так и видоспецифические фрагменты. Наиболее широкий спектр ПЦР-продуктов у изученных представителей шести видов выявили по $(AG)_9C$ праймеру у крупного рогатого скота (37 фрагментов), овец (33 фрагмента) и коз (26 фрагментов).

Видоспецифичность ПЦР-продуктов выражается как в отсутствии фрагмента ДНК, таки по его частоте встречаемости, в том числе и «эксклюзивной» встречаемости. Так, видоспецифичные фрагменты, в частности, те, которые не выявлены у животных других видов, обнаружены только у крупного рогатого скота (КРС) по праймеру $(AG)_9C$ – фрагменты: с молекулярной массой: 2500–2300 и 1900=1800 п.н. Отсутствие «тяжелых и легких» фрагментов, соответственно по $(AG)_9C$ и $(GA)_9C$ праймерам в популяциях свиней может рассматриваться как специфическая характеристика вида (*Sus scrofa ferus*). Для упрощения анализа полученных данных по ISSR-маркерам мы разделили фрагменты по их частоте встречаемости на две категории. Первая – фрагменты ДНК, частота встречаемости которых составила 1,000. Вторая – частота встречаемости составляет $> 0,4$, что соответствует введенному нами понятию «видовой» паттерн.

На рисунке 16 представлены фрагменты ДНК, которые выявлены у всех особей в том или ином domesticiрованном виде (100% встречаемость). Фрагменты ДНК с частотой встречаемости 1,000, в свою очередь образуют видоспецифические спектры ПЦР-продуктов для 6 domesticiрованных видов. Наличие видоспецифических фрагментов ДНК существенно варьировало среди 6 исследованных видов от 12 фрагментов в популяциях верблюдов до трех у овец. Значительно большее количество видоспецифических фрагментов получено с помощью праймера $(AG)_9C$ – 23 фрагмента ДНК, праймер $(GA)_9C$ синтезировал 14 видоспецифичных ПЦР-продукта.

Сравнительный анализ полиморфизма спектров продуктов амплификации, полученных с $(AG)_9C$ и $(GA)_9C$ праймерами, позволил обнаружить группы фрагментов ДНК, дифференцирующие виды. Совокупность выделенных фрагментов может рассматриваться как ДНК «штрихкод» геномов шести видов domesticiрованных животных (верблюдов, коз, овец, свиней, яков, КРС), а также использоваться для описания генофондов видов, их внутривидового разнообразия.

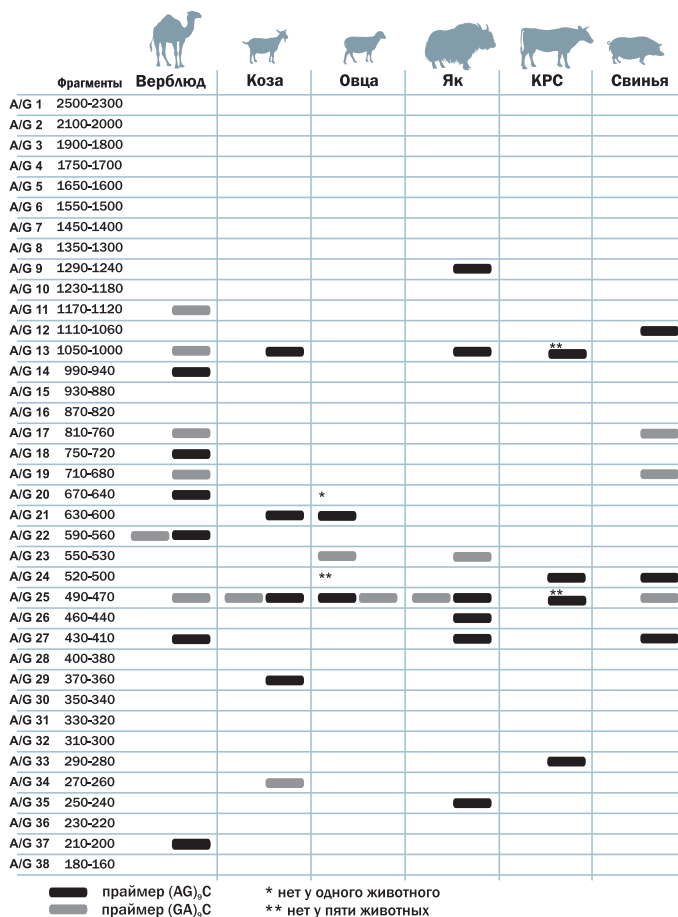


Рис. 16 Межвидовые различия в спектрах ПЦР-продуктов (частота встречаемости 1,000), полученных методом ISSR-PCR, с помощью праймеров (AG)₉C и (GA)₉C у 6 domesticiрованных видов.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что полилокусность маркеров ISSR-PCR удобна и, по-видимому, наиболее оптимальна при межвидовых сравнениях.

В таблице 5 представлены универсальные оценки генетического разнообразия у разных видов, выполненные с использованием ISSR-PCR маркеров. Общее генное разнообразие H_t по Нею (Nei, 1987) подразделяется на внутривидовое (Hc), между популяциями внутри группы (Dcs) и между группами популяций (Dst), т.е. $H_t = H_c + D_{cs} + D_{st}$. Величина $G_{st} = D_{st} / H_t$ представляет собой долю межгруппового разнообразия в общем, $G_{ct} = D_{cs} / H_s$ – долю внутривидового разнообразия внутри групп, а H_c / H_t – долю внутривидового разнообразия среди особей. Двухуровневый анализ

разнообразие и оценка долей H_s , D_{cs} , D_{st} в величине H_t показал, что общее генное разнообразие выше у КРС, овец и составило соответственно $H_t = 0,168 \pm 0,007$ и $0,151 \pm 0,010$, внутрипопуляционное разнообразие выше у свиней (H_s) $= 0,100 \pm 0,009$, а доля межпопуляционного разнообразия — у яков $G_{st} = 0,459$.

Межпопуляционная изменчивость у пяти видов, исключая свиней, значительно выше внутрипопуляционной изменчивости. Данный факт можно использовать при подборе и отборе (межпопуляционных и внутрипопуляционных скрещиваниях) животных, при разработке селекционной стратегии для поддержания генетической изменчивости.

Таблица 5. Параметры генетического разнообразия у шести domesticiрованных видов животных (праймер (AG)₉C).

	H_t	H_s	G_{st}
КРС	$0,168 \pm 0,007$	$0,093 \pm 0,002$	0,443
Яки	$0,081 \pm 0,007$	$0,044 \pm 0,002$	0,459
Овцы	$0,151 \pm 0,010$	$0,096 \pm 0,005$	0,365
Верблюды	$0,124 \pm 0,013$	$0,090 \pm 0,007$	0,273
Козы	$0,095 \pm 0,010$	$0,057 \pm 0,004$	0,396
Свины	$0,110 \pm 0,011$	$0,100 \pm 0,009$	0,089

H_t — средняя на локус гетерозиготность (общее генное разнообразие)

H_s — внутрипопуляционное разнообразие

G_{st} — доля межпопуляционного разнообразия в общем разнообразии

3.7. Применение метода ISSR-PCR для оценки популяционной структуры, индентификации и сходства генофондов пород и видов

Целью данного исследования стало определение возможностей совместного использования программы Structure v2.2 и метода ISSR-фингерпринтинга для анализа популяционной структуры domesticiрованных видов, а также для анализа генеалогии, сходства генофондов, оценки чистоты пород и внутрипородных групп сельскохозяйственных животных.

Обзор межвидовых, внутривидовых, меж- и внутри породных популяционных структуры и их взаимодействий на основе ISSR-фингерпринтинга мы начали с анализа межвидовых различий среди представителей пяти пород пяти одомашненных видов: крупного рогатого скота (серая степная порода), овцы (романовская), козы (советская шерстная), яка (тувинский сарлык), верблюда (тувинский верблюд). На **рис.17а** показана четкая кластеризация пяти видов животных, полученная с помощью Structure v2.2 .

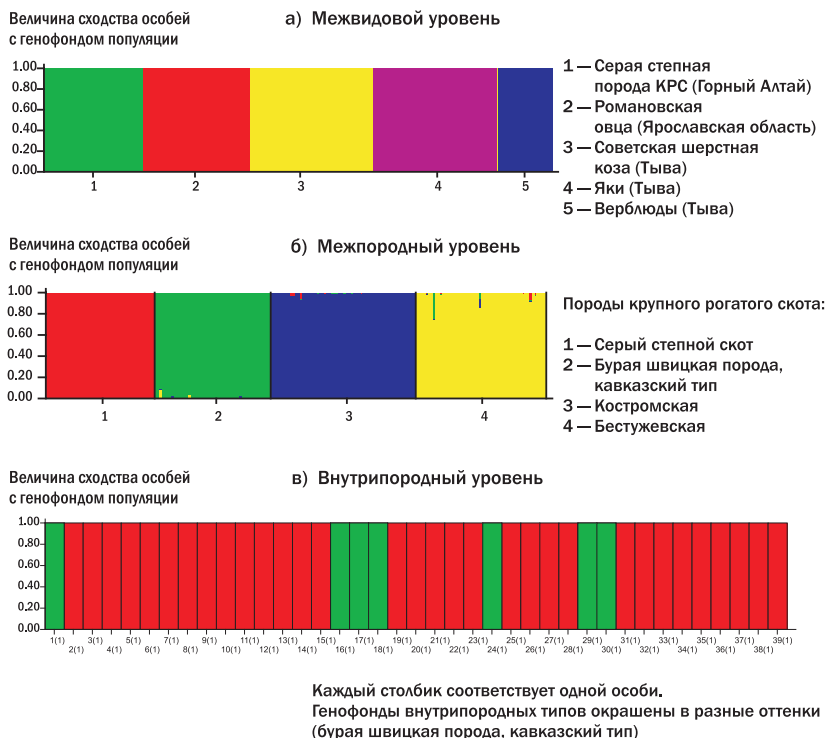


Рис. 17. Результаты анализа генофондов на основе популяционно-статистической обработки данных ISSR-фingerprintинга с использованием программы Structure v2.2. а — на межвидовом уровне, для пяти domesticированных видов животных; б — на межпородном уровне, для четырех пород крупного рогатого скота; в — на внутрипородном уровне, анализ чистопородности и консолидированности кавказского типа бурой швицкой породы КРС (Дагестан). Генофонды внутрипородных типов окрашены в разные оттенки. Каждый столбик соответствует одной особи.

Каждая особь представлена на гистограмме единственным вертикальным столбиком. Все исследуемые животные образовали пять монолитных кластеров, во всех случаях особь или группа особей того или иного вида после анализа Structure v2.2 присоединялась к популяционной структуре своего вида.

Следующий анализ данных по ISSR маркерам с помощью популяционно-статистической обработки включал межпородный уровень. Для этой цели были проанализированы популяции, представляющие четыре породы крупного рогатого скота: серый степной скот, кавказский тип бурой швицкой, костромская и бестужевская породы.

На рис. 17б показано разделение исследуемой совокупности, состоящей из особей четырех пород, на четыре кластера. Каждая порода сформировала собственный кластер. Однако, если в популяции серого степного скота была

зарегистрирована однородная картина, то в бурой швицкой, костромской и бестужевской были отмечены генотипы с чужеродной примесью (см. неоднородно окрашенные столбики).

Наиболее интересным и ранее мало изученным уровнем анализа стал внутрипопуляционный или внутрипородный уровень. С этой целью мы провели исследования данных ISSR-фингерпринтинга популяции кавказского типа бурого швицкого скота.

На рис. 17в показано, что в исследуемой популяции бурого швицкого скота (кавказский тип) семь животных не соответствуют генофонду породы. Возможно, эти особи принадлежат к генофонду горного скота Дагестана. На гистограммах ось ординат разделена на градации, позволяющие определять как чистоту, так и процент чужеродных примесей у особи, индивидуальный номер которой представлен на оси абсцисс. Важно, что предложенный метод позволяет выявить конкретных животных, несущих в своем генотипе примеси чужеродных генофондов. Из совокупностей особей легко вычислить процент интродуцированных генотипов на уровне популяции и тем самым сделать заключение о чистоте и консолидации породы в целом.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные проблемы сокращения биоразнообразия, в том числе генетических ресурсов сельскохозяйственных видов, существенно затронувших животноводческий сектор России, требует разработки новых подходов к их контролю и сохранению. В этих целях в работе выполнен поиск «центров» породного разнообразия России, выделено 5 регионов, в которых представлено наибольшее количество отечественных пород. Рассмотрены возможные организационные пути для их сохранения и устойчивого развития. Однако программы оптимизации использования отечественных генетических ресурсов нуждаются в разработке принципов отбора пород, конкретных популяций и животных, сохранение которых будет соответствовать поставленным задачам. Необходимым условием для принятия таких решений является создание системы генетического мониторинга генетических ресурсов сельскохозяйственных видов животных. В связи с этим выполнен сравнительный анализ различных методов генетического мониторинга, начиная от фенологического и включая генотипирование животных по полилокусным спектрам фрагментов ДНК, фланкированным инвертированными повторами микросателлитных локусов.

Исследования полиморфизма и распределения частот фенотипов, аллельных вариантов структурных генов позволяют выявлять фенотипические и генетические особенности внутрипородных и породных групп сельскохозяйственных видов животных и специфические межлокусные ассоциации, которые в некоторых случаях могут обладать повышенной селективной ценностью и использоваться при сохранении уровня генетической изменчивости в стадах, сохраняемых *in situ*.

Выполненное сравнение спектров ПЦР-продуктов с использованием в качестве праймеров фрагментов микросателлитных локусов (TC)₆G и (CT)₆G свидетельствует о том, что в ряде случаев длина фрагментов ДНК, фланкированных ими, консервативна и сохраняется у разных видов.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, метод ISSR-фингерпринтинга, в сочетании с программой Structure v2.2, могут быть использованы для решения нескольких задач: во-первых, для проведения молекулярно-генетической экспертизы по видовой и породной принадлежности животных. Во-вторых, для определения характеристик генетических структур породы, популяции: их однородности, консолидированности, «чистоты», а также соответствия отдельных особей генофонду породы. В-третьих, предложенные алгоритмы по сравнительному анализу искусственно созданных популяций с генетической структурой реальных внутрипородных групп позволяют выявлять совокупности животных, наиболее близкие как к «прагенофонду», так и к современному генофонду породы. «Искусственные популяции», созданные на основании сочетания видоспецифических фрагментов ДНК, позволяют выявлять из «анонимных выборок» животных популяции того вида, на основе которых были созданы искусственные выборки. В-четвертых, появилась новая возможность определять генеалогические связи между популяциями, оценивать их внутри- и межпопуляционные взаимоотношения.

Сочетание полилокусного генотипирования животных и использование для его анализа программы Structure v2.2 позволяет оценивать генофондную специфичность видов, пород, а, главное, получать ясные математические критерии для определения принадлежности особи к различным внутрипородным популяциям, к породам. Такой подход может значительно облегчить работу селекционера по поддержанию «чистоты» и консолидированности стада, его породного стандарта, а также стать основой для выработки определенных селекционных стратегий. Например, генетический мониторинг сохранения «древнего типа» породы, или размножения типа животных, по генетической структуре наиболее близкого к желательному для селекционера. Расширение спектра праймеров, с учетом геномной структуры различных видов, позволит получать более разнообразный спектр ПЦР-продуктов. При накоплении данных по ISSR-фингерпринтингу генофондов сельскохозяйственных видов возможно получить надежные математические критерии для оценки консолидации пород по многим десяткам локусов, а также сформулировать генетически обоснованные понятия «синтетическая» и «чистопородная» группы животных.

Исследование большего числа видов и пород будет способствовать созданию банка данных по их генофондным характеристикам, что позволит сформировать представления о прагенофондах, современных генофондах, выявлять эрозию и генетическую изменчивость пород и внутрипородных групп сельскохозяйственных видов животных, определять тактику и стратегию управления и сохранения пород и видов сельскохозяйственных животных, а

также в необходимых случаях надежно определять видовое происхождение товарных продуктов животноводства.

5. ВЫВОДЫ

1. Анализ динамики количественного и качественного состояния domesticiрованных видов животных в России за последние 20 лет свидетельствует о значительном сокращении количества аутохтонных (местных) пород, их внутривидовой численности. Эрозия, истощение и истребление генетических ресурсов сельскохозяйственных животных приводит к органичению в использовании разнообразных агроэкологических территорий Российской Федерации.
2. Сопоставление происхождения 198 пород 33-х domesticiрованных видов позволило локализовать на территории России пять основных центров наиболее интенсивного породообразования: северно-европейский, центрально-европейский, южно-европейский, кавказский и западно-сибирский. Принадлежность пород к вышеуказанным центрам необходимо учитывать при разработке стратегии сохранения генофондных ресурсов сельскохозяйственных видов животных
3. Сочетания фенотипов, аллелей структурных генов, полиморфизмов спектров «анонимных» последовательностей ДНК позволяют надежно дифференцировать породы, выделять генофондный «стандарт» породы, что может быть использовано для контроля динамики и сохранения генофондов редких и исчезающих пород.
4. Проведенный фенетический анализ позволил впервые обнаружить у аборигенных пород крупного рогатого скота отдельные фенотипы, встречающиеся у близкородственных диких видов полорогих. У крупного рогатого скота показано, что распределение частот встречаемости отдельных морфологических фенотипов может быть использовано как дополнительная породная характеристика.
5. При мониторинге состояния породы у ряда пород крупного рогатого скота выявлены по отдельным системам редкие аллельные варианты (в частности, аллель F в системе трансферрина, полиморфизм фосфоглюкомутазы, посттрансферринов), оценено их распределение и установлена вовлеченность в эволюцию пород. Так, аллель TF F встречался только у локальных пород, при создании которых принимал участие серый степной скот (например, бурая карпатская). Генотипирование таких моногенных локусов, с известной иммунной и биохимической функцией, позволяет выявлять пути межпородных взаимодействий в процессах их распространения и преобразования.
6. Впервые разработана общая универсальная шкала длин фрагментов ДНК, фланкированных динуклеотидными микросателлитами (TC)_nG и (CT)_nG для 6 видов парнокопытных, позволяющая надежно генотипировать животных одновременно по 38 фрагментам и выполнять внутри-, межпородные

и межвидовые сравнения, временной и пространственный мониторинг генофондов.

7. Сравнительный анализ полиморфизма спектров продуктов амплификации, полученных с праймерами (AG)₉C и (GA)₉C, позволил обнаружить группы фрагментов ДНК (локусов), дифференцирующие виды. Совокупность выделенных фрагментов могут рассматриваться как ДНК «штрихкод» геномов шести видов domesticированных животных (верблюдов, КРС, яков, овец, коз свиней), а также использоваться для описания генофондов видов, их внутривидового разнообразия.
8. Впервые выполненные сравнительные исследования полилокусных спектров фрагментов ДНК, фланкированных участками микросателлитных локусов (ISSR-PCR), ряда пород крупного рогатого скота позволили выявить консервативные и вариабельные участки, а также породоспецифические характеристики полученных спектров. Анализ полиморфизма и полиморфного информационного содержания (PIC) 102 локусов привел к выделению групп локусов, которые могут использоваться для описания породного «стандарта» таких отечественных пород, как серый степной, костромской скот, ярославская, бестужевская породы и др.
9. В спектрах ISSR-фингепринтинга одомашненных животных обнаружено четыре типа ПЦП-продуктов. Первые – видоспецифические фрагменты, которые выявляются у всех животных данного вида. Вторые – породоспецифические фрагменты с различной частотой встречаемости, обнаружены у конкретных пород. Третьи – редко встречающиеся фрагменты, их частота менее 0,4. Четвертые – фрагменты, которые являются результатом мутационного процесса, их частота встречаемости ничтожна мала. Различные сочетания четырех типов ПЦП-продуктов образуют специфические совокупности ISSR спектров, благодаря которым формируются генофондные профили вида и породы, видо-породоспецифические паттерны, генофондный стандарт породы.
10. Сравнительный анализ спектров фрагментов ДНК разной длины у 19-ти пород крупного рогатого скота свидетельствует о наибольшей межпородной консервативности спектров ампликонов праймера (GA)₉C по сравнению со спектрами фрагментов ДНК, полученных при использовании в качестве праймера (AG)₉C. При сопоставлении спектров генофондов исследованных пород выделяются породоспецифичные сочетания фрагментов ДНК, которые могут рассматриваться как породный ДНК «штрихкод».
11. Сопоставление меж- и внутривидовых, меж- и внутripородных полилокусных спектров ISSR-PCR маркеров полиморфизма геномной ДНК у пород овец и популяций яков свидетельствует о существенных отличиях генофондных ресурсов и закономерностях внутripородной и внутripопуляционной дифференциации в связи, в частности, с эколого-географическими особенностями разведения у таких пород овец как романовская и тувинская короткожирнохвостая, а также в популяциях яков Саяно-Алтайского региона.

12. Использование мультилокусного межмикросателлитного анализа (ISSR-PCR) совместно с методом к-кластеризации популяционных структур (программы Structure v2.2.) стало основой ряда тестов молекулярно-генетической экспертизы и исследования генофонда domesticированных видов животных. Показаны возможности анализа популяционной структуры domesticированных видов на различных уровнях (межвидовом, межпопородном и внутривидовом), анализа сходства и различия генофондов пород (внутрипородных групп), их идентификации и наглядной оценки консолидированности, чистопородности и генеалогических связей.
13. На основании анализа генетических структур стад 40 генофондных хозяйств базовых domesticированных видов выделены наиболее консолидированные 30 хозяйств, в которых содержатся чистопородные животные той или иной породы.
14. Предложена концепция сохранения генетических ресурсов domesticируемых видов, основанная на новой организационной структуре и принципах генетического мониторинга, популяционно-генетических методах и идеологии природоохранной генетики.

6. ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Использование мультилокусного межмикросателлитного анализа (ISSR-PCR) совместно с методом к-кластеризации популяционных структур позволили предложить метод для молекулярно-генетической экспертизы и оценки популяционной структуры, идентификации, установления сходства генофондов пород и видов domesticированных животных. Рекомендован новый метод оценки чистопородности и консолидации животных и пород КРС и овец на основе последовательностей ДНК (ISSR-PCR).
2. При сохранении пород *in situ* предлагается учитывать изменения средней гетерозиготности по ISSR-маркерам, как показателя сохранения популяционно-генетической структуры породы (популяции).
3. В результате выполненного сравнения шести сельскохозяйственных видов животных получены и оценены полилокусные спектры фрагментов ДНК разной длины, из них отобраны участки, фланкированные инвертированными повторами микросателлитных локусов и их отдельные сочетания, которые могут служить надежными видовыми, а также групповыми маркерами для исследованных групп животных. Отобранные фрагменты ДНК могут быть использованы для создания макробιοчипов в целях ускорения и облегчения генотипирования животных.
4. Разработана система действий по оценке и сохранению генетического разнообразия породы генофондных хозяйствах. Для оптимизации планирования программ сохранения для конкретных пород предложена оценка ценности породы, ее вклада в общее генетическое разнообразие на примере данных ISSR-фингерпринтинга.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Монографии

1. Уханов С.В., **Стопловский Ю.А.**, Банникова Л.В. и др. Генетические ресурсы крупного рогатого скота / Под ред. И.А. Захарова М.: Наука, 1993. 170 с.
2. **Стопловский Ю.А.** Консервация генетических ресурсов сельскохозяйственных животных: проблемы и принципы их решения / Под ред. И.А. Захарова. М.:Эребус, 1997. 112 с.
3. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л. ... **Стопловский Ю.А.** и др. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. М.: Наука, 2004. 618 с.
4. Моисеева И.Г., Уханов С.В., **Стопловский Ю.А.** и др. Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / ред. И.А. Захаров. М.: Наука, 2006. 466 с.
5. **Стопловский Ю.А.**, Захаров И.А. Генофонды отечественных пород – национальное богатство России. М.: 2007. 48 с.
6. Козирь В.С., Барабаш В.І. ... **Стопловский Ю.А.** и др. Сіра українська худоба: минуле, сучасне, майбутнє / Під ред. Академіка УААН В.С. Козиря. Дніпропетровськ.: Українська Академія Аграрних Наук, Інститут Тваринництва Центральних Районів, 2008. 243 с.

Статьи

1. **Стопловский Ю.А.**, Скрипниченко О.М., Кирич Г.Н. и др. Создание генофонда редких видов диких млекопитающих, птиц и аборигенных пород домашних животных в целях сохранения, гибридизации и доместикации / Генетика – народному хозяйству. Новосибирск, 1990. С. 57–63
2. **Stolpovskii Yu.A.**, Stolpovskaja O.B. Polymorphism of phosphoglucumutase in Grey Ukrainian cattle // Izozyme Bulletin. 1991. vol. 24. P. 54.
3. Stolpovskaja O.B., **Stolpovskii Yu.A.** Transferrins of blood serum in cattle of Grey Ukrainian breed (B.t. primigenius) // Izozyme Bulletin. 1990. vol. 23. P. 23:93
4. **Stolpovskii Yu.A.**, Stolpovskaja O.B. Blood serum post-transferrin-3 (PTF-3) in Grey Ukrainian cattle // Izozyme Bulletin. 1991. vol. 24. P. 54
5. **Стопловский Ю.А.** Генетический мониторинг и рациональное использование генофонда серой украинской породы крупного рогатого скота. Автореф. Дисс. канд.биол. наук. С-ПБ, 1992. 19 с.
6. Стопловская О.Б., **Стопловский Ю.А.**, Годованец Л.В., Чуй Р.Ф. Сравнительное исследование белкового полиморфизма серой украинской породы. // Цитология и генетика. 1992. т. 26. № 5. С. 11–18.
7. **Стопловский Ю.А.** Сохранение генетических ресурсов крупного рогатого скота // Генетические ресурсы крупного рогатого скота / Под ред. И.А. Захарова. М.: Наука, 1993. С. 5–19.
8. **Стопловский Ю.А.** Фенетический подход в изучении популяций сельскохозяйственных животных на примере серой украинской породы крупного рогатого скота (Bos taurus primigenius) // Сельскохозяйственная биология. 1996. N 6.
9. Глазко В.И., **Стопловский Ю.А.**, Тарасюк С.И. и др. Изучение особенностей бурой карпатской породы — местной исчезающей породы крупного рогатого скота Западной Украины // Генетика. 1996. Т. 32, N5. С. 668–676.
10. Глазко В.И., **Стопловский Ю.А.**, Тарасюк С.И., Букаров Н.Г., Попов Н.А. Генетическая структура породы пингвау в карпатском регионе // Генетика. 1996. Т. 32, N 5. С. 676–684.
11. **Стопловский Ю.А.** Популяционно-фенетический анализ серой украинской породы крупного рогатого скота. // Популяционная фенетика. М.: Наука, 1997. С.135–148.

12. **Стопловский Ю.А.**, Глазко В.И., Облап Р.В., Кушнир В.А. Фенотипическая и генетическая структура серой украинской породы крупного рогатого скота // Цитология и генетика. 1998 Т.32, N 5. С.67–74.
13. Глазко В.И., **Стопловский Ю.А.**, Дымань Т.Н., Кушнир А.В. Пространственная и временная подразделенность генетической и фенетической структуры серого украинского скота // Док. НАН Украины. 2000. N7. С. 183–187.
14. Карамчакова О.Н., **Стопловский Ю.А.** Молекулярно-генетический анализ вариантов каппа-казеина у коров красной горбатовской породы // Вестник РУДН серия Сельхоз. науки. Животноводство. 2001. № 6. С. 22–23.
15. Малиенко В.А., **Стопловский Ю.А.**, Литвак О.О., Глазко В.И. Генетика и селекция на Украине / НАН Украины, Укр., т-во генетиков и селекционеров. К.: Логос, 2001. Т.1. С.272–276.
16. Катков Л.В., Саморуков Ю.В., Чубарь Н.М., **Стопловский Ю.А.** и др. Программа сохранения рационального использования генофонда красной горбатовской породы КРС / рец. В.К. Чернушенко, Д.В. Карликов, Н.Ф. Лось. МСХ РФ. Дубровицы, 2001. 50 с.
17. **Стопловский Ю.А.** Сохранение культурного биоразнообразия / Биоразнообразие и сохранение генофонда флоры, фауны и народонаселения Центрально-Азиатского региона.: ТувИКОПР СО РАН. Кызыл, 2003. С. 90–94.
18. Алтухов Ю.П., Захаров И.А., **Стопловский Ю.А.** и др. Динамика популяционных генофондов животных / В кн. «Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях» (под ред. акад. Ю.П. Алтухова). М.: Наука, 2004. С. 110–294.
19. Захаров И.А., Сулимова Г.Е., **Стопловский Ю.А.** и др. Мониторинг генофондов популяций животных в связи с задачами селекции и изучением филогении. М.: РАН, 2005. С. 96–98.
20. Сулимова Г.Е., **Стопловский Ю.А.**, Каштанов С.Н., Моисеева И.Г., Захаров И.А. Методы управления генетическими ресурсами domesticiрованных животных / Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. С. 331–340.
21. **Стопловский Ю.А.**, Захаров И.А. Генетические аспекты проблемы сохранения биологического разнообразия домашних животных // Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / ред. И.А. Захаров. М.: Наука, 2006. С. 8–22.
22. Уханов С.В., **Стопловский Ю.А.**, Сулимова Г.Е. и др. Породы рогатого скота и их генофонды // Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / ред. И.А. Захаров. М.: Наука, 2006. С.23–123.
23. **Стопловский Ю.А.** Сокращение породного разнообразия КРС // Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / ред. И.А. Захаров. М.: Наука, 2006. С. 168–175.
24. **Стопловский Ю.А.** Як Bos mutus // Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / ред. И.А. Захаров. М.: Наука, 2006. С.175–186.
25. **Стопловский Ю.А.** Сохранение «культурного» биоразнообразия // Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / ред. И.А. Захаров. М.: Наука, 2006 С. 389–410.
26. Захаров-Гезехус, **Стопловский Ю.А.**, Уханов С.В., Моисеева И.Г. Сулимова Г.Е. Мониторинг генофондов популяций животных в связи с задачами селекции и изучении филогении. Биоразнообразие и динамика генофондов // Динамика генофондов. ФИАН. 2007. С.122–124.
27. Сулимова Г.Е., **Стопловский Ю.А.**, Лазебный О.Е., Захаров-Гезехус И.А. Мониторинг генофондов популяций животных в связи с задачами селекции и изучением филогении/ Программа фундаментальных исследований РАН. Москва. 2007. С. 154–156.
28. **Стопловский Ю.А.** Ключевой вопрос в сохранении «культурного» биоразнообразия животных – сохранение породного многообразия // Известия ТСХА. N 5. 2007. С.125–134.

29. **Стопловский Ю.А.**, Лапшин А.В., Кол Н.В., Сулимова Г.Е., Глазко В.И. Полиморфизм молекулярно-генетических маркеров у овец романовской породы // Известия ТСХА, N 2. 2008. С.125–134.
30. Сулимова Г.Е., **Стопловский Ю.А.**, Рузина М.А., Захаров-Гезехус И.А. Мониторинг генофондов популяций животных в связи с задачами селекции и изучением филогении / Биоразнообразие и Динамика генофондов. Москва, 2008. С. 211–214.
31. **Стопловский Ю.А.**, Кол Н.В., Рузина М. Н, Стопловский К.Ю., Сулимова Г.Е. Сравнительный анализ генетической изменчивости пяти отечественных пород крупного рогатого скота с использованием AG-ISSR маркеров / Сборник трудов КСХА, Караваево. 2009. С. 184–190.
32. Баранов А.С., **Стопловский Ю.А.**, Яблоков А.В., Баранов А.В. К сохранению генетических ресурсов с\х пород и сортов России / Сборник трудов КСХА, Караваево. 2009. С. 28–32.
33. **Стопловский Ю.А.**, Захаров И.А. Генофонды отечественных пород — национальное богатство России //Вісник Інституту тваринництва центральних районів УААН, вип.5, Дніпропетровськ, 2009. С. 124–141.
34. Глазко В.И., **Стопловский Ю.А.**, Феофилов Ф.В., Кол Н.В. Распределение фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами ди – и тринуклеотидных микросателлитов, в геномах серого украинского скота // Известия ТСХА. N 1. 2009. С.155–162.
35. Сулимова Г.Е., Ахани Азари М., **Стопловский Ю.А.**, Лазебный О.Е., Максименко В.Ф. Сравнительное исследование полилокусных спектров фрагментов ДНК, фланкированных участками микросателлитных локусов (ISSR-PCR) стад и линий ярославской породы крупного рогатого скота. Научные основы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных / под ред. В.Е. Кремина. Ярославль, 2009. С. 159- 163.
36. **Стопловский Ю.А.**, Ахани Азари М., Кол Н.В., Рузина М.Н., Стопловский К.Ю., Сулимова Г.Е., Глазко В.И. Сравнительное исследование полилокусных спектров фрагментов ДНК, фланкированных участками микросателлитных локусов (ISSR-PCR) у пород крупного рогатого скота // Известия ТСХА. N3. 2009. С.89–97.
37. **Стопловский Ю.А.**, Шимиит Л.В., Кол Н.В., Евсюков А.Н., Рузина М.Н., Чургуй-оол О.И., Сулимова Г.Е. Анализ генетической изменчивости и филогенетических связей среди популяций тувинской короткожирнохвостой овцы с использованием ISSR маркеров / Сельскохозяйственная биология. N6. 2009. С. 34–43.
38. Глазко В.И., **Стопловский Ю.А.** Получение подборки ДНК для макробичипов удобных для одновременного генотипирования крупного рогатого скота / Методические рекомендации. МСХ РФ. РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва. 2009. 34 с.
39. **Стопловский Ю.А.** Новые организационные система и принципы сохранения генофондов domesticiрованных видов животных // Вестник РАСХН. N6. 2009. С.80–81.
40. **Стопловский Ю.А.**, Лазебный О.Е., Стопловский К.Ю., Сулимова Г.Е. Применение метода ISSR-PCR для оценки популяционной структуры идентификации и сходства генофондов пород и видов domesticiрованных животных // Генетика. 2010. Т. 46, N 6. С. 1–9.