

## ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

### VETERINARY AND ANIMAL BREEDING

УДК 636.294:591.471  
ГРНТИ 68.39.57; 34.33

DOI: 10.24411/1999-6837-2018-13058

**Брызгалов Г.Я.**, вед. науч. сотр. отдела ФПИИР  
Магаданский научно-исследовательский институт сельского хозяйства  
г. Магадан, Магаданская область, Россия  
E-mail: agrarian@maglan.ru

#### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ МАГАДАНСКОЙ ОБЛАСТИ

© Брызгалов Г.Я., 2018

*Представлены результаты оценки генетической структуры популяции домашних северных оленей Магаданской области по полиморфизму межмикросателлитных последовательностей ДНК. ISSR-методом проведено индивидуальное генотипирование и установлена внутривидовая генетическая изменчивость приохотской популяции оленей эвенской породы. С помощью праймера (AG)<sub>n</sub> С получены амплифицированные фрагменты ДНК длиной от 180 до 1400 п.н. В спектре частот аллелей наиболее часто встречаются фрагменты средней длины от 300 до 500 п.н. В данной выборке обнаружено 11 фрагментов, расположенных в геноме между микросателлитами типа AG. Из 11 локусов 7 (63,6%) являются информативными для изученной популяции, так как встречаются с частотой более 5%. Около 30% особей исследованной выборки имеют уникальные генотипы. Распределение частот встречаемости фрагментов ДНК в целом типичное для северных оленей (*Rangifer tarandus* L). Гетерозиготность межмикросателлитной ДНК находится на высоком уровне – 0,883 и превосходит таковую в выборках чукотской (0,860) и ненецкой пород (0,833). Высокий уровень гетерозиготности дает преимущество животным по адаптивным признакам. Полученная информация указывает на необходимость контроля состояния генетического разнообразия, обеспечивающего устойчивость популяции.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** МАГАДАНСКАЯ ОБЛАСТЬ, СЕВЕРНЫЙ ОЛЕНЬ, ЭВЕНСКАЯ ПОРОДА, ПОПУЛЯЦИЯ, ISSR-МЕТОД, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА, МОНИТОРИНГ.

UDC 636.294:591.471

DOI: 10.24411/1999-6837-2018-13058

**Bryzgalov G.Ya.**, Leading Research Worker,  
Magadan Research Institute of Agricultural,  
Magadan, Magadan region Russia,  
E-mail: agrarian@maglan.ru

#### GENETIC STRUCTURE OF POPULATIONS OF REINDEER IN THE MAGADAN REGION

*The research paper presents the results of assessment of the genetic structure of the population of domestic reindeer in the Magadan Region in the terms of polymorphism of inter-microsatellite of DNA sequences. Using ISSR-method, individual genotyping was fulfilled*

*and intraspecific genetic variation of Priokhotsk deer population of the Even breed was determined. With the help of the primer (AG)<sub>9</sub>C the amplified DNA fragments with length from 180 to 1400 p.n. (pairs of nucleotides) were obtained. In the frequency spectrum of alleles, the most frequent fragments are of average length from 300 to 500 p.n. 11 fragments, located in the genome between AG-type microsatellites, were found in this sampling. Of the 11 locus, 7 (63.6%) are informative for the examined population, as they occur at a frequency of more than 5%. About 30% of the examined samples have unique genotypes. The distribution of frequencies of occurrence of DNA fragments in general is typical for reindeer (*Rangifer tarandus* L). Heterozygosity of intermicrosatellite DNA is high – 0,883 and exceeds that of Chukchi breed samples (0,860), and Nenetsk breed samples (0,833). A high level of heterozygosity gives an advantage to animals in regard to adaptive traits. The information obtained indicates the need to monitor the state of genetic diversity, ensuring the stability of the population.*

KEY WORDS: MAGADAN REGION, REINDEER, EVEN BREED, POPULATION, ISSR - METHOD, GENETIC STRUCTURE, MONITORING.

Олени эвенской породы хорошо приспособлены к круглогодичному пастбищному содержанию в условиях горно-таежной и лесотундровой зоны Севера Дальнего Востока. Обладают рядом ценных хозяйственно-полезных признаков, таких как скороспелость, удовлетворительные репродуктивные, мясные и рабочие качества.

В районах Крайнего Севера оленеводство всегда имело важное хозяйственное и социальное значение как отрасль занятости коренного населения. В 1980-х годах в 12 совхозах Магаданской области выпасалось 130 тыс. голов основного стада. Функционировал племенной репродуктор по разведению оленей эвенской породы. В целях обогащения генофонда осуществлялась интродукция производителей из других регионов [10].

В 1990-е годы оленеводству Магаданской области нанесен существенный урон, поголовье сократилось в 10 раз, утрачена собственная племенная база. В настоящее время из-за снижения численности животных до критического уровня необходимы меры по сохранению генофонда популяции. В первую очередь требует изучения генетическая структура стада. Исследования в данном направлении ранее не проводились.

Цель нашей работы - провести оценку генетической структуры северных оленей эвенской породы, разводимых в Магаданской области.

Уникальность каждой популяции (или породы) определяется генетической структурой, которую оценивают относительной частотой генотипов или частот генов. Такая информация необходима для выбора селекционной стратегии по совершенствованию продуктивных качеств животных [6].

Для изучения генетической дифференциации животных применяют ДНК-маркеры, полученные на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Межмикросателлитные последовательности ДНК (ISSR – inter-simple sequence repeats) имеют множественную локализацию в геноме, высокий уровень полиморфизма и широко используются для выявления внутривидовой генетической изменчивости, идентификации популяций, пород, типов и линий сельскохозяйственных животных [5,12].

С целью получения ISSR-фрагментов ДНК используют праймеры, позволяющие амплифицировать участки ДНК, расположенные между двумя микросателлитными повторами. В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами (ISSR-фингерпринтинг). Фрагмент определенной длины условно принимается за локус ДНК. Метод анализа полиморфизма межмикросателлитных участков ДНК, основанный на полимеразной цепной ре-

акции, позволяет охарактеризовать множественные локусы генома оленей и является эффективным инструментом оценки индивидуального, группового и популяционного разнообразия [2,8].

#### Материалы и методы

В 2017 году исследовано 84 особи эвенской породы, принадлежащих МУСХП «Ирбычан» Северо-эвенского района Магаданской области. В эксперименте использованы клинически здоровые животные разных половозрастных групп – быки, важенки (матки старше 2-х лет) и молодняк. Отбор оленей проводили рэндомным методом во время коральных работ. Материалом для молекулярно-генетических исследований служили пробы ткани - выщипы ушной раковины оленей. Анализ образцов выполнен в лаборатории ДНК-технологий Всероссийского НИИ племенного дела по договору.

В качестве маркеров полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов (ISSR-PCR-маркеры), использовали стандартный метод, разработанный Зиеткевичем и др. [7,13]. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) из проб ткани оленей выделяли геномную ДНК, в качестве праймера в реакционную смесь добавляли фрагменты динуклеотидных микросателлитных локусов (AG)<sub>n</sub>C. PCR проводили на амплификаторе «Терцик, ДНК Технология» (Россия) с применением набора сухих реагентов для PCR-амплификации ДНК Genepak<sup>TM</sup> PCR Core (Изоген, Москва). Условия PCR: первоначальная денатурация 2 мин при 95°C, денатурация при 95°C – 30 с, отжиг при 55°C – 30 с, синтез при 72°C – 2 мин (37 циклов), завершающий синтез при 72°C – 7 мин. Фракционирование продуктов амплификации осуществляли в 2%-м агарозном геле с применением в качестве ДНК-маркера GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, USA) для оценки длины продуктов PCR-амплификации. Визуализацию продуктов PCR-ампликации

проводили под ультрафиолетовым излучением на трансиллюминаторе после окрашивания гелей бромистым этидием. Статистическая обработка данных выполнена с помощью стандартных компьютерных программ «Genepop».

Каждый фрагмент рассматривался как отдельный маркер, представляющий собой нуклеотидную последовательность, заключенную между двумя инвертированными микросателлитными повторами. Для расчетов использованы локусы ДНК, образующие фрагменты длиной от 180 до 1400 п.н., ясно различимые визуально и формирующие выраженные пики при компьютерном сканировании гелей. Исходя из частот встречаемости фрагментов ДНК, определяли показатели, характеризующие генетическую структуру популяции [4,9].

#### Результаты и обсуждение

В изученной выборке оленей эвенской породы выявлен 551 фрагмент ДНК. Анализ изменчивости показал, что у каждой отдельной особи имеется от 1 до 9 фрагментов межмикросателлитной ДНК, а среднее их число у одного животного составляет 6,56. Наиболее распространены межмикросателлитные участки ДНК средней длины. Все выявленные локусы полиморфны, т.е. встречаются с частотой меньшей 1. Распределение частот встречаемости фрагментов ДНК в стадах «Ирбычана» типичное для северных оленей (*Rangifer tarandus L*) [1,8].

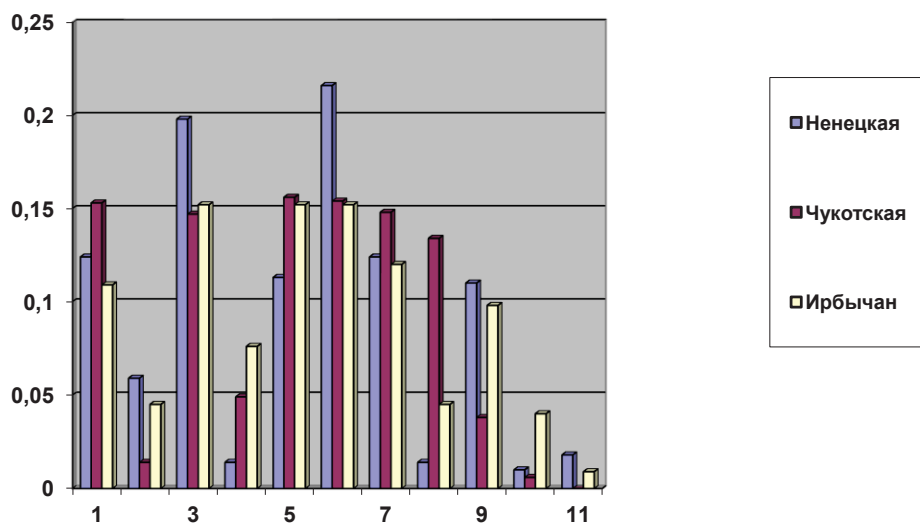
В данной выборке оленей выявлено 11 маркерных фрагментов ДНК. Чаще других встречаются пять фрагментов ДНК – первый, третий, пятый, шестой и седьмой, их суммарная частота составляет 0,685. В целом, распределение фрагментов сходно с таковым для оленей чукотской и ненецкой пород (табл., рис.). У 100% исследованных животных присутствует межмикросателлитный участок ДНК длиной около 300 п.н. (локус 3), 400 п.н. (локус 5) и 500 п.н. (локус 6), характерные для северных оленей.

Таблица

**Частота встречаемости ISSR-маркеров в популяции эвенской породы в сравнении с чукотской и ненецкой породами северных оленей**

Длина фрагмента, п.н.*	Породы северных оленей		
	Эвенская	Чукотская [11]	Ненецкая [6]
180 - 210	<b>0,109</b>	0,153	0,124
220 - 230	0,045	0,014	0,059
240 - 330	<b>0,152</b>	0,147	0,198
330 - 350	0,076	0,049	0,014
350 - 430	<b>0,152</b>	0,156	0,113
440 - 520	<b>0,152</b>	0,154	0,216
520 - 570	<b>0,120</b>	0,148	0,124
650 - 690	0,045	0,134	0,014
700 - 770	0,098	0,038	0,110
850 - 980	0,04	0,006	0,010
1100 - 1300	0,009	0	0,018

\*пар нуклеотидов



**Рис. Графическое отображение частот фрагментов ДНК у оленей эвенской породы (Ирбычан) в сравнении с чукотской и ненецкой**

Локус 7, также типичный для северных оленей, выявлен у 76% исследованных животных. Из 11 локусов 7 (63,6%) являются информативными для изученной популяции, поскольку имеют частоту встречаемости более 5%. По наиболее часто встречающимся локусам 3, 5 и 6 выявлено сходство у исследуемой популяции со средними значениями по чукотской породе. В то же время имеются различия по частоте встречаемости локусов в данной выборке эвенской породы, от средних значений частот маркерных локусов у оленей чукотской и ненецкой пород. Так, у изучаемой популяции в сравнении с чукотской породой реже встречается

локус 1 на 4,4%, локус 7 - на 2,8%, локус 8 - на 8,9%. Напротив, чаще выявляется локус 2 на 3,1%, локус 4 - на 2,7%, локус 9 - на 6,0%, локус 10 - на 3,4%. Относительно ненецких оленей, в выборке эвенской породы реже частота встречаемости по локусам 1 и 2 на 1,4-1,5%, локусу 3- на 4,6%, локусу 6 - на 6,4%, локусу 9 - на 1,2%. И чаще по локусу 4 -на 6,2%, локусу 5 -на 3,9%, локусу 8 -3,1%.

Анализ частот встречаемости ISSR-фрагментов ДНК у особей эвенской породы по половозрастным группам показал, что геноме быков фрагменты №1 и №8 представлены реже, чем у важенок и

молодняка на 4,5%. Напротив, фрагменты №4 и №7 чаще на 3,5%, чем у маток и на 4,8% в сравнении с молодняком. Фрагмента №9 у быков на 3,7% больше, чем у телят, фрагмента №10 на 3,4% больше, чем у маток. По другим локусам различия между половозрастными группами животных несут незначительный характер.

Полученные значения частот генотипов свидетельствуют о достаточно высоком сходстве паттернов у отдельных особей, а, следовательно, и сайтов локализации микросателлитных последовательностей в геноме оленей. Исследования показали, что наиболее распространенными в этой локальной популяции северных оленей эвенской породы являются генотипы, имеющие в своем составе локусы 3,5, 6,7, и 9. Одинаковые генотипы встречаются у двух-пяти особей. Около 30% исследованной выборки животных имеют уникальные генотипы.

В группе быков 9 различных генотипов встречаются с частотой от 6,2% до 12,5%, остальные 7 генотипов представлены равномерно с частотой 3,1%. Наиболее часто встречаются генотипы 3/4/5/6/7/9 и 3/5/6/7/9/10 (по 12,5% каждый). У важенков различные генотипы отмечены с частотой от 3,1 до 15,6%. В большей мере (15,6%) представлен генотип 1/2/3/4/5/6/7/9. В группе молодняка частота встречаемости генотипа составляет от 5 до 20%, преобладает генотип 3/5/6/7/9/10.

Уровень средней гетерозиготности микросателлитной ДНК (0,883) свидетельствует о значительном генетическом разнообразии соответствующих локусов генома в исследованном стаде оленей. Данный показатель выше, чем в выборках чукотской (0,860) и ненецкой (0,833) пород [1,8]. Изучаемая популяция превосходит чукотскую породу по среднему числу аллелей на локус микросателлитов (9,9 против 7,3-8,6) и числу эффективных аллелей на локус (8,5 против 6,7-8,1). Высокий уровень гетерозиготности дает преимущество животным по адаптивным признакам [8,11].

Ареал северного оленя находится в суровых природных и климатических условиях Арктики и Субарктики. На генетическую дифференциацию популяций доминирующее влияние оказывает естественный отбор, действие и направление которого меняется в зависимости от комплекса средовых факторов и системы содержания, кормления и селекционно-племенной работы. Каждая популяция адаптировалась к местным экологическим условиям, и только в данных условиях животные способны проявлять в среднем максимальную жизнеспособность и продуктивность [3,10,11].

Значительная гетерогенность приохотской популяции эвенской породы, по-видимому, связана с особенностями формирования генофонда МУСХП «Ирбычан», происшедшего в конце 1990-х годов при реструктуризации совхозов на основе слияния трех субпопуляций эвенской породы - Пареньской, Гижигинской и Гармандинской, отличавшихся генетически различным составом животных. Пастбища Пареньской субпопуляции находятся на границе ареалов эвенской и чукотской пород, поэтому, весьма вероятно, имел место обмен мигрантами. Для обогащения аллелофонда гижигинские стада в 1980-х годах неоднократно пополнялись эвенскими самцами из горно-таежной зоны Якутии (Саха). Гармандинские олени принадлежат к более крупному лесному типу. Объединение генетически разнородного поголовья обеспечило значительную гетерогенность этой локальной популяции северных оленей эвенской породы.

#### Заключение

У северных оленей Магаданской области выявлено 11 фрагментов ДНК, расположенных в геноме между микросателлитами типа AG. Распределение частот встречаемости фрагментов типичное для северных оленей (*Rangifer tarandus L.*). Наиболее часто в геноме встречаются фрагменты средней длины: от 300 до 500 п.н.

У 100% исследованных животных присутствуют межмикросателлитные участки ДНК длиной около 300 п.н. (локус 3), 400 п.н. (локус 5) и 500 п.н. (локус 6), характерные для северных оленей. Локус 7 выявлен у 76% особей. Из 11 локусов 7 (63,6%) являются информативными для изученной популяции.

Наиболее распространены генотипы, имеющие в своем составе локусы 3,5, 6,7, и 9. Около 30% выборки животных имеют уникальные генотипы.

Популяция оленей эвенской породы Магаданской области превосходит чукотскую породу по среднему числу аллелей на локус (9,9 против 7,3-8,6) и числу эффективных аллелей на локус (8,5 против 6,7-8,1). Уровень средней гетерозиготности в выборке исследованного стада (0,883) выше, чем в аналогах чукотской (0,860) и ненецкой (0,833) пород. Приведенные данные свидетельствуют о генетическом разнообразии генома изучаемой группы оленей.

Высокая гетерогенность Магаданской популяции связана, по-видимому, с особенностями формирования ее генофонда, происходившего путем слияния трех генетически различных субпопуляций эвенской породы.

Практический интерес полученных данных состоит в том, что они могут ориентировать зоотехников-селекционеров при отборе перспективного материала для селекционных целей, а также в вопросах сохранения биоразнообразия сельскохозяйственных животных, в частности, северных оленей.

Учитывая, что численность оленей в Магаданской области значительно сократилась и находится в критическом состоянии, необходимо следить за уровнем генетического разнообразия, обеспечивающего устойчивое поддержание популяции. Результаты исследования указывают на необходимость мониторинга состояния генофонда.

#### Библиографический список

1. Брызгалов, Г.Я. Оценка генетической структуры чукотской породы северных оленей / Г.Я. Брызгалов // Вестник ДВО РАН. - 2016. - №2(186). - С. 108-112.
2. Гончаров, В.В. Оценка генетического разнообразия северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) с помощью мультилокусного ДНК-фингерпринтинга / В.В. Гончаров, О.В. Митрофанов, Н.В. Дементьева и др. // Доклады РАСХН. - 2011. - № 5. - С. 36-39.
3. Давыдов, А.В. Дифференциация диких и домашних форм северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) по результатам анализа мтДНК / А.В. Давыдов, М.В. Холодова, И.Г. Мещерский и др. // С.-х. биология. - 2007. - № 6. - С. 48-53.
4. Животовский, Л.А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях / Л.А. Животовский // Итоги науки и техники: Общая генетика. - Москва: ВИНТИ, 1983. - Т. 8. - С. 76-104.
5. Зиновьева, Н.А. Генетическая экспертиза сельскохозяйственных животных: применение тест-систем на основе микросателлитов / Н.А. Зиновьева, Е.А. Гладырь // Достижения науки и техники АПК. - 2011. - № 9. - С. 19-20.
6. Мацевский, Я. Генетика и методы разведения животных / Я. Мацевский, Ю. Земба. - Москва: Высшая школа, 1988. - 488 с.
7. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве / сост. Н.А. Зиновьева [и др.] / Дубровицы: ВНИИ животноводства, 1998. - 47 с.
8. Романенко, Т.М. Генетическая структура популяции северных оленей о. Колгуев Ненецкого автономного округа / Т.М. Романенко, Л.А., Калашникова, Г.И. Филиппова, К.А. Лайшев // Достижения науки и техники АПК. - 2014. - № 4. - С. 68-70.
9. Серебровский, А.С. Генетический анализ / А.С. Серебровский. - Москва: Наука, 1970. - 188 с.
10. Система ведения оленеводства в Магаданской области: Рекомендации / Разраб.: П.М. Барсов, Г.Я. Брызгалов, Б.В. Гарбарец и др. - Новосибирск: СО ВАСХНИЛ, 1986. - 252 с.
11. Шубин, П.Н. Биохимическая и популяционная генетика северного оленя / П.Н. Шубин, Э.А. Ефимцева. - Ленинград: Наука, 1988. - 103 с.
12. Яковлев, А.Ф. ДНК-технологии в селекции сельскохозяйственных животных / А.Ф. Яковлев, М.Г. Смарагдов, В.С. Матюков // Достижения науки и техники АПК. - 2011. - № 8. - С. 49-50.

13. Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994) Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20, P. 176-183. – URL: <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1994.1151>

#### Reference

1. Bryzgalov, G.YA. Ocenka geneticheskoy struktury chukotskoj porody severnyh oleney (Assessment of the Genetic Structure of the Chukchi Reindeer Breed), *Vestnik DVO RAN*, 2016, No 2(186), PP. 108-112.
2. Goncharov, V.V. Ocenka geneticheskogo raznobraziya severnogo olenya (*Rangifer tarandus* L.) s pomoshch'yu mul'tilokusnogo DNK-fingerprintinga (Assessment of the Genetic Diversity of Reindeer (*Rangifer tarandus* L.) using Multilocus DNA Fingerprinting), V.V. Goncharov, O.V. Mitrofanov, N.V. Dement'eva i dr., *Doklady RASKHN*, 2011, No 5, PP. 36-39.
3. Davydov, A.V. Differenciatsiya dikih i domashnih form severnogo olenya (*Rangifer tarandus* L.) po rezul'tatam analiza mtDNK (Differentiation of Wild and Domestic Forms of Reindeer (*Rangifer tarandus*) in accordance with mtDNA Analysis Data), A.V. Davydov, M.V. Holodova, I.G. Meshcherskiy i dr., *S.-h. biologiya*, 2007, No 6, PP. 48-53.
4. Zhivotovskiy, L.A. Statisticheskie metody analiza chastot genov v prirodnyh populyatsiyah (Statistical Methods of Analysis of Gene Frequencies in Natural Populations), *Itogi nauki i tekhniki: Obschaya genetika*, Moskva : VINITI, 1983, T. 8, PP. 76-104.
5. Zinov'eva, N.A., Gladyr', E.A. Geneticheskaya ehkspertiza sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh: primeneniye test-sistem na osnove mikrosatellitov (Genetic Examination of Farm Animals: Application of Test Systems Based on Microsatellites), *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2011, No 9, PP. 19-20.
6. Maceevskiy, YA., Zemba, YU. Genetika i metody razvedeniya zhivotnyh (Genetics and Methods of Animal Breeding), Moskva: Vysshaya shkola, 1988, 488 p.
7. Metodicheskie rekomendatsii po ispol'zovaniyu metoda polimeraznoj cepnoj reakcii v zhivotnovodstve (Guidelines for the Use of Polymerase Chain Reaction in Animal Husbandry), sost. N.A. Zinov'eva [i dr.], Dubrovicy, VNI zhivotnovodstva, 1998, 47 p.
8. Romanenko, T.M., Kalashnikova, L. A., Fillipova, G. I., Lajshev, K.A. Geneticheskaya struktura populyatsii severnyh oleney o. Kolguev Neneckogo avtonomnogo okruga (Genetic Structure of Reindeer Population in Kolguev Island, Nenets Autonomous District), *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2014, No 4, PP. 68-70.
9. Serebrovskiy, A.S. Geneticheskij analiz (Genetic Analysis), Moskva: Nauka, 1970, 188 p.
10. Sistema vedeniya olenovodstva v Magadanskoj oblasti: Rekomendatsii (The System of Reindeer Farming in the Magadan Region: Recommendations), razrab.: P.M. Barsov, G.YA. Bryzgalov, B.V. Garbarec i dr., Novosibirsk: SO VASKHNIL, 1986, 252 p.
11. Shubin, P.N., Efimceva, EH. A. Biohimicheskaya i populyatsionnaya genetika severnogo olenya (Biochemical and Population Genetics of Reindeer), Leningrad: Nauka, 1988, 103 p.
12. Yakovlev, A.F., Smaragdov, M. G., Matyukov, V.S. DNK-tehnologii v selektsii sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh (DNA Technologies in Breeding of Farm Animals), *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2011, No 8, PP. 49-50.
13. Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994) Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20, P. 176-183. – URL: <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1994.1151>